

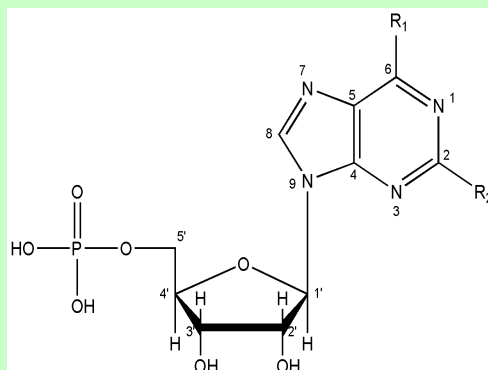
NUKLEOTIDOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Nukleotidok szerkezete

Csak a purin vázasokat termelik ipari méretekben:



Nukleotid	R1	R2	Előfordulás
5'-AMP	-NH ₂	-H	DNS, RNS
5'-GMP	-OH	-NH ₂	DNS, RNS
5'-IMP	-OH	-H	Intermedier
5'-XMP	-OH	-OH	Intermedier



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Nukleotidok gyártása

Ízjavítók, ízfokozók

- Japánban már a XVII sz. óta használják (umami)
- Az 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-XMP-t nátrium-glutamáttal kombinálva megfigyelhető e vegyületek szinergikus hatása
- nagyon kis mennyiségben (0,005–0,01%) is erőteljes ízfokozó hatásuk van.
- 1959-1961: RNS hidrolízis és direkt fermentációs technológia
- Ajinomoto vállalat 1960-tól gyárt ételízesítőként használt nukleotid-származékokat (nátrium-inozinát és nátrium-ribonukleotidok)
- Kyowa Hakko : 1966-tól



Gyógyszerek

- Antibiotikumok, citosztatikumok mellett alkalmazhatók
- Nukleinsav-szintézis során fejtik ki hatásukat, antimetabolitként beépülve (8-azaguanin)
- Megtalálhatóak ezenkívül
 - szívgyógyszerekben,
 - izomerősítőkben,
 - vírusok reprodukcióját gátló szerekben



Felhasználás

	Felhasználás (t/év)	Funkció
IMP	2000	ételízesítő
GMP	1000	ételízesítő
Inozin	25	szívgyógyszer
ATP	6	izomerősítő



RNS enzimes hidrolízise

Élesztő RNS-ből endogén (saját) RNáz enzimmal, vagy enzim-preparátum segítségével végzik.

	DNS-tartalom (%)	RNS-tartalom (%)*
Baktérium	0,37 – 4,5	5 – 25
Élesztő	0,03 – 0,5	2,5 – 15
Penész	0,15 – 3,3	0,7 - 28

*: a jelzett RNS-tartalom 5%-a mRNS, 10-15%-a tRNS, 75-80%-a rRNS



Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítása

Az élesztősejtekben jóval nagyobb mennyiségű RNS található, mint DNS

- nemcsak információátvitel a feladatuk, hanem szerkezeti anyagokként is funkcionálnak

Olyan, mint az SCP gyártás, csak itt éppen a magas nukleinsav-tartalom kell

- nem szükséges az anyagcserét mutációkkal befolyásolni
- olyan törzseket kell választani, melyeknek magától is nagy az RNS-tartalma:
 - *Candida utilis* és *Saccharomyces cerevisiae*



Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítása

A maximális RNS-tartalom eléréséhez:

- Log szakasz: maximális szaporodási sebesség
 - Folytonos technológiával melasz, vagy szulfitszenny-lég szénforráson.
 - 35 g/l SCP koncentráció elérhető, 10-15% RNS-tartalom; 20.000 t/év gyártó kapacitás
- Alacsony C:N arány beállítása
- Zn koncentráció: adagolni kell, 0,25 ppm szintig

A nukleinsav bioszintézis során nátrium adagolás viszont nem szükséges



Extrakció

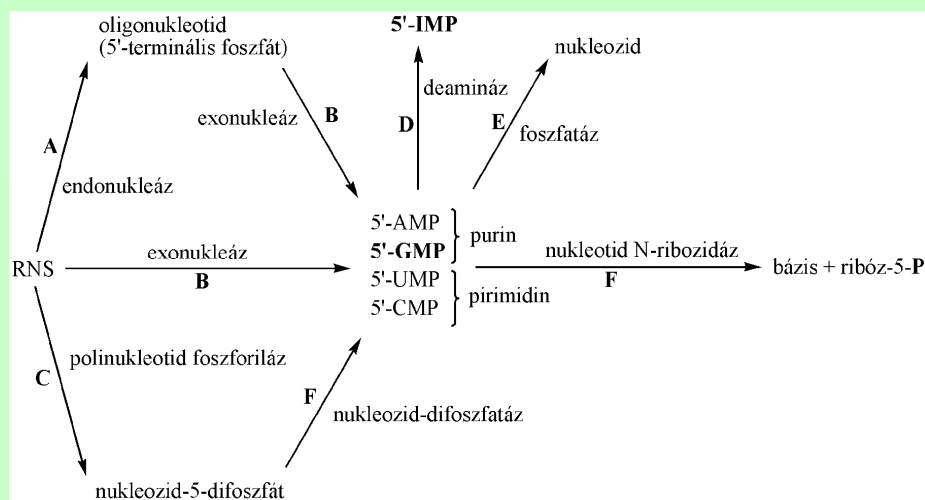
A nukleinsavak a fehérjéknél stabilabbak, kinyerhetőek

- 5-20%-os NaOH-oldatban, 100 °C hőmérsékleten, 8 órán át tartó forró lúgos főzéssel
- A DNS bomlékonyabb, mint az RNS
- A főzés a sejtek fehérjei tönkremennek, az RNS-tartalom feloldódik
- sejtmaradványok centrifugálással elkülöníthetők, majd a ribonukleinsavak szelektív (savas) kicsapással elválaszthatók
- Mosás EtOH-val, majd szárítás



Enzimes hidrolízis

- enzimtermelés, kinyerés



Enzimes hidrolízis

Az ipari eljárások során a hidrolízist 2%-os RNS-oldatban végzik, pH=5 mellett, 4 órán keresztül, 65°C-on (lásd: SCP, nukleinsav mentesítés!)

Immobilizált enzimekkel is dolgoznak.

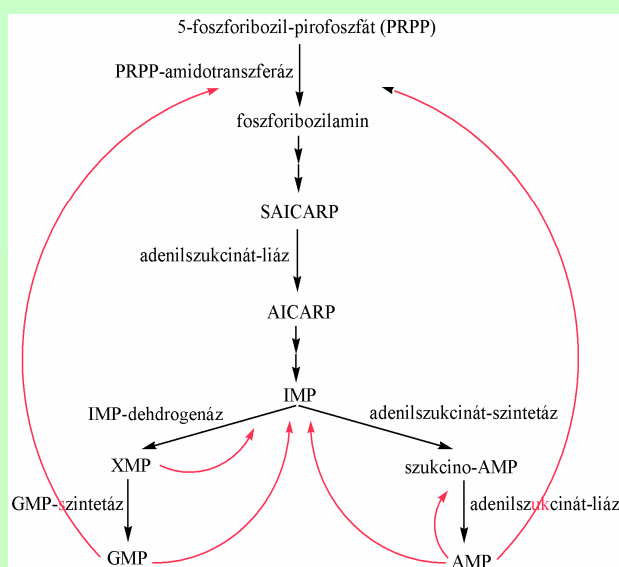
A folyamat végén nukleotidok keveréke keletkezik, (purin és pirimidin vázzal rendelkezők egyaránt).

Elválasztás anioncserélővel, vagy metanolos frakcionált kicsapással.

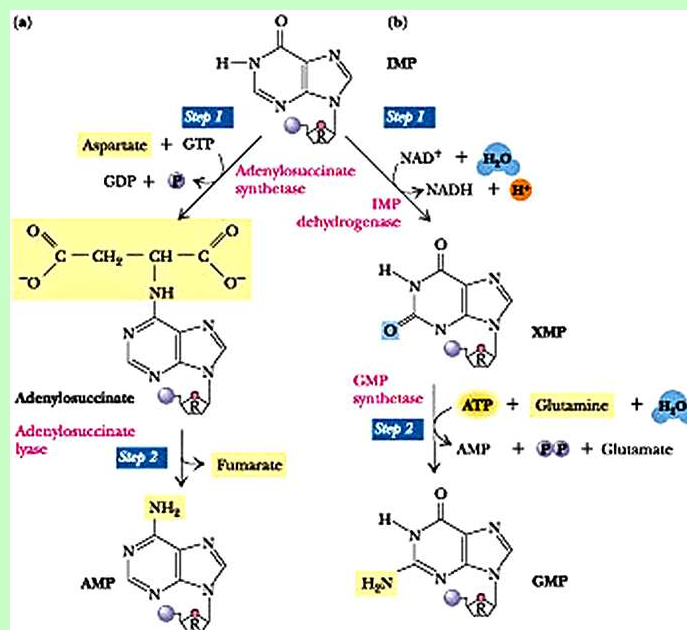


De novo fermentációs gyártás

Az anyagcseremérnöki beavatkozásokhoz ismerni kell a bioszintézis menetét, és a szabályozási mechanizmusokat.



Nukleotid bioszintézis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Anyagcsere-mérnöki beavatkozások

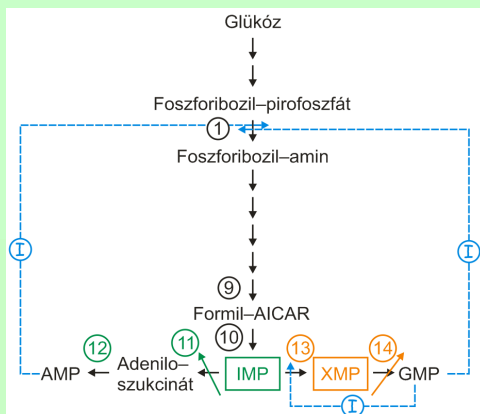
1. A sejt által termelt utolsó intermedier az IMP legyen, mindkét további anyagcsereutat elzárják, de: a normális életfolyamatokhoz kis mennyiségben szükség van nukleotidokra →
 - vagy a táptalajba adagolunk kis mennyiséget
 - vagy leaky mutánst izolálunk, ez kis mennyiségben termeli a GMPt és AMPt
2. A túltermelést megakadályozó szabályozásokat megszüntetik → antimetabolit rezisztens (6-merkaptopurin) mutánsokat alkalmaznak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

5'-IMP termelés direkt fermentációval



IMP: 11 mutáció + AMP kis koncentrációban
XMP: 11 és 14 mutáció + AMP és GMP kis koncentrációban

A kívánt törzs jellemzői:

- *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*
- Az SAMP-szintetáz enzim hiányzik (IMP átalakítás), ezek a törzsek AMP-re auxotrófok.
- Kicsi az IMP → XMP átalakítás katalízisét végző enzim aktivitása
- GMP feed back működése
- A sejt citoplazma membránja permeábilis 5'-IMP-re

A fermentáció során lényeges a megfelelő foszfát, Mg- és Mn-koncentrációk beállítása

2-3 napos folyamat a hipoxantin-képzés, és 8 napos az 5'-IMP-termelés, extracelluláris.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

5'-IMP termelés direkt fermentációval

Ade⁻: adeninre auxotróf,
 Nuc⁻: nukleotidáz-negatív
 (nem bontja le a terméket)
 6 MP^r: 6-merkaptó-purin-
 rezisztens (antimetabolit)

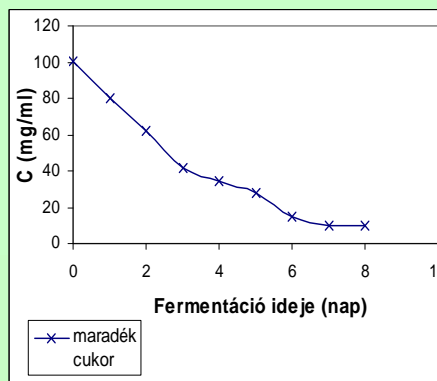
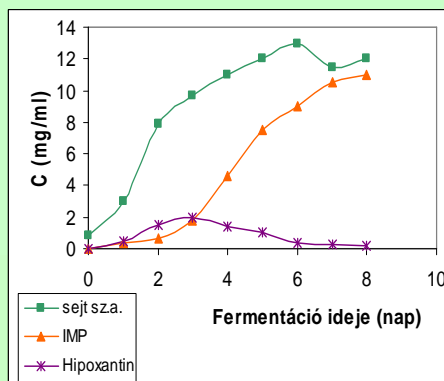
Törzs, mutáns neve	Genetikai azonosító	5'-IMP hozam (g/l)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ade ⁻ Nuc ⁻	0,6
<u>A-1-25</u>	Ade ⁻ 6MP ^r	2,0
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>		
<u>KY 7208</u>	Ade ⁻	5,0
<u>KY 13102</u>	Ade ⁻	12,8
<u>KY 13105</u>	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen	19
<u>KY 13369</u>	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen Gua ⁻	20-27



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

5'-IMP termelés direkt fermentációval



A szénforrás, a képződött sejtömeg és az előállított nukleotidok mennyiségének fermentáció alatti változásai (*B. ammoniagenes* KY 13102 törzzsel végzett 5'-IMP fermentáció)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

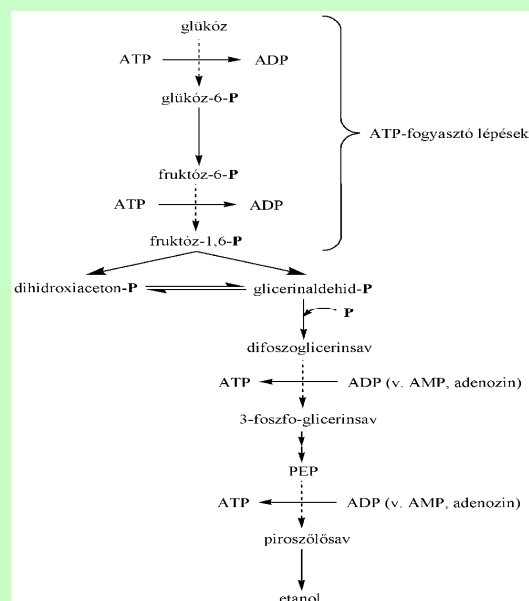
ATP gyártás

Korábban lóizomból vonták ki, napjainkban élesztővel állítják elő (Gánti, Reanal).

A glikolízis gyorsabb és egyszerűbb ATP termelő folyamat, mint a terminális oxidációhoz kapcsolt oxidatív foszforilezés.

De: fogyasztja is az ATP-t:

-2 ATP → +4 ATP

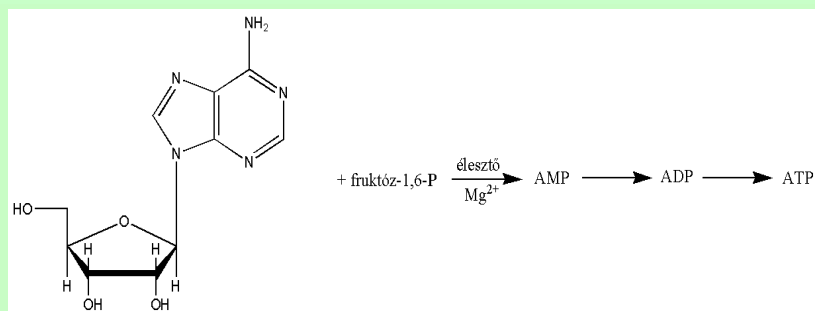


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

ATP gyártás

Az ATP-t fogyasztó lépéseket úgy kerülik el, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*) a glikolízis már foszforilezett közttermékét adagolják (fruktóz-1,6-biszfoszfát), amit kémiai szintézissel állítanak elő. Az enzimek Mg^{2+} ionokat igényelnek.



ATP gyártás

A felhalmozott ATP az élesztő sejtömegeből kinyerhető.

Szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos).

A világpiac körülbelül 5 tonna/év (Kína)

