

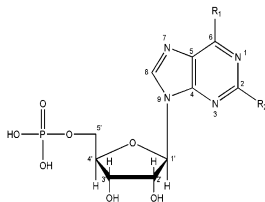
NUKLEOTIDOK



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

Összetevők: étkezési só, zöldségszármazékok 15,5% (sárgarépa, patizsnök, 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.

Gyógyszerek

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

Felhasználás

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

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

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 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

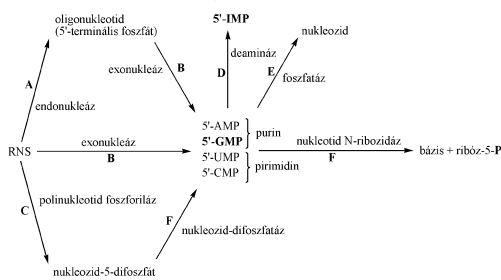


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Enzimes hidrolízis

- enzintermelés, 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.

13

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Nukleotid bioszintézis

14

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

15

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 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.

IMP: 11 mutáció + AMP kis koncentrációban
XMP: 11 és 14 mutáció + AMP és GMP kis koncentrációban

16

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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
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

17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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)

18

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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:
 $-2 \text{ ATP} \rightarrow +4 \text{ ATP}$

19

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ATP gyártás

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

20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ATP gyártás

A felhalmozott ATP az élesztő sejtjűtmegből kinyerhető.

Szívizom-erősítőként is használatos (Atrifos).

A világpiac körülbelül 5 tonna/év (Kína)

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
