

NUKLEOTIDOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ízjavítók, ízfokozók

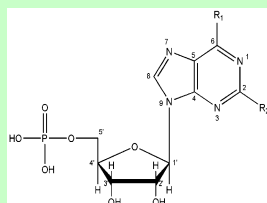


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



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

Gyógyszerek

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



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 a 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

Felhasználás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

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



Extrakció

A nukleinsavak a fehérjékénél 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



Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítása

Az élesztősejtekben jóval nagyobb mennyiségű RNS található, mint DNS

- nemcsak információátvitel a feladatuk, hanem szerkezeti anyagokként is funkcionálnak

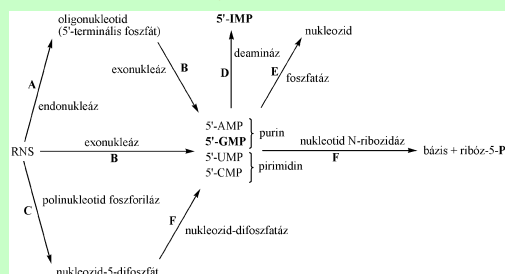
Olyan, mint az SCP gyártás, csak itt éppen a magas nukleinsav-tartalom kell

- nem szükséges az anyagcserét mutációkkal befolyásolni
- olyan törzseket kell választani, melyeknek magától is nagy az RNS-tartalma:
 - *Candida utilis* és *Saccharomyces cerevisiae*



Enzimes hidrolízis

- enzintermelés, kinyerés



Nagy RNS-tartalmú élesztő előállítása

A maximális RNS-tartalom eléréséhez:

- Exponenciális 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



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.



De novo fermentációs gyártás

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

13

5'-IMP termelés direkt fermentációval

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 katalizisét 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.

16

Nukleotid bioszintézis

(a) Adenyloszintetáz

Aspartate + GTP → Adenyloszintetáz → Adenyloszidinnat → Adenyloszidinnat-lyáz → Fumarate → AMP

(b) GMP-szintetáz

IMP → GMP-szintetáz → GMP + H₂N⁺

IMP → XMP → GMP

14

5'-IMP termelés direkt fermentációval

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>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

Ade⁻: adeninre auxotróf,
Nuc⁻: nukleotid-negatív (nem bontja le a termékét)

6MP^r: 6-merkaptó-purin-rezisztens (antimetabolit)

17

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 túlermelést megakadályozó szabályozásokat megszüntetjük → antimetabolit rezisztens (6-merkaptó-purin) mutánsokat alkalmaznak.

15

5'-IMP termelés direkt fermentációval

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

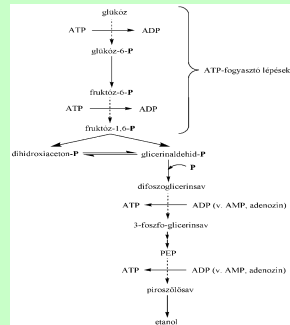
18

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

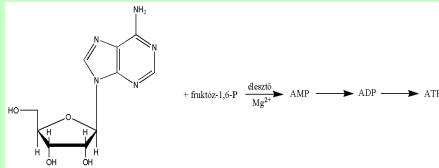


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

ATP gyártás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

ATP gyártás

A felhalmozott ATP az élesztő sejttömegből kinyerhető.

Szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos).

A világpiac körülbelül 5 tonna/év (Kína)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21