

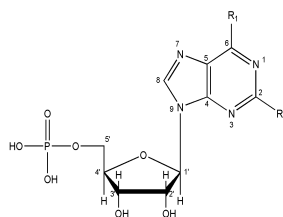
NUKLEOTIDOK



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Gyógyszerek

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Felhasználás

	Felhasználás (t/év)	Funkció
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 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

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

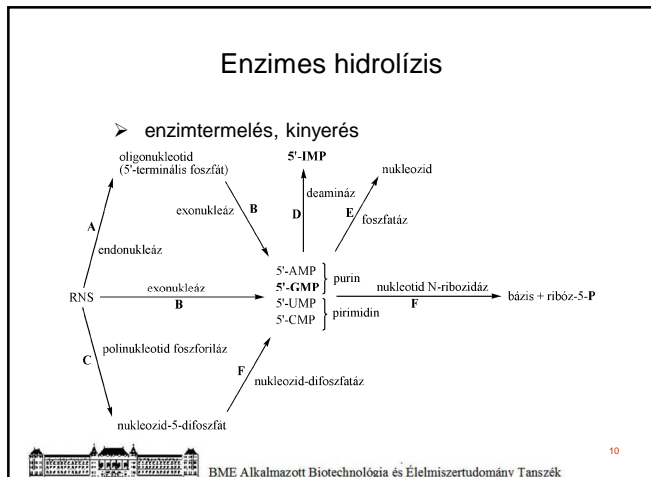
A nukleinsavak a fehérjéknél stabilabbak, kinyerhetőek

- 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9



Enzimés hidrolízis

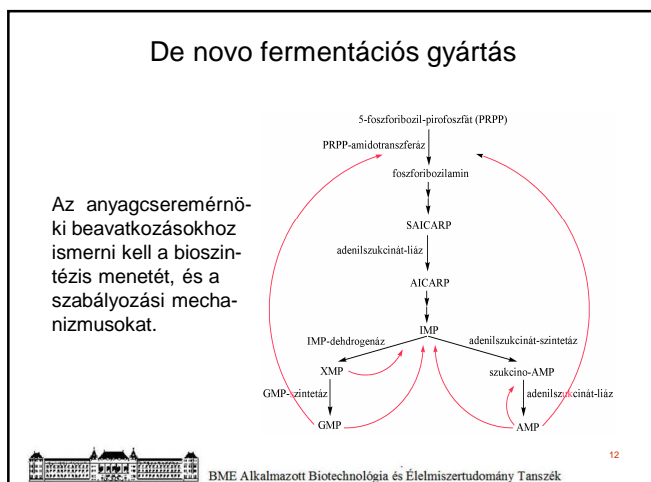
Az ipari eljárások során a hidrolízist 2%-os RNS-oldatban végzik, pH=5 mellett, 4 órán keresztül, 65°C-on (lásd: SCP, nukleinsav mentesítés!)

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



Nukleotid bioszintézis

The diagram illustrates the biosynthesis of nucleotides. Pathway (a) shows the conversion of aspartate to AMP. Pathway (b) shows the conversion of DMP to GMP. Both pathways involve the formation of IMP as a common intermediate. The diagram includes chemical structures for the nucleotides and the enzymes involved in each step.

13

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 mutánst izolálunk, ez kis mennyiségben termeli a GMPt és AMPt
- A túltermelést megakadályozó szabályozásokat megszüntetjük → antimetabolit rezisztens (6-merkaptó-purin) mutánsokat alkalmaznak.

14

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5'-IMP termelés direkt fermentációval

The diagram shows the metabolic pathway for the direct fermentation of 5'-IMP. It starts with glucose, which is converted to phosphoenolpyruvate (PEP) and then to pyruvate. Pyruvate is converted to formyl-AICAR, which is then converted to IMP. IMP is further converted to XMP and then to GMP. AMP is also shown in the pathway. Feedback inhibition points are indicated by red circles with numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, and 15.

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.

15

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5'-IMP termelés direkt fermentációval

Ade⁻: adeninre auxotróf,
Nuc⁻: nukleotidáz-negatív
(nem bontja le a termék-
ket)
6 MP^f: 6-merkaptopurin-
rezisztens (antimetabolit)

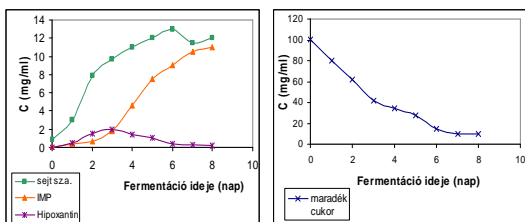
Törzs, mutáns neve	Genetikai azonosító	5'-IMP hozam (g/l)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ade ⁻ Nuc ⁻	0,6
A-1-25	Ade ⁻ 6MP ^f	2,0
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>		
KY 7208	Ade ⁻	5,0
KY 13102	Ade ⁻	12,8
KY 13105	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen	19
KY 13369	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen Gua ⁻	20-27



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 törzssel végzett 5'-IMP fermentáció)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

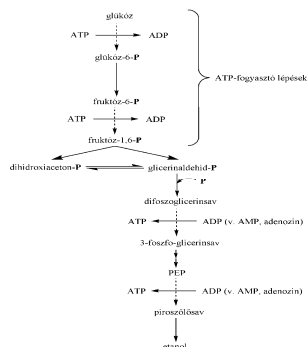
17

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

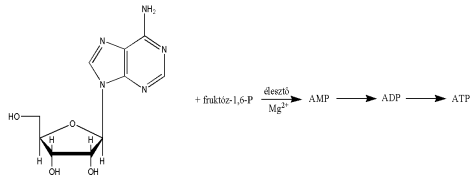


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

ATP gyártás

Az ATP-t fogyasztó lépéseket úgy kerülik el, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*) a glikolízis már foszforilezett 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
