

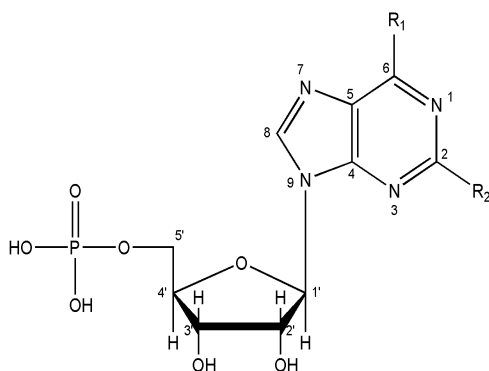
NUKLEOTIDOK



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

Ízjavítók, ízfokozók

VEGETA QUALITY

Összetevők: étkezési só, zöldségszáritmányok 15,5% (sárgarépa, paszternák, burgonya, vöröshagyma, zeller, petrezselyemzöld), ízfokozók (mononátrium-glutamát, dinátrium-inozinát), cukor, fűszerek, kukoricakeményítő, színezék (riboflavin).

100 g termék átlagosan tartalmaz:
 energia 697 kJ/164 kcal, zsír <0,5 g,
 amelyből: telített zsírsavak 0,2 g,
 szénhidrát 32 g, amelyből: cukrok 22 g,
 fehérje 8,5 g, só 56,9 g.

Éte
 Haszn
 Vege
 szár
 1 ada
 (leve
 adjur
 5 per
 szeri
 A las
 elég
 Szár
 tárol
 Mino
 feltű
 Nelli



BME Alkalmazott Biotechn

Gyógyszerek

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



Felhasználás

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



RNS enzimes hidrolízise

Élesztő RNS-ből endogén (saját) RNáz enzimmal, 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

7

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

8

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

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
- sejtfalmaradványok centrifugálással elkülöníthetők, majd a ribonukleinsavak szelektív (savas) kicsapással elválaszthatók
- Mosás EtOH-val, majd szárítás

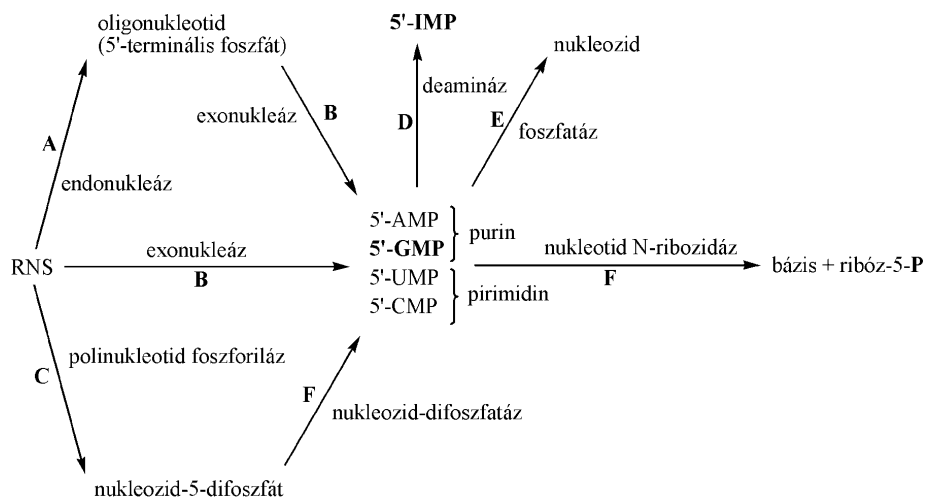


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Enzimes hidrolízis

enzimtermelés, kinyerés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

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.

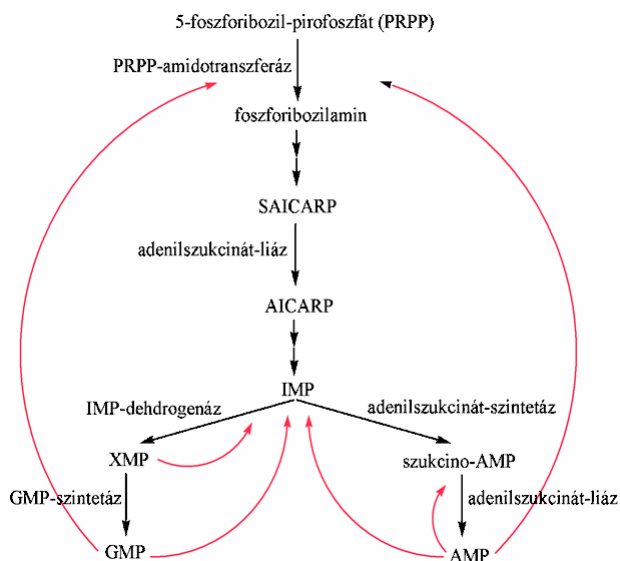


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

De novo fermentációs gyártás

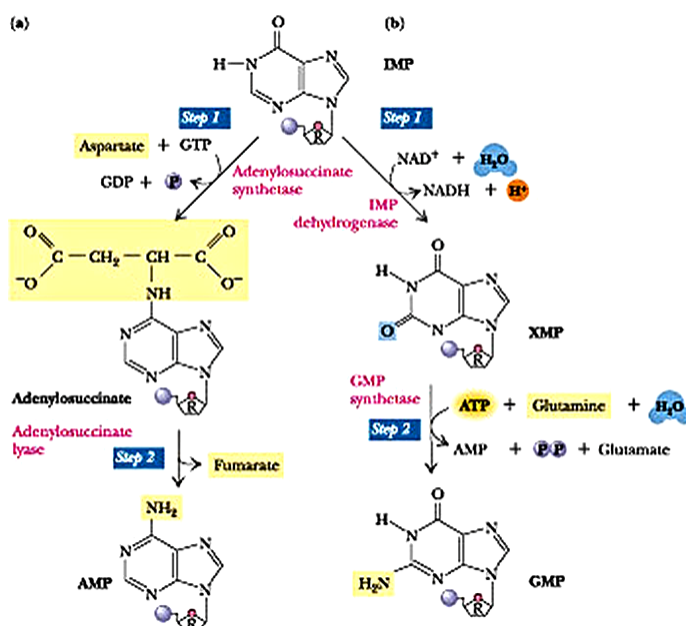
Az anyagcseremérnöki beavatkozásokhoz ismerni kell a bioszintézis menetét, és a szabályozási mechanizmusokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Nukleotid bioszintézis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Anyagcsere-mérnöki beavatkozások

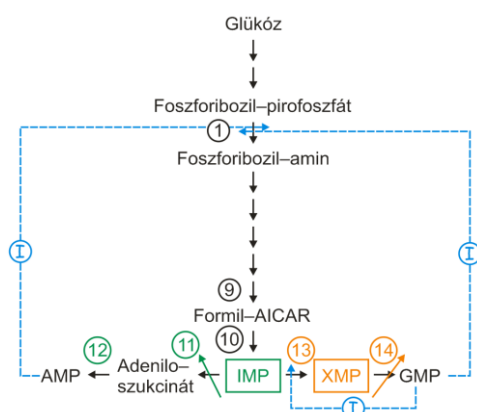
1. A sejt által termelt utolsó intermedier az IMP legyen, mindkét további anyagcsereutat elzárják, de: a normális életfolyamatokhoz kis mennyiségben szükség van nukleotidokra →
 - vagy a táptalajba adagolunk kis mennyiséget
 - vagy leaky mutánst izolálunk, ez kis mennyiségben termeli a GMPt és AMPt
2. A túltermelést megakadályozó szabályozásokat megszüntetik → antimetabolit rezisztens (6-merkaptopurin) mutánsokat alkalmaznak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

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

16

5'-IMP termelés direkt fermentációval

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

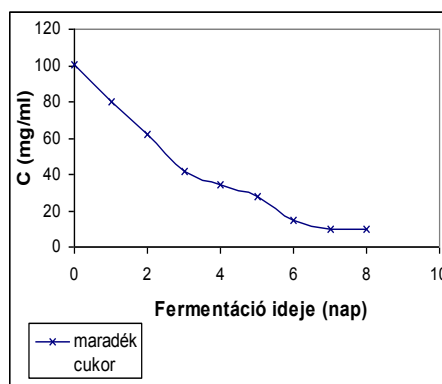
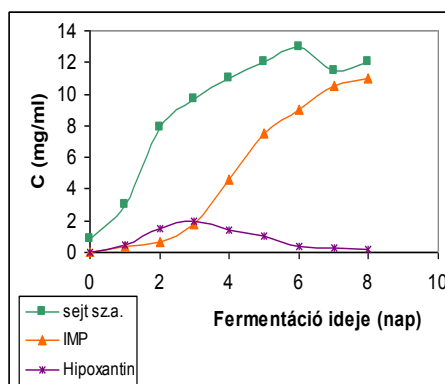
Törzs, mutáns neve	Genetikai azonosító	5'-IMP hozam (g/l)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ade ⁻ Nuc ⁻	0,6
<u>A-1-25</u>	Ade ⁻ 6MP ^r	2,0
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>		
<u>KY 7208</u>	Ade ⁻	5,0
<u>KY 13102</u>	Ade ⁻	12,8
<u>KY 13105</u>	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen	19
<u>KY 13369</u>	Ade ⁻ Mn ²⁺ -ra érzéketlen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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

5'-IMP termelés direkt fermentációval



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

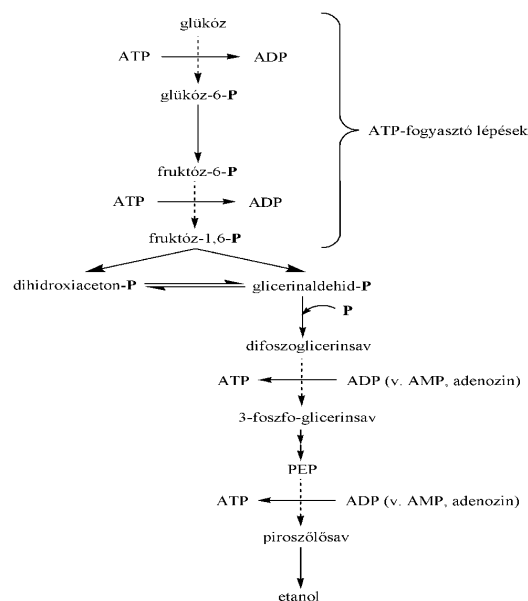
18

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

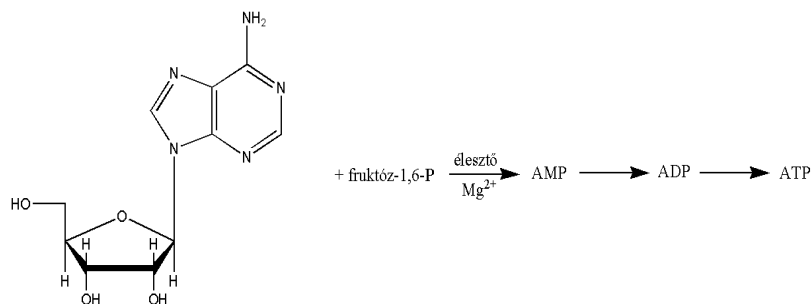


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

ATP gyártás

Az ATP-t fogyasztó lépéseket úgy kerüljük el, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*) a glikolízis már foszforilezett köztitermékét adagoljuk (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 sejtömegeből kinyerhető.

Szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos).

A világpiac körülbelül 5 tonna/év (Kína)

