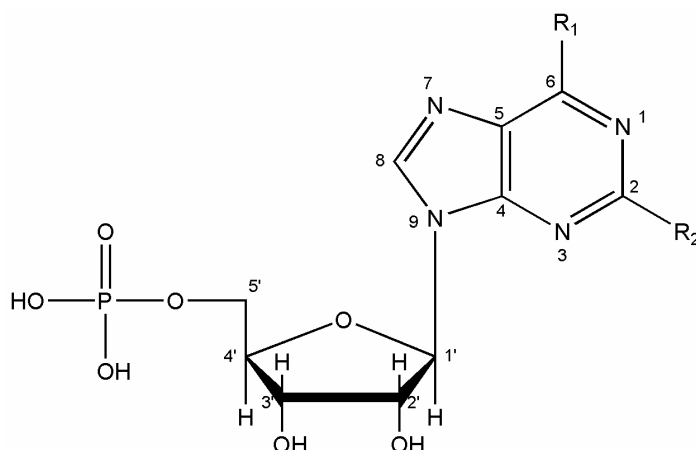


Nukleotidok (nukleozidok) előállítása



1. ábra: A purin-nukleotidok szerkezete

Az előforduló purin-nukleotidok:

Nukleotid	R ₁	R ₂	Előfordulás
5'-AMP	-NH ₂	-H	DNS, RNS
5'-GMP	-OH	-NH ₂	
5'-IMP	-OH	-H	Intermedierek
5'-XMP	-OH	-OH	

Nukleotidok gyártásának, előállításának jelentősége

- *Ízjavító, ízfokozó szerek*

Japánban a XVII. század óta használják az ún. *umami* ízű („ötödik íz”) ételízesítőket (erjesztett, hidrolizált szója és egyéb termékek, bennük glutaminsav és más ízanyagok).

Az 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-XMP-t nátrium-glutamáttal kombinálva megfigyelhető e vegyületek szinergikus hatása, mert már nagyon kis mennyiségben (0,005–0,01%) is erőteljes ízfokozó hatásuk van.

Az ipari RNS hidrolízis és direkt fermentációs technológia kialakítása 1959-1961-re tehető.

Az Ajinomoto vállalat 1960-as alapítása óta gyárt ételízesítőként használt nukleotid-származékokat (nátrium-inozinát és nátrium-ribonukleotid); a szintén japán Kyowa Hakko vállalat 1966-ban alapította élelmiszer adalékokat gyártó részlegét, mely azóta is termel jellegzetes, *umami* ízű ételízesítőket.

- *Gyógyszerek*

Származékaik antibiotikumok, citosztatikumok mellett alkalmazhatók, így a nukleinsavsztintézis során fejtik ki hatásukat, antimetabolitként beépülve (8-azaganin).

Megtalálhatóak ezen kívül szívgyógyszerekben, izomerősítőkből, vírusok reprodukcióját gátló szerekben is.

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

1. táblázat: Nukleotidok felhasználása

RNS enzim hidrolízise (5'-IMP, 5'-GMP)

Élesztő RNS-ből endogén (saját) enzim, vagy enzimpreparátum 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

2. táblázat: Nukleinsav tartalom

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

1. Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítás

Az élesztősejtekben jóval nagyobb mennyiségű RNS található, mint DNS (körülbelül ötszörös mennyiség), mert nemcsak információátvitel a feladatuk, hanem szerkezeti anyagokként is funkcionálnak. A folyamat célja a „klasszikus” SCP-gyártással ellentétben olyan sejtöreg előállítás, melynek magas a nukleinsav-tartalma. Ennek eléréséhez nem szükséges az anyagcserét befolyásolni, csak a célnak jól megfelelő törzseket kell választani, melyeknek magas az RNS-tartalma. A *Candida utilis* és a *Saccharomyces cerevisiae* használata megszokott, a törzsek engedélyezettek, szaporításuk, izolálásuk viszonylag egyszerű.

Maximális RNS-tartalom elérése:

- Logaritmikusan szakasz: maximális szaporodás

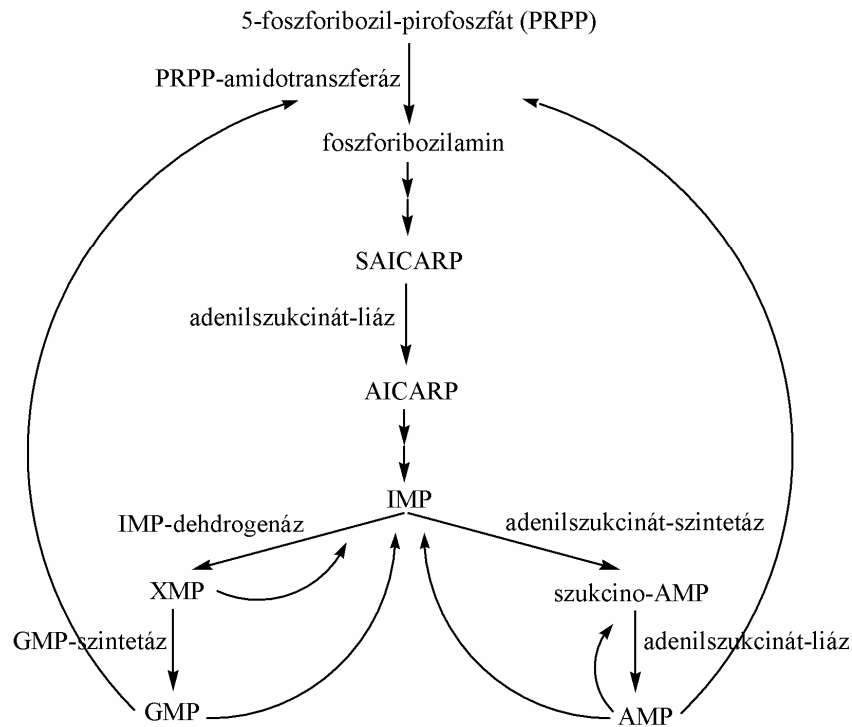
Folytonos technológiával melasz, vagy szulfid-szennylóg szénforráson.

35 g/l SCP koncentráció elérhető; 10-15% RNS-tartalom; 20.000 t/év gyártó kapacitás

- Alacsony C:N arány esetén
- Zn koncentrációnak is fontos szerepe van, ezért annak adagolására van szükség (0,25 ppm)

A nukleinsav bioszintézis során nátrium adagolása nem szükséges.

A 2. ábra az 5-foszforibozil-pirofoszfátból induló purin-nukleotidok bioszintézis útvonalát mutatja egy baktériumsejtben.



2. ábra: Purin-nukleotid bioszintézisének szabályozása *Bacillus subtilis* mikrobában (Shiio, 1979).

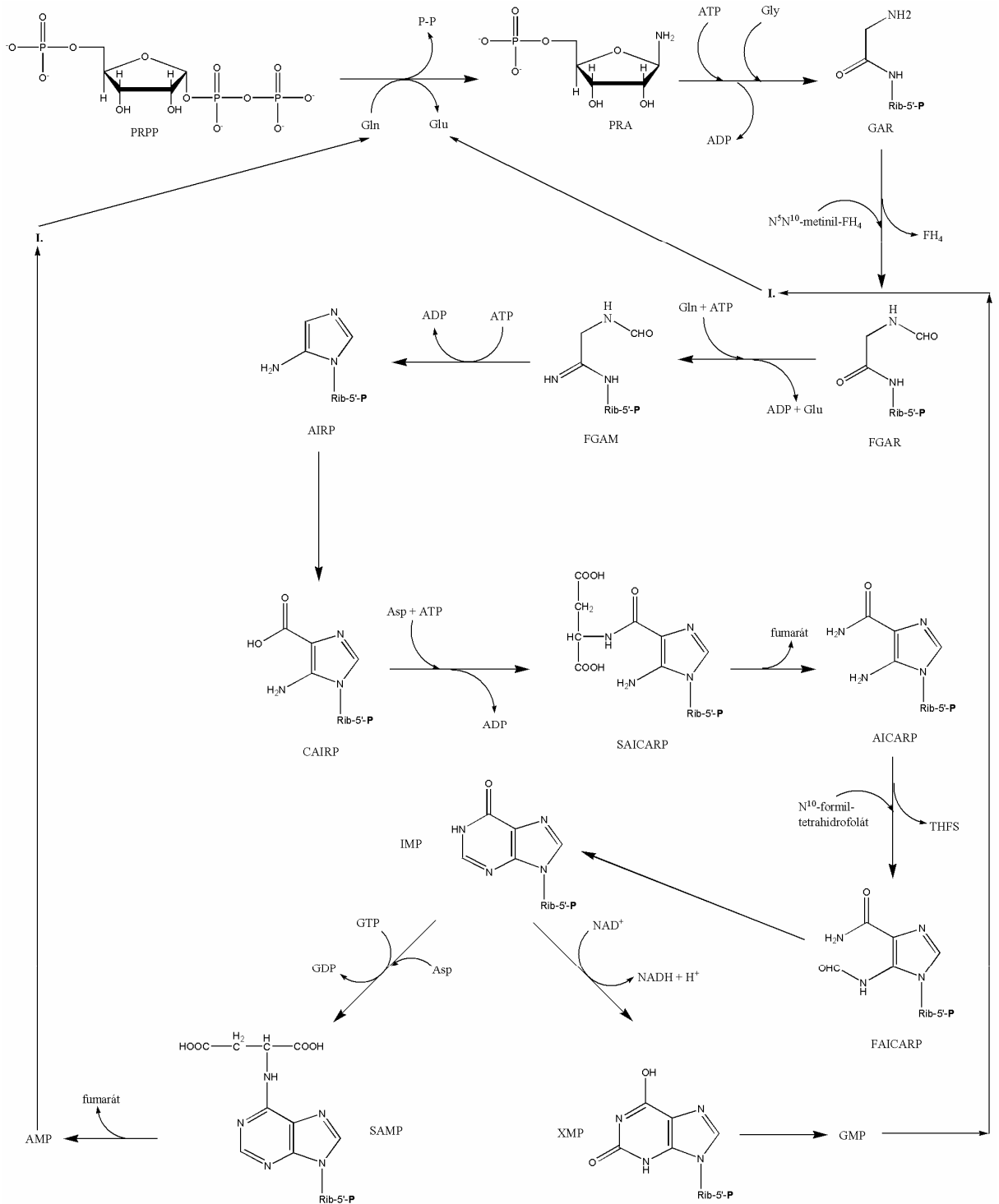
Az IMP, AMP, GMP, XMP végtermékek saját bioszintézisüket szabályozzák. A szabályozás bonyolult, soklépéses és többirányú.

A nukleinsav bioszintézishez (purinvázak felépítése) egyszerű metabolitok jelenléte szükséges (pl.: glicin, fumársav).

A purin nukleotidok *de novo* szintézise során egy tízlépéses folyamat vezet az IMP-molekulákhoz, melyek AMP-vé vagy GMP-vé alakulhatnak. Az IMP szintézisében hat enzim vesz részt, melyek közül három többfunkciós, több reakciót is katalizálhat. A purinváz kialakulásához a szintézis folyamatba belépő aminosavak járulnak hozzá, egy-egy újabb csoport hozzáadásával.

De novo szintézis

A *metabolic engineering* munkájának célja, hogy a sejt által termelt utolsó intermedier az IMP legyen, a további anyagcsereutakat elzárják, szabályozásukat leállítsák. A sejt szabályozó mechanizmusában az AMP és GMP visszszabályoz, így ha ezek már nem termelődnek, a visszahatás is megszűnik. A sejt életfunkcióinak fenntartásához azonban kis mennyiségben ezekre a vegyületekre is szükség van, ezért a táptalajba teszik ezeket az anyagokat, melyek kis mennyiségben nem gátolnak. Olyan mutánsokat is létrehozottak (*leaky mutáns*), melyekben nem teljesen iktatták ki az AMP- és GMP-képzést.



3. ábra: Az AMP és a GMP molekulák bioszintézise

Jelölésjegyzék:

PRPP	5-foszfo- α -D-ribozilpirofoszfát	SAICARP	1-(5'-foszforibozil)-4-(N-szuccinokarboxamid)-5-aminoimidazol
PRA	5-foszfo- β -ribozilamin	AICARP	5-amino-1-(5'-foszforibozil)-imidazol-4-karboxamid
GAR	5'-foszforibozilglicinamid	FAICARP	5-formamido-1-(5'-foszforibozil)-imidazol-4-karboxamid
FGAR	5'-foszforibozil-N'-formilglicinamid	SAMP	adenilszuccinát
FGAM	5'-foszforibozil-N'-formilglicinamidin	XMP	xantozin-5-foszfát
AIRP	1-(5'-foszforibozil)-5-aminoimidazol		
CAIRP	1-(5'-foszforibozil)-5-aminoimidazol-4-karboxilát		

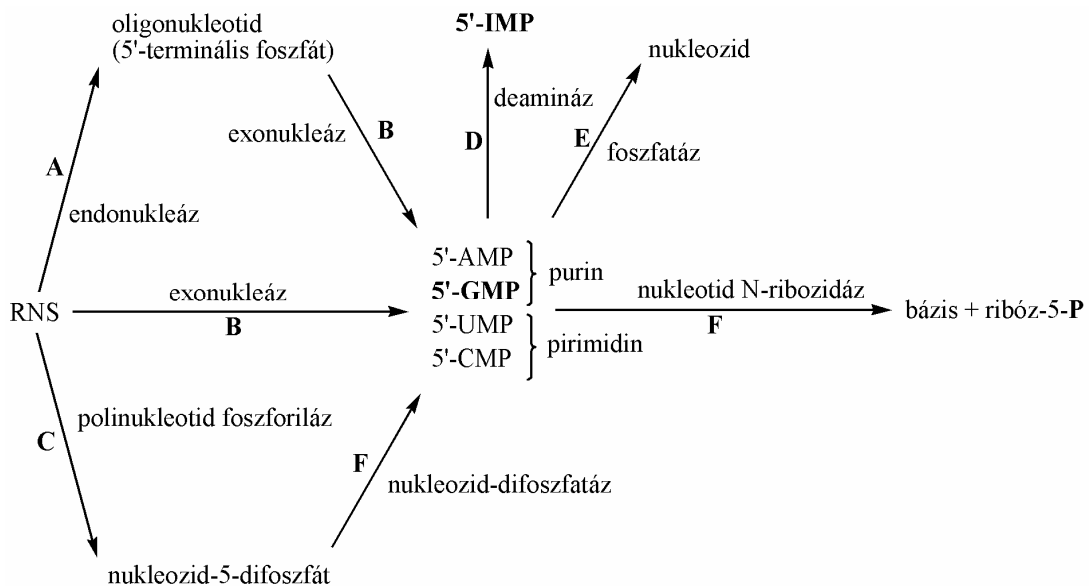
2. Extrakció

A nukleinsavak fehérjéknél nagyobb stabilitása kihasználható a nagy RNS-tartalmú élesztő nukleinsav-tartalmának kinyerése során. Emiatt 5-20%-os NaOH-oldattal, 100°C hőmérsékleten, 8 órán át tartó forró lúgos főzéssel a nukleinsavak elérhetővé válnak. A DNS bomlékonyabb, mint az RNS, így az jobban sérül a folyamat során.

Sejtfeltárás során a sejtek fehérjei tönkremennek, az RNS-tartalom feloldódik, mert megszűnik a riboszómák kompakt szerkezete. A sejtfalmaradványok centrifugálás után elkülöníthetőek, majd a ribonukleinsavak szelektív kicsapással elválaszthatóak, savas közegben (sósav). Etil-alkoholos mosással, majd szárítással juthatunk a kívánt RNS-tartalomhoz.

3. Enzimes hidrolízis (enzimtermelés, kinyerés)

Extrakciós módszerek mellett enzimes hidrolízissel is kinyerhetjük a sejtek nukleinsav-tartalmát.



4. ábra: A GMP és IMP nukleotidszármazékok szintézisének enzimjei

A folyamatok az RNS molekula hidrolízisével indulnak, melyet exo- és endonukleázok egyaránt végezhetnek (**A** és **B**). A láncon belül hasító endoenzim oligonukleotidokat eredményez, az 5' végen foszfátcsoporttal. Ezeket az oligonukleotidokat újabb folyamatok végül mononukleotidokká hidrolizálják (**B**). Az RNS molekula bázissorrendjétől függően purin- és pirimidin-nukleotidok képződhetnek. Az AMP molekulákat *Aspergillus oryzae* enzimeivel deaminálják IMP nukleotidokká (**D**), így amino-csoport → keto-csoport átalakítás történik. A szükséges enzimet a *Penicillium citrinum* nem, míg a *Streptomyces aureus* tartalmazza. Az ipari szintézisek során a hidrolízist 2%-os RNS-oldattal végzik, pH=5 mellett, 4 órán keresztül, 65°C-on. Immobilizált enzimekkel is dolgoznak. A folyamat végén nukleotidok keveréke keletkezik (purin és pirimidin vázzal rendelkezők egyaránt), melyek elválasztása történhet anioncserélővel vagy metanolos frakcionált kicsapással.

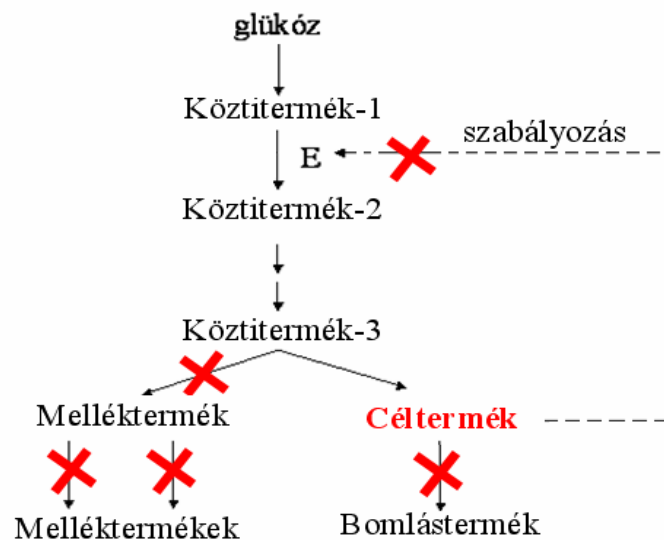
Olyan mikroba törzseket (*Penicillium citrinum*, *Streptomyces aureus*) érdemes választani és alkalmazni, melyekben az **A-D** enzimek dominálnak. Az 5'-mononukleotid-foszfátok bomlását nukleozidokká (**E**) a foszfatáz enzim gátlásával akadályozzák meg (a folyamat hőmérsékletén, azaz 65°C-on a foszfatáz enzim inaktíválódik, hőmérsékleti optimuma 45°C).

Anyagcseremérnökség

A metabolic engineering elsősorban primer metabolitok termelésénél játszik fontos szerepet. Olyan törzsek kialakítása a cél, ahol a kívánt metabolitot nagy mennyiségben tudja előállítani a sejt. Ehhez az anyagcsere-útvonalakat kell módosítani. Indukált mutációval, majd szelekcióval lehet előállítani a megfelelő törzseket.

Először is le kell állítani azokat a mellékreakciókat, amelyek elvonnák a kívánt termék előállításához szükséges molekulákat, el kell zárni az elágazásokat.

Emellett meg kell szüntetni azokat a reakciókat, amelyek termékünket tovább alakítanak, hiszen ezek elbontják a már létrehozott célterméket. Ezt a két célt auxotróf mutánsok izolálásával lehet megvalósítani. Ha a termék továbbalakulása során egy létfontosságú



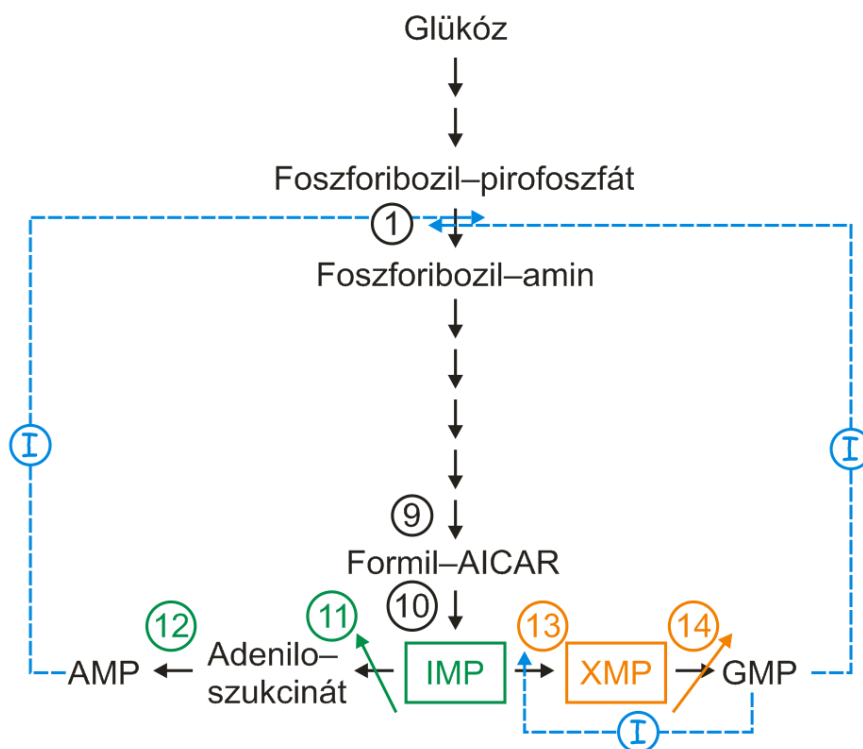
metabolit keletkezik, ami esszenciális a mikrobának, akkor ezt az anyagot a bioszintézis út lezárása esetén is biztosítani kell. Erre két lehetőség van; vagy a táptalajba kell adagolni a hiányzó vegyületet, vagy úgynevezett leaky (szivárgó) mutánsot kell keresni. Ennél a terméket továbbalakító lépés a mutáció következtében nem áll le teljesen, csak lelassul (csökkent kópiaszám, vagy kisebb váltásszámú enzimfehérje). Így a mikroba kis mennyiségben megtermeli magának a szükséges anyagot, de a felhalmozódó hasznos terméket csak kis sebességgel alakítja át.

Más oldalról a túltermelést megakadályozó visszacsatolásokat kell kiiktatni, amelyek a termék feldúsulása esetén leállítanák a bioszintézist. A sérült feed back repressziójú mutánsokat rendszerint antimetabolit rezisztenciájuk alapján azonosíthatjuk. Az antimetabolitok a kiválasztott metabolitnak olyan szerkezet-analógjai, amelyek szerkezeti hasonlóságuknál (pl.: Trp - 5-metil-Trp, lizin - aminoetil-cisztein) fogva a feed back szabályozásra érzékeny enzimek megfelelő kötőhelyére illeszkedve lelassítják, leállítják azok működését. Ugyanakkor ezek az analógok nem képesek belépni a normál anyagcserébe. Az ép szabályozású sejtek számára az antimetabolit mérgező, mert a nem engedi a valódi metabolit termelését, és ennek hiányában a sejt elpusztul. Az antimetabolit-rezisztens sejtek csak akkor képesek túlélni a kezelést, ha a túltermelést szabályozó rendszerük sérült (pl. az

enzim kötőhelye a mutáció során megváltozott, és nem képes a metabolit felimerésére) és minden feed back nélkül állandóan termelik a végterméket.

4. IMP és XMP termelés de novo fermentációval

Az inozin-monofoszfát (IMP) és a xantozin-monofoszfát (XMP) előállítása párhuzamos útvonalakon történik. Az anyagcseremérnökség nagy szerepet játszik ezen előállítási folyamatokban: a megfelelő anyagcsereutak blokkolásával (11 ill. 14) és az AMP ill. GMP koncentráció alacsony értéken tartásával érhető el, hogy a folyamatok a megfelelő irányban játszódjanak le. Annak érdekében, hogy az AMP ill. GMP képződés elhanyagolható legyen, leaky mutánsokat hoznak létre, amelyekben a 11 ill. 14 jelzésű utak nem működnek. Ezen kívül a tápoldatba juttatott kis mennyiségű AMP ill. GMP segíti elő, hogy az esetleges minimális AMP ill. GMP képződés az egyensúly eltolása miatt leálljon. Emellett szükség van a hasznos termékek (IMP ill. XMP) folyamatos elvételére is. Fontos, hogy a fermentációhoz használt tápoldat nukleotidokat tartalmazzon. Megfelel a célnak pl. élesztőkivonat vagy húskivonat (de a kukoricalekvár pl. nem jó).



IMP: 11 mutáció + AMP kis koncentrációban

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

5. ábra: IMP és XMP előállítása anyagcsere mérnöki beavatkozásokkal

5'-IMP termelés direkt fermentációs technológiája

A kívánt törzs jellemzői:

- *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*
- Az SAMP-szintetáz enzim hiányzik (IMP átalakítás-**3.ábra**), ezek a törzsek AMP-re auxotróf tulajdonságúak.

- Kicsi az IMP → XMP átalakítás katalízisét végző enzim aktivitása (**3.ábra**)
- GMP feed back működése (**3.ábra**)
- A sejt citoplazma membránja permeábilis 5'-IMP-re

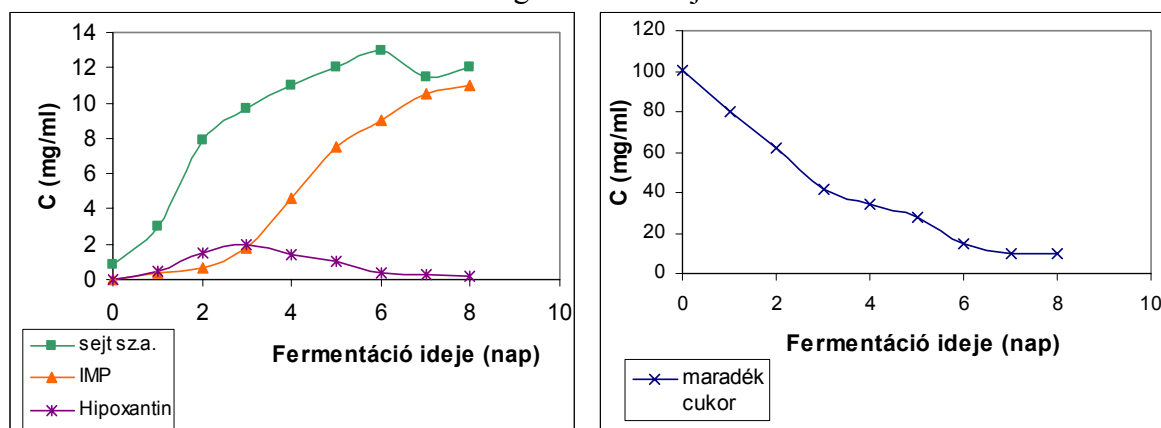
A fermentáció során lényeges a megfelelő foszfát, Mg- és Mn-koncentrációk beállítása. 2-3 napos folyamat a hipoxantin-képzés, és 8 napos az 5'-IMP-termelés, mely extracelluláris termék.

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

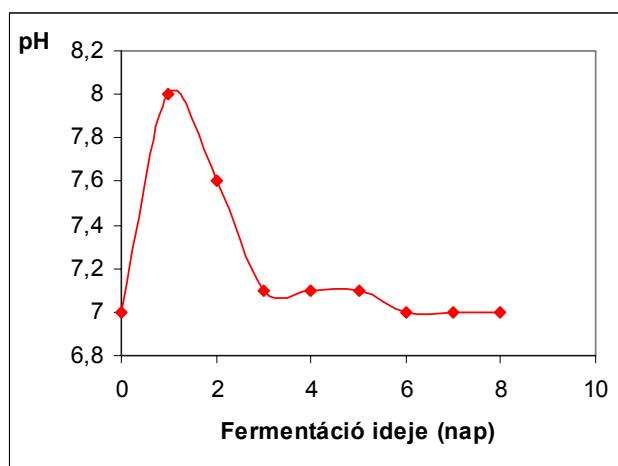
3. táblázat: Mutáns törzsek 5'-IMP hozamai

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

A szénforrás, a képződött sejtömeg és az előállított nukleotidok mennyiségének fermentáció alatti változásait az 1-2. diagramok mutatják.



1-2. diagram: B. ammoniagenes KY 13102 törzsszel végzett 5'-IMP fermentáció alakulása

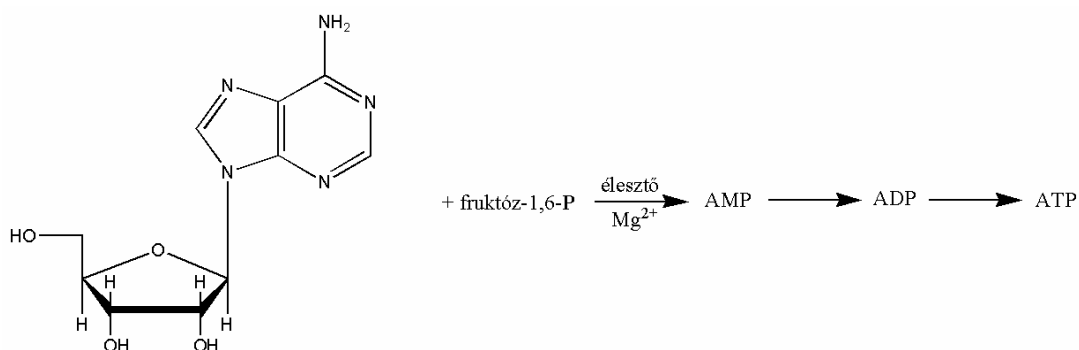


3. diagram: pH-változás a fermentáció alatt

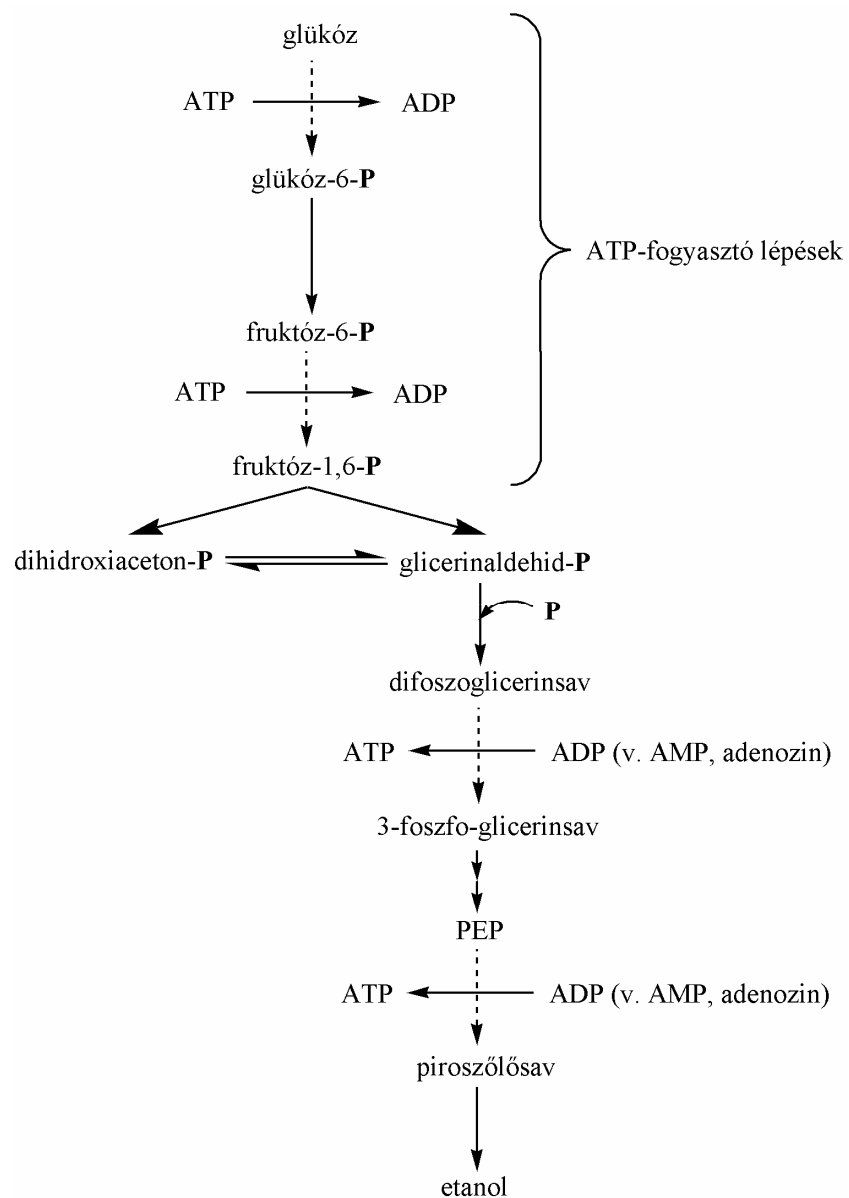
5. ATP-szintézis

Az ATP biológiai úton történő előállításához a glikolízis ATP-t fogyasztó lépéseit elkerülik úgy, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*) a glikolízis egy közttermékét adagolják. Az adagolt fruktóz-1,6-biszfoszfátot kémiai szintézissel állítják elő, és mellette Mg^{2+} ionokat adnak a rendszerhez. A glikolízis második felét működtetik így, ezáltal az ATP-termelő folyamatot részesítve előnyben, amellyel közel 100%-os P/O hányados érhető el (megvalósítója: Gánti Tibor, aki emellett a Chemoton elméletet is kidolgozta).

Korábban lóizomból állították elő, napjainkban az élesztős bioszintézisé a vezető szerep. Szívizom-erősítőként használatos (Atrifos, ATP; Reanal), évente körülbelül 1 tonna mennyiséget állítanak elő.



6. ábra: Ipari ATP előállítás élesztővel



7. ábra: ATP anyagcsere az élő sejtben