

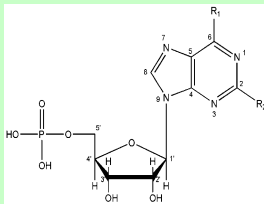
NUKLEOTIDOK



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, patlizsók, 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 0,5 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	ételizésítő
GMP	10000	ételizésítő
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

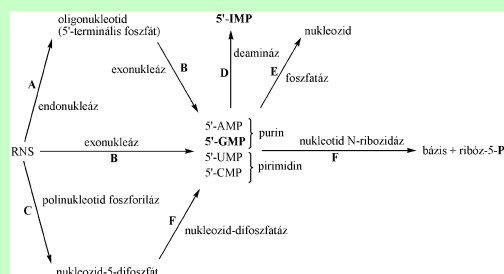


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Enzimes hidrolízis

- 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

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 permeabilis 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 sejtömeg és az előállított nukleotidok mennyiségének fermentáció alatti változásai (*B. ammoniagenes* KY 13102 törzssel végzett 5'-IMP fermentáció)

18

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
