

NUKLEOTIDOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Gyógyszerek

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

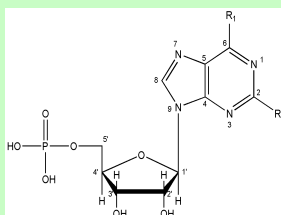


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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

Felhasználás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

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 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

RNS enzim hidrolízis

Élesztő RNS-ből endogén (saját) RNáz enzimmel, 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

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*

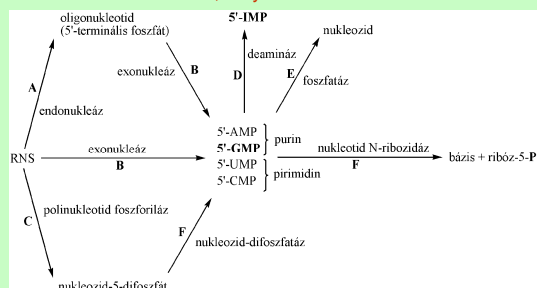


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Enzimes hidrolízis

enzimtermelés, kinyerés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Extrakció

A nukleinsavak a fehérjénél 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
- sejtfalmaradványok centrifugálással elkülöníthetők, majd a ribonukleinsavak szelektív (savas) kicsapással elválaszthatók
- Mosás EtOH-val, majd szárítás

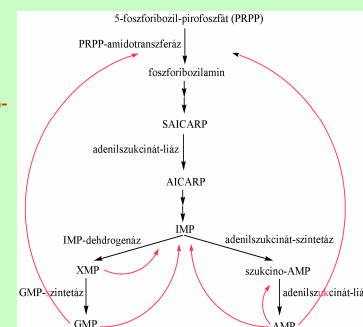


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

De novo fermentációs gyártás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Nukleotid bioszintézis

The diagram illustrates the biosynthesis of AMP and GMP. It starts with Aspartate and GTP, which are converted to Adenylosuccinate and GDP. Adenylosuccinate is then converted to IMP by Adenylosuccinate dehydrogenase. IMP is further converted to AMP by Adenylosuccinate lyase. Alternatively, IMP is converted to XMP by GMP synthetase, which then leads to GMP. The diagram also shows the conversion of Fumarate to AMP and Glutamate to GMP.

13

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5'-IMP termelés direkt fermentációval

Ade: adeninre auxotróf, Nuc: nukleotidáz-negatív (nem bontja le a terméket)
6 MP: 6-merkaptopurin-rezisztens (antimetabolit)

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

16

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Anyagcsere-mérnöki beavatkozások

- 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 mutánt izolálunk, ez kis mennyiségben termeli a GMPt és AMPt
- A túltermelést megakadályozó szabályozásokat megszüntetik → antimetabolit rezisztens (6-merkaptopurin) mutánsokat alkalmaznak.

14

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5'-IMP termelés direkt fermentációval

The left graph shows the concentration of 5'-IMP (mg/ml) increasing over time (0-10 days) for three different strains: sejt szá. (green squares), IMP (orange triangles), and Hipoxantin (purple circles). The right graph shows the concentration of residual sugar (mg/ml) decreasing over time (0-10 days) for the same three strains.

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

17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5'-IMP termelés direkt fermentációval

The diagram shows the metabolic pathway from Glükóz to AMP and GMP. Key steps include the conversion of Glükóz to Foszfobozil-pirofoszfát, then to Foszfobozil-amin, and finally to Formil-AICAR, IMP, XMP, and GMP. Mutations are indicated by circled numbers: 11 for AMP, 12 for Adeniló-szukcinát, 13 for XMP, and 14 for AMP and GMP.

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 permeabilis 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.

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

15

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

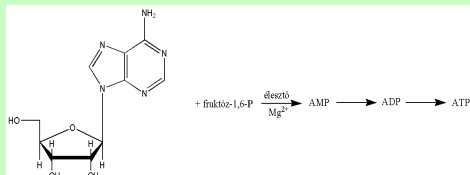
The diagram shows the conversion of glucose to ethanol, highlighting the ATP-consuming steps (glucose to fructose-6-P, fructose-6-P to fructose-1,6-P) and the ATP-producing steps (glyceraldehyde-P to dihydroxyacetone-P, and the subsequent steps leading to ethanol).

18

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ATP gyártás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

ATP gyártás

A felhalmozott ATP az élesztő sejtömegeből kinyerhető.

Szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos).

A világpiac körülbelül 5 tonna/év (Kína)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20