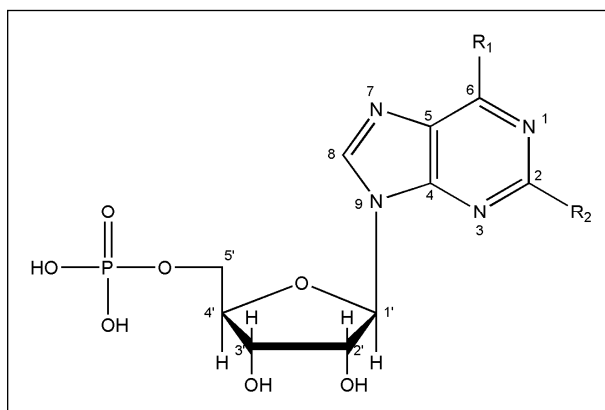


1. Nukleotidok (nukleozidok) előállítása

A nukleotidok az aminosavakhoz és a szerves savakhoz hasonlóan elsődleges anyagcse-retermékek, kulcsfontosságú metabolitok a sejtek életfolyamataiban. Ipari fontossága az aláb-bi négy purin nukleotidnak van:



1. ábra: A purin-nukleotidok szerkezete

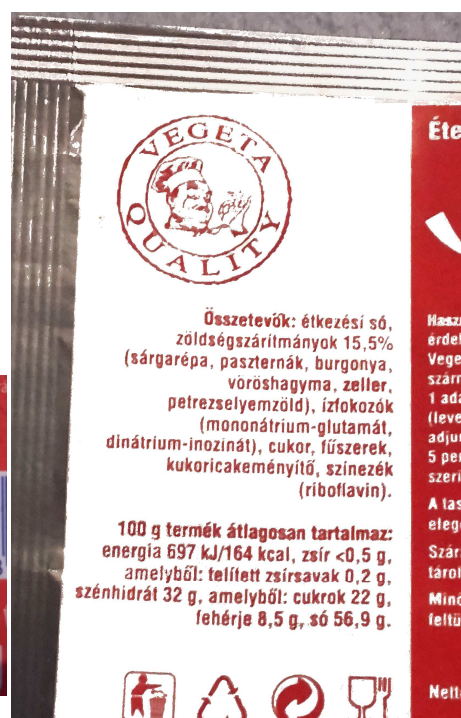
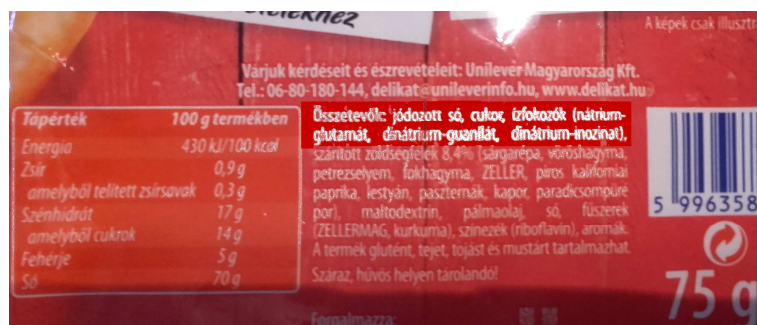
Nukleotid	R ₁	R ₂	Előfordulás
5'-AMP	-NH ₂	-H	DNS, RNS
5'-GMP	-OH	-NH ₂	
5'-IMP	-OH	-H	Intermedierek
5'-XMP	-OH	-OH	

1. táblázat A purin-nukleotidok szubsztituensei

1.1. A nukleotidok felhasználása

Ízjavító, ízfokozó szerek

A nátrium-glutamát és az 5'-ribonukleotidok együtt egy erős, gazdag ízérzést okoznak, ez az umami, vagy ötödik íz, amelyet az emberi nyelven lévő G-prote-infüggő heterodimer T1R1/T1R3 receptorok közvetíte-nek. A nukleotidok fokozzák az ízlelőbimbók reagálását az L-glutamátra, ezzel magyarázható az aminosav és a nukleotidok szinergikus hatása. Az 5'-GMP-nek, az 5'-IMP-nek és az 5'-XMP-nek nátrium-glutamáttal kombi-nálva már nagyon kis mennyiségben (0,005 - 0,01%) is



2. ábra Guanin, inozin és Na-glutamát az ételízesítőkben

erőteljes ízfokozó hatása van.

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

Ezeket az ízesítő kombinációkat a feldolgozott élelmiszerek széles skálájánál, leveseknél, mártásoknál használják.

Gyógyszerek

Származékaik antibiotikumok, citosztatikumok mellett alkalmazhatók, így a nukleinsav-szintézis során fejtik ki hatásukat, antimetabolitként (8-azaguanin). Megtalálhatóak ezen kívül vírusok reprodukcióját gátló szerekben (ribavirin, acyclovir), valamint szívgyógyszerekben, izomerősítőkben is.

A nukleotidok piacán vezet az Ajinomoto Co. (Japán), piaci részesedése mintegy 40%. Versenytársai még a koreai a CJ Group és a Daesang csoport, Japánban a Kirin Kyowa Foods, és Kínában a Star Lake Bioscience. Az nukleotidok iránti igény a feldolgozott élelmiszerek piacával párhuzamosan növekszik.

	Felhasználás (t/év)	Funkció
IMP	20000	ételízesítő
GMP	10000	ételízesítő
Inozin	250	szívgyógyszer
ATP	60	izomerősítő, laborvegyszer

2. táblázat: Nukleotidok felhasználása

1.2. A nukleotidok gyártása

Az nukleotidok ipari léptékű gyártása két úton valósítható meg. Az egyik út az RNS kivonása valamilyen biomasszából, majd lebontása hidrolízissel mononukleotidokig; a másik pedig a *de novo* fermentációs eljárás.

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.

1.2.1. Az RNS enzimes hidrolízise

Kézenfekvő gondolat, hogy valamilyen természetes sejtömegeből vonjuk ki a RNS-t, és ennek hidrolízisével állítsuk elő a mononukleotidokat. Az összetett szervezetek (növények, állatok) nukleinsav tartalma kicsi, így ezek nem jöhetnek számításba. A mikroorganizmusoknál az intenzív növekedés szakaszában viszont a fehérjeszintézis sok RNS (mRNS, tRNS, rRNS) közreműködését igényli. A fő rendszertani egységek sejtjeinek nukleinsav tartalmát hasonlítja össze a következő táblázat. Érdekes összevetni az egysejtfehérje (SCP) termelésnél vizsgált összetételekkel. Annál a technológiánál a nagy nukleinsav tartalom hátrány volt, itt viszont éppen ez a cél.

	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

3. táblázat: Mikroorganizmusok nukleinsav tartalma

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

Látható, hogy a baktériumok tartalmazzák a legtöbb nukleinsavat, de az apró sejt méret miatt a fermentlé biotartalom sokkal kisebb, mint az élesztőknél. Ezért élesztőket (*Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*) alkalmaznak a technológiákban.

1.2.1.1. Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítás

Az élesztősejtekben jóval nagyobb mennyiségű RNS található, mint DNS, mert nemcsak az információátvitel a feladatuk, hanem szerkezeti anyagokként is funkcionálnak. A folyamat célja a „klasszikus” SCP-gyártással ellentétben olyan sejtömeg előállítása, melynek nagy a nukleinsav-tartalma. Ennek eléréséhez nem szükséges a genetikát befolyásolni, csak a célnak megfelelő, nagy RNS-tartalmú törzseket kell kiválasztani. A *Candida utilis* és a *Saccharomyces cerevisiae* jól ismert, könnyen kezelhető törzsek, használatuk élelmiszerekben is engedélyezett, szaporításuk, izolálásuk viszonylag egyszerű. A maximális RNS-tartalom eléréséhez figyelembe kell venni, hogy:

- a maximális szaporodási sebességhez tartozik a maximális fehérjeszintézis. Ez az exponenciális fázisban áll fenn, tehát a sejteket ebből a szakaszból célszerű elvenni, ennek is a végén, amikor már nagy a sejtkoncentráció. A szakaszos fermentáció produktivitása viszont gyenge, ezért érdemes más technikát alkalmazni. Félfolytonos, vagy folytonos fermentációval több biotartalmat kaphatunk. A kemosztátot viszont nem lehet a $\mu_{\max}$ -nál üzemeltetni, csak szubsztát limitben. Eszerint a hígítási sebességet a $\mu_{\max}$ alatt nem sokkal kell beállítani. Folytonos technológiával melasz, vagy szulfít-szennyvíz szénforráson 35 g/l SCP koncentráció érhető el, 10-15% RNS-tartalommal.
- az intenzív fehérjeszintézishez a C/N arányt célszerű alacsonyan tartani,
- a Zn^{2+} ion jelenléte is befolyásoló paraméter, ha az egyéb komponensekkel bevitt koncentráció nem éri el a 0,25 ppm-et, akkor adagolással ki kell egészíteni.

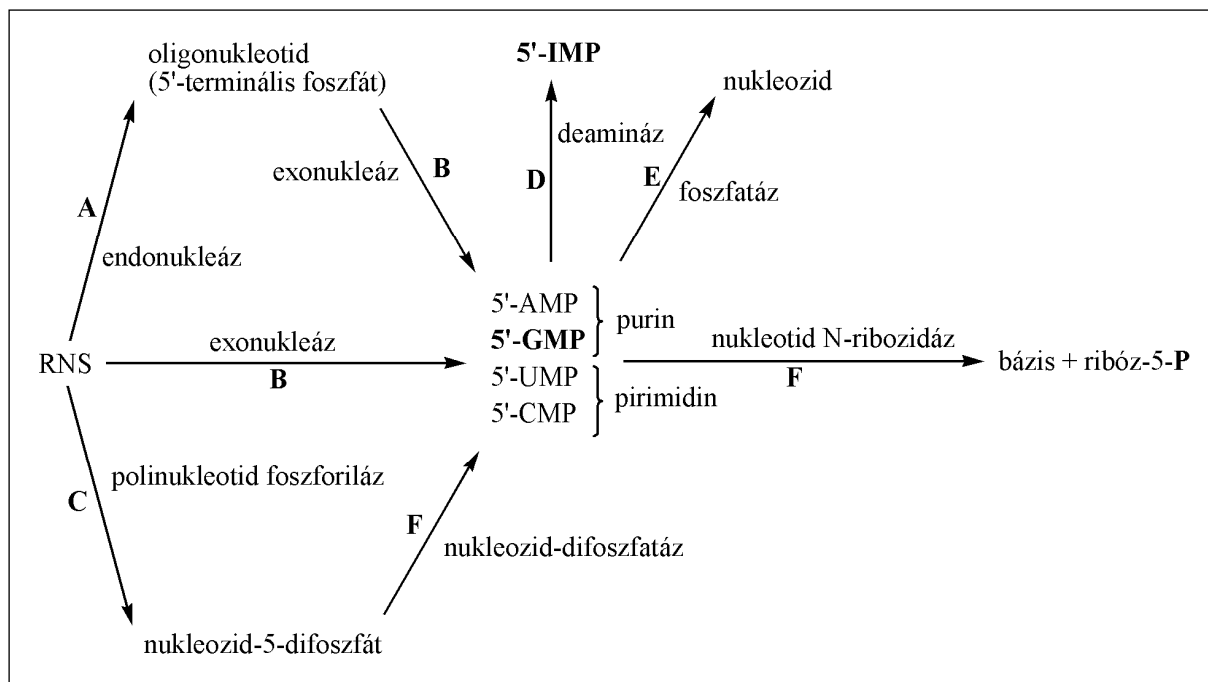
1.2.1.2. Az RNS kivonása

A nukleinsavak fehérjéknél nagyobb stabilitása kihasználható a nagy RNS-tartalmú élesztő nukleinsav-tartalmának kinyerése során. Tömény, 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 nagyobb mértékben bomlik a folyamat során.

Sejtfeltárás során a sejtek fehérjei tönkre mennek, az RNS-tartalom nátriumsó formájában feloldódik, mert megszűnik a riboszómák kompakt szerkezete. A sejtfalmaradványok centrifugálással elkülöníthetők, majd a ribonukleinsavak savas közegben (sósav) szelektív kicsapással elválaszthatók. Etilalkoholos mosással, majd szárítással juthatunk az RNS-hez.

1.2.1.3. Enzimes hidrolízis (enzimtermelés, kinyerés)

A kinyert RNS-ből a nukleotidokat enzimes hidrolízissel állíthatjuk elő. A folyamatok az RNS molekula hidrolízisével indulnak, melyben exo- és endonukleázok egyaránt részt vesznek (A és B). A láncon belül hasító endoenzim oligonukleotidokat eredményez, az 5' végén foszfátcsoporttal. A folyamatok az RNS molekula hidrolízisével indulnak, melyben exo- és endonukleázok egyaránt részt vesznek (A és B). A láncon belül hasító endoenzim oligo-



3. ábra Az RNS hidrolízis enzimjei

nukleotidokat eredményez, az 5' végén foszfátcsoporttal. Ezeket az oligonukleotidokat további lépésekben végül mononukleotidokká hidrolizálják (B). A vegyes enzim preparátumok előállításához olyan mikroba törzseket (*Penicillium citrinum*, *Streptomyces aureus*) érdemes választani, amelyekben az A-D enzimek dominálnak.

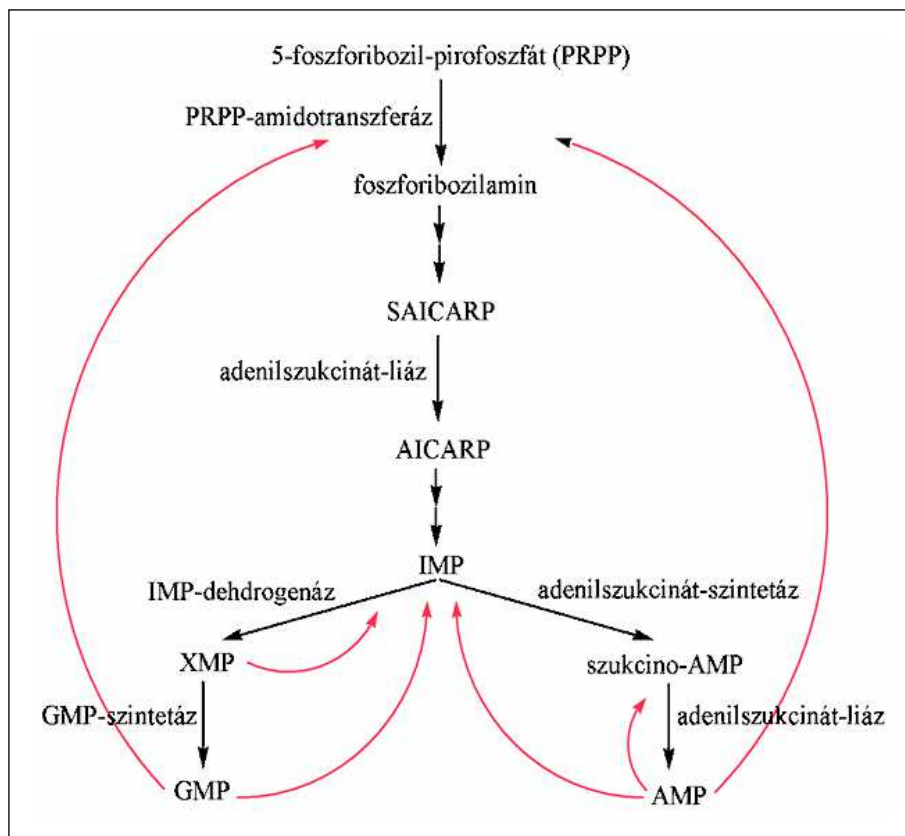
Az RNS molekula bázisösszetételétől függő arányban purin- és pirimidin-nukleotidok képződnek. Ezeket ioncserélőn vagy metanolos frakcionált kicsapással lehet szétválasztani. Az IMP kialakításához az AMP molekulákat *Aspergillus oryzae* enzimmal dezaminálják (D). Az 5'-mononukleotid-foszfátok bomlását nukleozidokká (E) a foszfátáz enzim gátlásával akadályozzák meg (a folyamat hőmérsékletén, azaz 65 °C-on a foszfátáz enzim inaktiválódik, hőmérsékleti optimuma csak 45°C).

Az ipari gyártás során a hidrolízist 2%-os RNS-oldatban végzik, pH=5 mellett, 4 órán keresztül, 65°C-on. Egyes gyártók immobilizált enzimekkel is dolgoznak.

1.2.2. De novo fermentáció

A másik lehetőség a nukleotidok vagy nukleozidok közvetlen fermentációs előállítása. Nukleozidok termelése esetén a foszforilezést a fermentáció után kell elvégezni, ez megoldható kémiai úton (foszforil-kloriddal) vagy enzimatikusan.

A nukleotidok ugyanúgy elsődleges anyagcseretermékek, mint az aminosavak, vagy a szerves savak. Azaz bioszintézisük ismeretében ugyanúgy alkalmazhatjuk a klasszikus és a modern anyagcseremérnökség módszereit. Ehhez előbb meg kell vizsgálnunk a bioszintézis utak és a szabályozási mechanizmusok térképét. Mivel az élelmiszeripar a purinvázak nukleotidokat igényli, ezért ezek képződésére koncentrálunk. A purinvázak felépítése egyszerű metabolitokból (pl.: glicin, fumársav) indul ki. Innen 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 szintézisbe belépő aminosavak járulnak hozzá, egy-egy újabb csoport hozzáadásával.



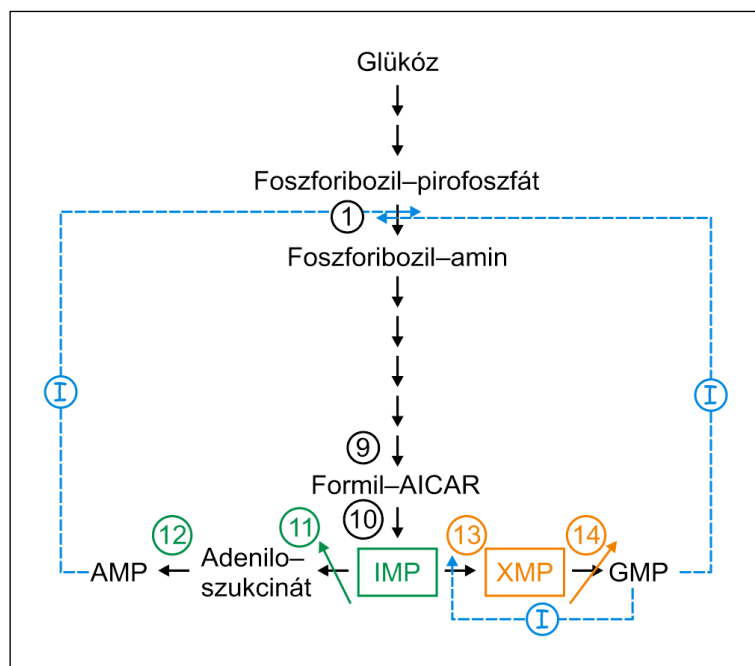
4. ábra A purin-nukleotidok bioszintézise és ennek szabályozása *Bacillus subtilis* törzsben
 Rövidítések: SAICARP: 1-(5'-foszforibozil)-4-(N-szukcinokarboxamid)-5-aminoimidazol,
 AICARP: 5-amino-1-(5'-foszforibozil)-imidazol-4-karboxamid

Az IMP, AMP, GMP, XMP metabolitok bioszintézisének szabályozása összetett, többszintű feed back inhibíció. A túltermelés megakadályozásában nem csak a végtermékek, hanem az előttük lévő intermedierek is részt vesznek.

Az anyagcsere mérnökség célja, hogy a sejt által termelt utolsó intermediert az IMP legyen, a további anyagcsere utakat elzárják, valamint a feed back szabályozásokat is kiiktassák. A szabályozási térképen látható, hogy az IMP utáni metabolitoknak van szabályozó szerepe. Ha viszont az IMP-t nem engedjük tovább alakulni, akkor nem képződnek szabályozó hatású molekulák sem, így ezzel a kérdéssel nem kell foglalkozni. A sejt életfunkcióinak fenntartásához azonban kis mennyiségben szükség van AMP-re és GMP-re, ezért ezeket az anyagokat a kis mennyiségben be kell vinni táptalajba. Célszerű „szivárgó” (*leaky*) mutánsokat izolálni, amelyekben csökkent aktivitással termelik az AMP-t és GMP-t, így ezeket a tápanyagokat mégsem kell beadagolni.

Mutációs beavatkozások IMP- és XMP-termelő törzseknél

Az inozin-monofoszfát (IMP) és a xantozin-monofoszfát (XMP) előállításuk ugyanazon az útvonalon történik. A klasszikus mutációs anyagcsere mérnökséggel irányíthatjuk a metabolikus fluxust: a megfelelő anyagcsere utakat blokkolásával (11 ill. 14) és az AMP ill. GMP koncentráció alacsony értéken tartásával elérhető, hogy a folyamatok a megfelelő irányban menjenek végbe.



5. ábra IMP és XMP előállítása anyagcsere mérnöki beavatkozásokkal

Annak érdekében, hogy az AMP ill. GMP képződés ne fogyassza az intermediereket, auxotróf mutánsokat hoznak létre, amelyekben a 11 ill. 14 jelzésű lépések nem működnek. A két nukleotid hiányában viszont fontos, hogy a fermentációs tápoldat nukleotidokat tartalmazzon. Megfelelő komponens pl. az élesztőkivonat vagy a húskivonat (de a kukoricalekvár pl. nem jó).

A törzsfeljesztés alanyául a japán kutatók a *Brevibacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, a kínaiak *Bacillus subtilis* és *B. licheniformis* a törzseket választották.

A létrehozott törzsek mutációs jellemzői:

XMP termelés: **11** és **14** mutáció + AMP és GMP kis koncentrációban (~19 g/l XMP)

IMP termelés: **11** mutáció: a SAMP-szintetáz enzim hiányzik, ezek a törzsek AMP-re auxotróf tulajdonságúak. + AMP kis koncentrációban szükséges (az érintetlen GMP szintézis termeli a GMP-t, de a sejt saját szabályozása miatt lecsökken az IMP → XMP átalakítás katalízisét végző enzim aktivitása, ez alacsonyan tartja a koncentrációt).

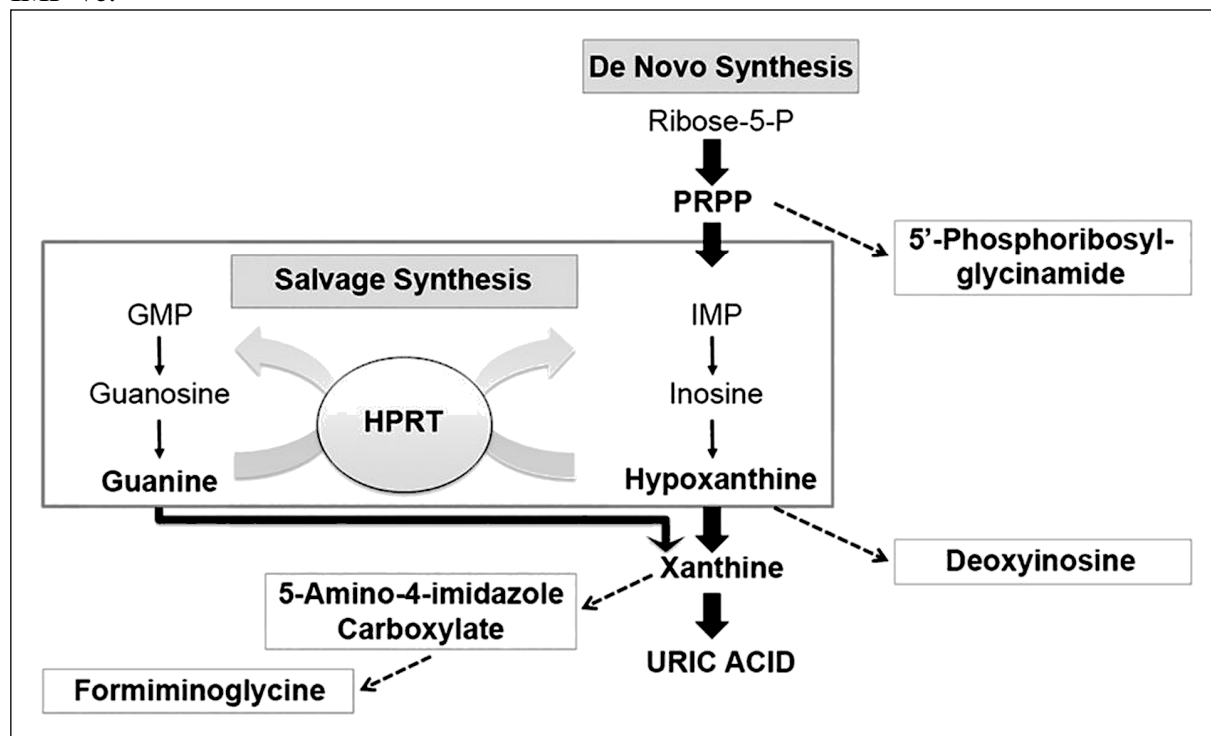
A sejt citoplazma membránja permeábilis 5'-IMP-re, a termék extracelluláris.

Törzs, mutáns neve	Genetikai azonosító	5'-IMP hozam (g/l)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ade ⁻ Nuc ⁻	0,6
A-1-25	Ade ⁻ 6MP ^r	2,0
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
<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 ⁻	20-27-39

2. táblázat: Mutáns törzsek 5'-IMP hozamai

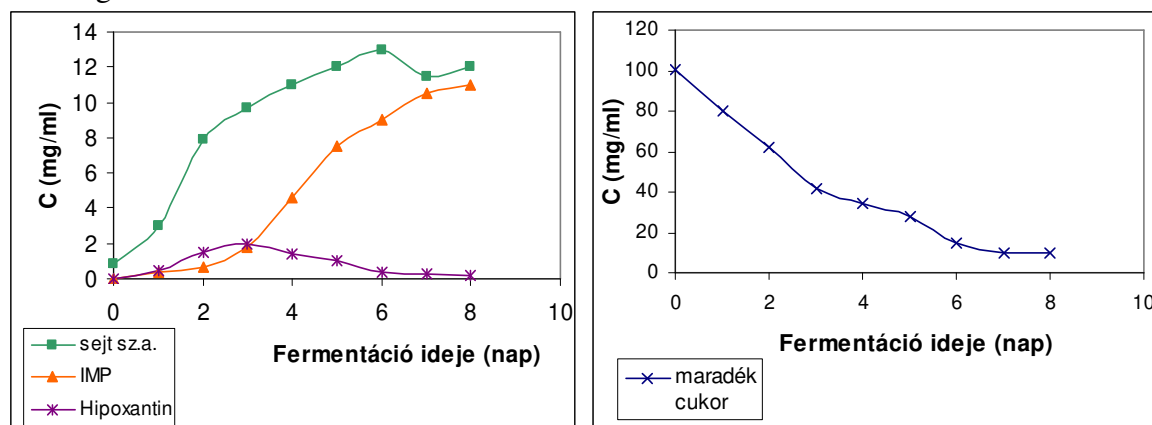
Ade⁻: adeninra auxotróf, Gua⁻: guaninra auxotróf, Nuc⁻: nukleotidáz-negatív (nem bontja le a terméket), 6 MP^r: 6-merkaptopurin-rezisztens (antimetabolit)

A fermentáció során lényeges a megfelelő foszfát, Mg- és Mn-koncentrációk beállítása. Az anyagcsereutak módosításánál eddig nem foglalkoztunk a termékek, a nukleotidok továbbalakulásának lehetőségével. A bontási útvonal a hipoxantinon keresztül a húgysavhoz vezet (6. ábra). Ennek következtében a termelő IMP egy része hipoxantinná alakul. Ez azért nem okoz különösebb problémát, mert idővel a reakció megfordul, és a hipoxantin visszaalakul IMP-vé.



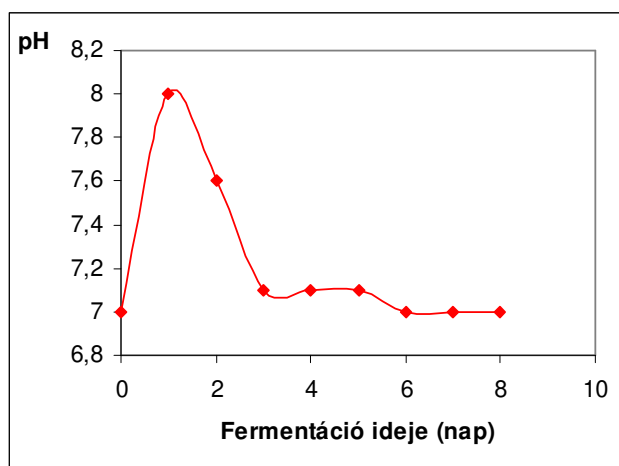
6. ábra A purinvázis vegyületek lebontási útvonala

A fermentáció első 2-3 napján megfigyelhető a hipoxantin-képződés, de ez a továbbiakban megszűnik.



7. ábra *B. ammoniagenes* KY 13102 törzsszel végzett 5'-IMP fermentáció lefutása

A fermentációs technológiában szokatlan jelenség, hogy a folyamat indulásánál nem savtermelés észlelhető, hanem a pH emelkedése, ami azután az exponenciális fázis után visszatér a semleges értékre.



8. ábra pH-változás az IMP fermentáció során

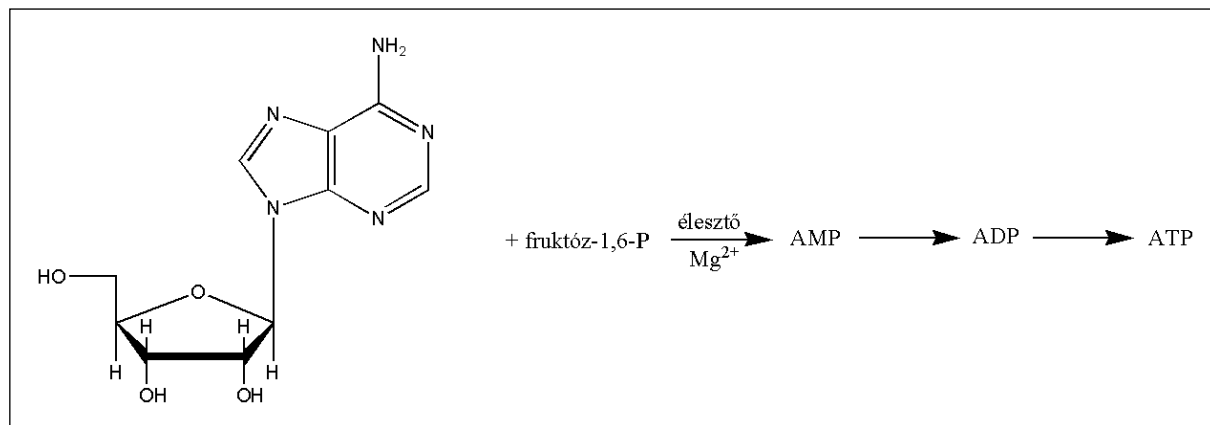
A klasszikus mutációs módszerek mellett a modern genetikai módszereket is bevetették a törzsjavítás érdekében. A vizsgált organizmusok közé bevették az *E. coli*-t is. Az enzimek kiejtése mellett gyakran építették be a deregulált promótereket, amelyek egész enzimsoporkot termelését tették konstitutívá. Mindezzel együtt ezek a törzsek sem tudták meghaladni a 40 g/l termékkoncentrációt. Az előnyük abban nyilvánul, hogy ezt fele annyi idő alatt, 3-4 nap alatt termelik meg.

1.3. ATP-szintézis

Az ATP-t történetileg előbb szervextrakcióval, lóizomból állították elő, de fél évszázada már biokémiai úton gyártják. Ezt az eljárást magyar kutató, Gánti Tibor dolgozta ki.

Adalék: Gánti Tibor nem kutatóintézetben dolgozott, hanem a REANAL Finomvegyszergyárban. Zseniális ötletei mellett kidolgozta az élő rendszerek működését reakciókinetikai elveken leíró chemoton elméletet. Könyvét angol nyelven többször is kiadták.

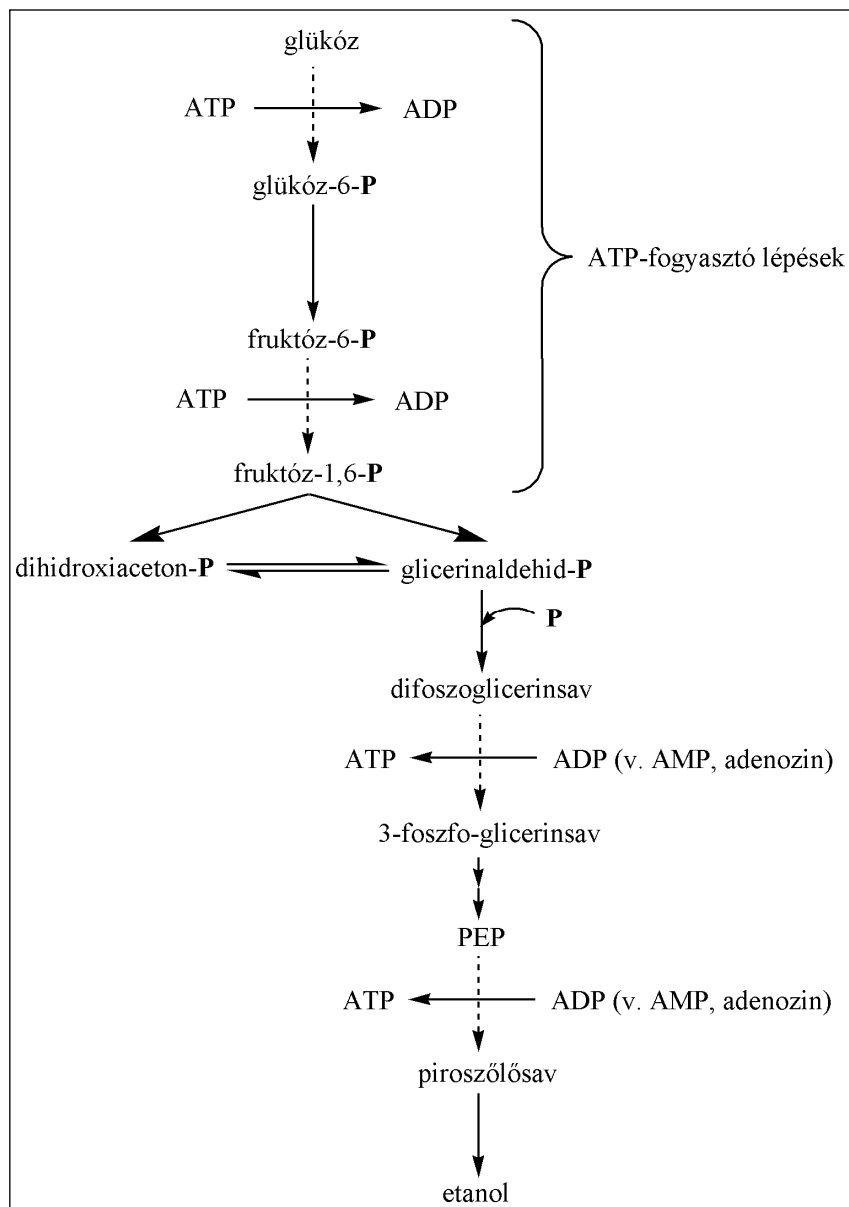
Az eljárás lényege az, hogy a glikolízis ATP-t fogyasztó lépéseit átugorják, és csak a reakciósor második felét, az ATP termelő lépéseket működtetik. Ezt úgy valósítják meg, hogy a glikolízis egy közttermékét, a fruktóz-1,6-biszfoszfátot és adenoizint adagolnak az élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*). Ezzel közel 100%-os P/O hányados érhető el. A szubsztrátokat szintetikusán állítják elő. Az élesztő további életfolyamatait igyekeznek leállítani, anaerob körülmények között, nyugvó sejtekkel végzik a konverziót.



9. ábra Ipari ATP előállítás élesztővel

Jelenleg a világ termelése évente körülbelül 5 tonna, túlnyomó részét a Gánti eljárás alapján Kínában állítják elő, egy 300 literes, immobilizált élesztő sejteket tartalmazó reaktorban.

Biokémiai reakciókban kosubsztrátként alkalmazzák, de gyógyszerként, szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos, Reanal).



10. ábra ATP anyagszere a glikolízis folyamatában