

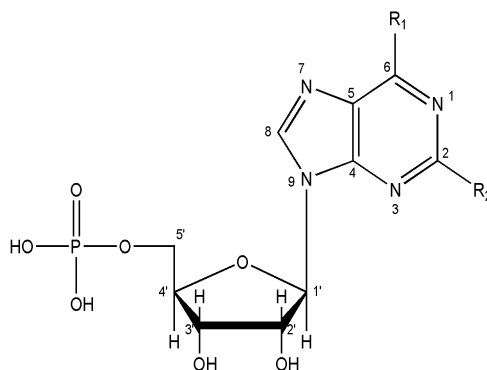
# NUKLEOTIDOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Nukleotidok szerkezete

Csak a purin vázasokat termelik ipari méretekben:



Nukleotid	R1	R2	Előfordulás
5'-AMP	-NH <sub>2</sub>	-H	DNS, RNS
5'-GMP	-OH	-NH <sub>2</sub>	DNS, RNS
5'-IMP	-OH	-H	Intermediér
5'-XMP	-OH	-OH	Intermediér



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

## Gyógyszerek

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## Felhasználás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## RNS enzimes hidrolízise

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

	<b>DNS-tartalom (%)</b>	<b>RNS-tartalom (%)*</b>
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

## 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

## 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

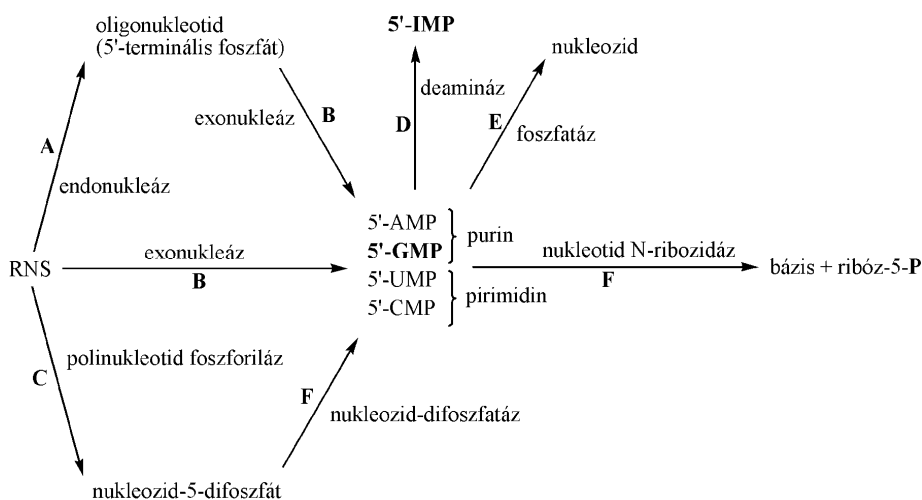


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## Enzimes hidrolízis

- enzimtermelés, kinyerés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

## 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.

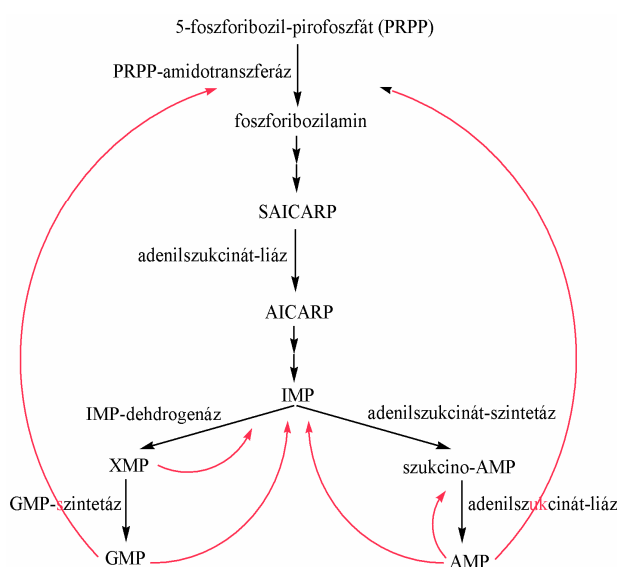


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

## De novo fermentációs gyártás

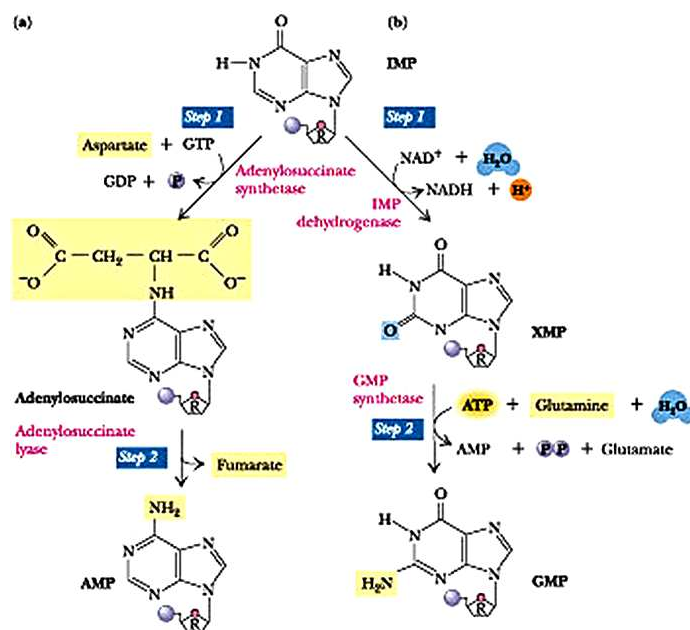
Az anyagcseremérnöki beavatkozásokhoz ismerni kell a bioszintézis menetét, és a szabályozási mechanizmusokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

## Nukleotid bioszintézis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## Anyagcsere-mérnöki beavatkozások

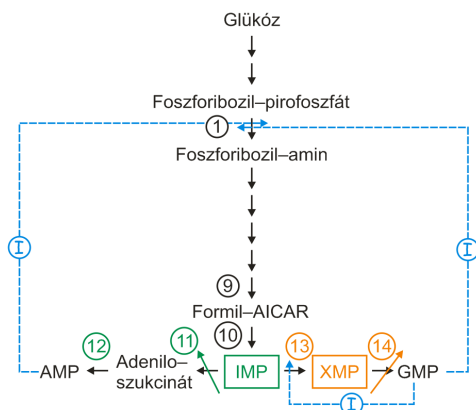
1. A sejt által termelt utolsó intermedier az IMP legyen, mindkét további anyagcsereutat elzárják, de: a normális életfolyamatokhoz kis mennyiségben szükség van nukleotidokra →
  - vagy a táptalajba adagolunk kis mennyiséget
  - vagy leaky mutánst izolálunk, ez kis mennyiségben termeli a GMPt és AMPt
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<sup>-</sup>: adeninre auxotróf,  
 Nuc<sup>-</sup>: nukleotidáz-negatív  
 (nem bontja le a terméket)

6 MP<sup>r</sup>: 6-merkaptó-purin-  
 rezisztens (antimetabolit)

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

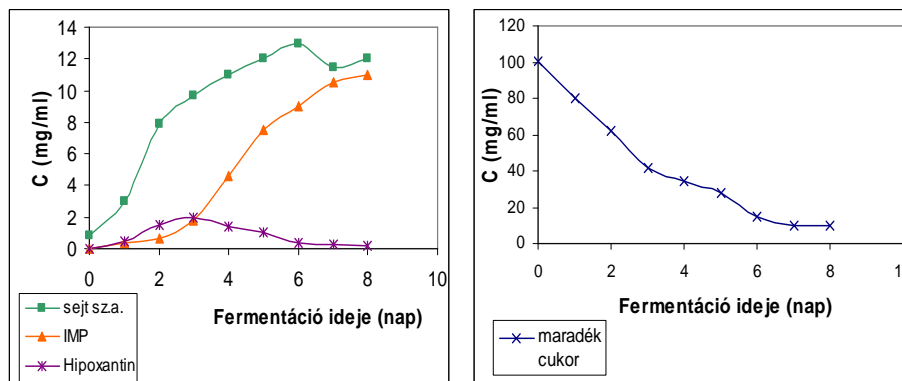


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

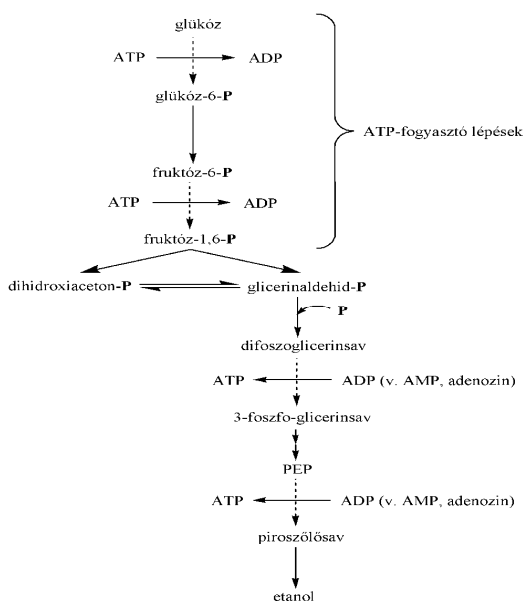
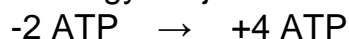
17

## 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:

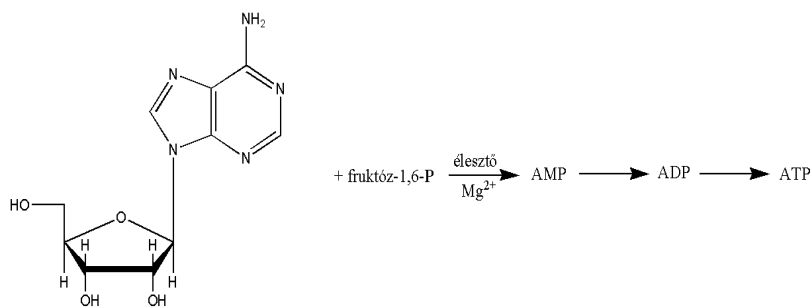


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



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