

Antibiotikumok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szekunder metabolizmus

Foszfor szabályzás:

- befolyásolja mikroba növekedési sebességét, annak mértékét, szénhidrát égetésének sebességét
 - bizonyos koncentráció felett negatívan szabályoz, (hozzájárul a gyors C égetéshez)
 - túl nagy koncentrációja a szintetáz enzimek képződését gátolja
- alacsony indulási P koncentráció, csak annyi, hogy a szaporodási szakasz végére elfogyjon.

Enzim indukció:

- A kulczenzimek némelyike indukálható speciális tápanyaggal pl: metionin → cephalosporin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Mik is az antibiotikumok?

Mikroorganizmusok által termelt szekunder metabolitok, melyek más mikroorganizmusokat elpusztítanak vagy gátolják fejlődésüket.

Másodlagos anyagcseretermékek:

Termelésük nem kapcsolódik közvetlenül az energia-termeléshez, a növekedéshez. Csak a tenyésztés késői szakaszában indul meg, általában valamilyen tápanyag limit kialakulásával – „Kinjában termeli”. Hasznosságuk csak közvetett, termelésük sokszor látszólag értelmetlen.

Lehetnek például: antibiotikumok, pigmentek, nyálkaanyagok, tokanyagok, toxinok, stb.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Az antibiotikumok alkalmazási területei

Humán gyógyászat: mikrobiális fertőzések gyógyítására (a hatékony koncentrációban az emberi szervezetet ne károsítsa)

Rákellenes antibiotikumok: citosztatikus hatásúak, a kemoterápia eszközei

Állatgyógyászat

Állattenyésztésben: takarmány-adalékként

Biokémiai, mikrobiológiai kutatásokban (szelektív inhibitorok)

Növénypatogének ellen - mezőgazdaságban (egyre kevésbé)

Élelmiszeriparban – konzerválás (egyre kevésbé)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Szekunder metabolizmus

Szénforrás szabályzás: katabolit represszió – ha bőségesen van hozzáférhető C-forrás, akkor az elsődleges anyagcsere pörög, nincs termékképzés. →

- glükóz limit (adagolás apránként), vagy
- lassan metabolizálható C-forrás, pl. poliszacharidok (keményítő, dextrin), laktóz, növényi olajok.

Nitrogén szabályzás: változó, de a sok N általában a növekedésnek kedvez → elsődleges anyagcsere

- Az ammónium sók gyakran represszálják a termékképzést, inkább szerves N-forrás (szójaliszt, kukoricalekvár)
- fed batch – adagolással alacsony szinten tartani a koncentrációt.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Egy kis történelem

1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemín)

1912 - Salvarsan, szerves arzén származék, vérbaj ellen, (Ehrlich-Hata)

1936 - Szulfonamidok (p-amino-szulfonsav-amidok), Domagk

1929 – penicillin észlelése, Fleming

1944 – a penicillin ipari gyártása, szubmerz tenyésztetben

1944 – 1960 új antibiotikumok felfedezésének korszaka

1950 → félszintetikus származékok

1990 → nincsenek új molekulák, a szabadalmak lejártak → generikus termékké váltak, verseny a piacon.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Antibiotikumok

Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot ezek kémiai módosításával, félszintetikusán, néhányat szintetikusán.

Miért ilyen kevés? - toxicitás
- nem elég hatásos, van nála jobb
- mellékhatások
- rezisztencia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Mikrobák ellenállóképessége

Természetes rezisztencia:

állandó, örökletes tulajdonság, specieszekre, nagyobb rendszertani egységekre jellemző

Szerzett antibiotikum-rezisztencia:

természetes érzékenységi spektrum örökletes megváltozása generációk között – egy fajon belül is lehet egyedenként különböző

Ez is lehet antibiotikum csoportosítási szempont!



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Termelő mikroorganizmusok

Sugárgombák (*Actinomyces*, elsősorban *Streptomyces*) → ~ 65 %

Egyéb baktériumok → ~ 12 %

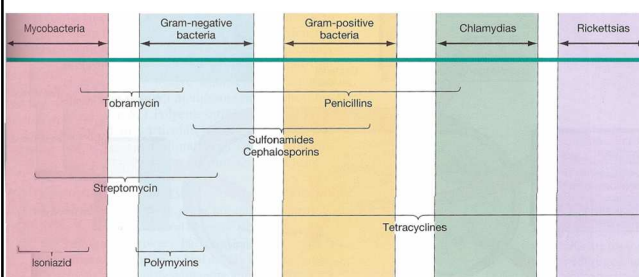
Fonalgombák (elsősorban *Penicillium*, *Cephalosporium* törzsek) → ~ 22 %



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Mikrobák érzékenysége



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Az antibiotikumok csoportosítása

Csoportosítani lehet

- » kémiai szerkezet
- » hatásmechanizmus, támadáspont
- » hatásspektrum
- » bioszintézis út
- » orvosi alkalmazás szerint

Mi most: 1. támadáspont
1.1. kémiai szerkezet szerint tárgyaljuk



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

A szerzett rezisztencia formái

1. A céltárgy (fehérje, receptor) megváltozása
2. A sejtmembrán átjárhatóságának megváltozása (permeabilitási mutáns, nem jut be a molekula)
3. Enzimes inaktiválás (bontás, vagy származékképzés)

A genetikai változás történhet kromoszóma vagy plazmid szinten.

Penicillin típusú rezisztencia: fokozatosan alakul ki, generációról generációra.

Sztreptomycin típusú rezisztencia: ugrásszerűen alakul ki, általában egy plazmid megjelenésével.

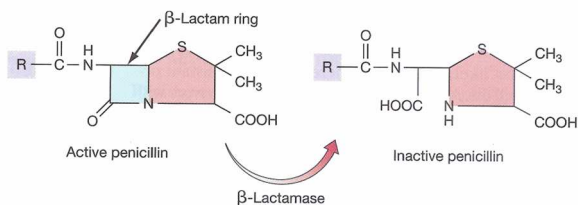


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

A penicillin enzimes inaktiválása

A β -laktamáz enzimek (sokféle van) felnyitják a négytagú gyűrűt.

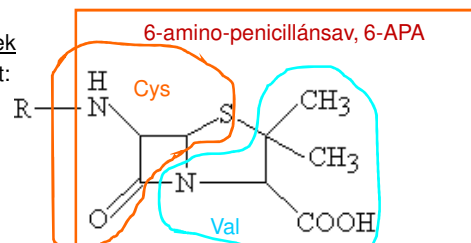


A. SEJTFALSZINTÉZIST GÁTLÓ ANTIBIOTIKUMOK

I. β -LAKTÁM VÁZIS ANTIBIOTIKUMOK (PENICILLIN CSOPORT)

Penicillinek

Szerkezet:



Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:

Sejtfal szintézist gátlók – peptidoglikán szintézist befolyásolják (penicillin, bacitracin, vankomicin)

Fehérjésintézist gátlók – tetraciklinek, sztreptomycin, eritromicin

Sejtmembránra hatók – poliének, ciklopeptidek

DNS függő RNS polimerázra hat – rifampicin

DNS replikációra hatnak - citosztatikumok

A penicillin tulajdonságai

Fizikai: színtelen, vízben jól oldódik, 3 aszimmetria-centrum (= forgatás), nincs UV elnyelése

Kémiai: gyenge sav, alkáli sóit forgalmazzák

BOMLÉKONY! Savak, lúgok és enzimek hatására többféle reakcióban is gyorsan bomlik.

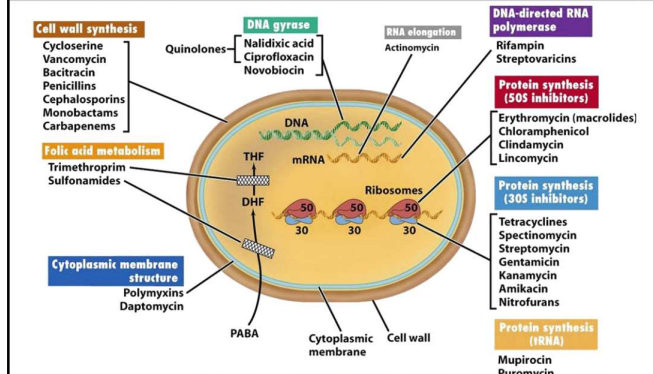
Analitikai reakciók: - jód oldattal titrálható

- hidrazin + Fe ionokkal színreakció

1 biológiai egység: 50 ml-nyi standard összetételű tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását.

1 IU = 0,6 μ g G-penicillin Na sónak felel meg.

Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:

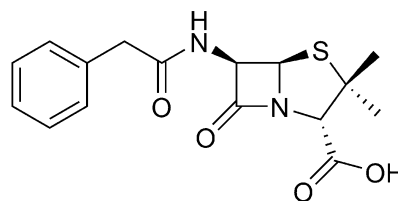


G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc fenilecetsav

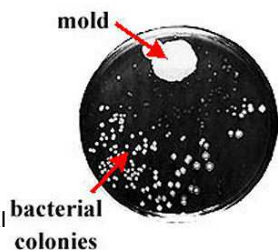
Ez a fermentált alapmolekula, ebből gyártják a többi.

Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhető, csak kapszulában.



A penicillin story

- 1929 A. Fleming, kioltási gyűrű, *Penicillium notatum*
 izolálás, tisztítás, szerkezet-
 felderítés nehezen ment
Fleming's original plate:
 1940 hadianyaggá válik
 1943 klinikai kipróbálás
 felületi tenyészet,
Penicillium chrysogenum
 1944 2,5 tonna
 szubmerz tenyészet,
 mutációs törzsjavítás
 1946 32 tonna
 1952 Magyarországonis, GYOKI
 1980 kb. 30.000 tonna



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Törzsnemesítés

Célok:

- hozamnövelés,
- fermentációs illetve feldolgozási kritériumok szerinti hatékonyság növelés
- az eredeti pigment-termelés megszüntetése

Eszközök:

- a génmanipuláció igen bonyolult (sok gén vesz részt a folyamatban), a titernövekedés túlnyomó részét a régi (65 év – több ezer lépés) mutációs–szelektációs törzsjavítással érték el (~2-3 ppb → ~50.000 ppb)

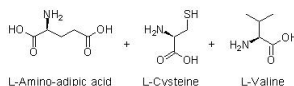


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

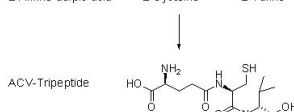
22

A penicillin bioszintézise

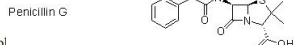
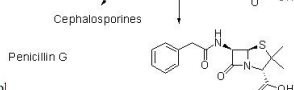
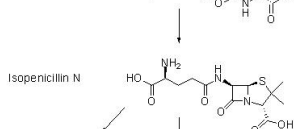
Három aminosavból alakul ki egy tripeptid.



Többszöri gyűrű-átrendeződések után alakul ki a β -laktám váz.



A templát α -amino-adipinsav, a végén lecserélődik egy másik savra, felszabadul és visszakerül a folyamat elejére.



BME Alkalmazott Biotechnol

Fermentáció

Jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van:

Első szakasz (kb. 40 h): a sejtek elszaporítása, jó tápanyag-ellátás intenzív levegőztetés, keverés, elsődleges anyagcsere.

Tápanyagforrások az első szakaszban:

- szénforrások: néhány % cukor (glükóz, melasz), ami a szaporítás végére elfogy
- nitrogén: ebben a szakaszban még lehet NH_4 sók formájában, de jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

A penicillin gyártás fejlesztése

Fermentációs úton, a szintézis nem gazdaságos.
 A gyártás fejlesztése két fő irányban folyt:

- | | |
|------------------------|---|
| Törzsmunka (biológia): | Technológia (mérnöki): |
| – törzsolálás | – Felületi/szubmerz |
| – indukált mutáció | – Prekursorok (4-8 x) |
| – szelekció | – tápoldatoptimalás |
| – törzsfenntartás | – anyagcsereszabályozás (cukorlimit, C/N, Fe ion) |
| | – Levegőztetés, reaktor |
| | – Szabályozások (pH, t) |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Fermentáció

Második szakasz, termelő fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, kikényszerített másodlagos anyagcsere.

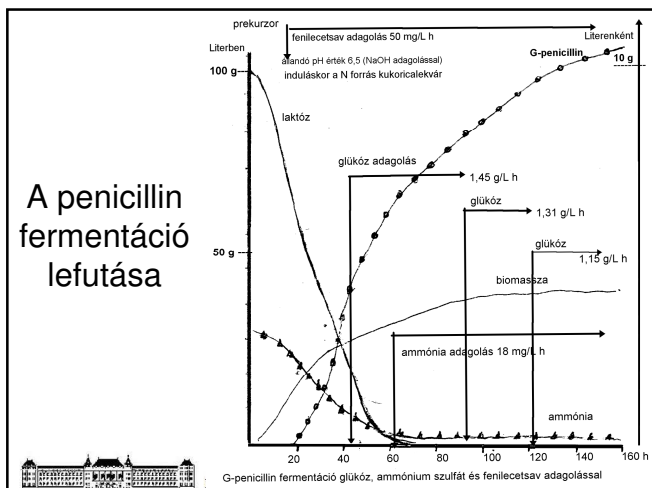
Tápanyagellátás a második szakaszban:

- Szénforrás: limitáció (régén: nehezen bontható vegyületek (laktóz, keményítő), ma glükóz adagolás apránként, vagy program szerint, vagy az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves N-vegyületek, fehérje formájában: szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt, emellett $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → apránként adagolva, kis koncentrációt tartanak – az N és S beépül a termékbe.
- Foszfát: jelenlétében nem megy a másodlagos anyagcsere, ezért elfogyása után nem adagolnak többet
- Prekursor: fenil-ecetsav, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 2-4 g/l sávban tartják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

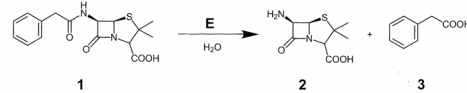


Penicillin aciláz/amidáz

A félszintetikus penicillinek előállítása a fermentált G-penicillin oldalláncának lecserélésével történik.

1. Hidrolízis

G penicillin \rightarrow 6-amino-penicillánsav (6-APA) + fenilecetsav



1 = penicillin-G
2 = 6-amino penicillanic acid (6-APA)
3 = phenylacetic acid

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Feldolgozás

Extracelluláris termék, csak ~1% található a micéliumban

Kulcslépés: **EXTRAKCIÓ**

A penicillin gyenge sav, a disszociált formája jól oldódik vízben, a nem-disszociált viszont szerves oldószerben. Az extrakcióhoz vissza kell szorítani a disszociációt (erősebb savval, pl. kénsav) – de: savas közegben bomlik!

Megoldás: - hűtés, - rövid kontaktidő (kis méretű, folytonos reaktorban, aztán gyorsan szétválasztani szeparátorral)

Észter típusú oldószerek (BuOAc, amilacetát)

Reextrakció semleges vagy lúgos vizes fázissal

Kristályosítás K- vagy Na-só formájában

Pigmentek eltávolítása aktív szénnel



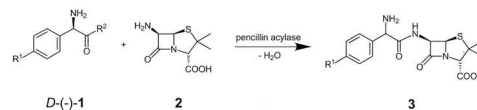
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Penicillin aciláz/amidáz

2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése

Karbonsav származék + 6-APA \rightarrow félszintetikus penicillin



1a = phenylglycineamide ($R^1=H, R^2=NH_2$) = PGA
1b = phenylglycinemethyl ester ($R^1=H, R^2=OMe$) = PGM
1c = hydroxyphenylglycineamide ($R^1=OH, R^2=NH_2$) = HPGA
1d = hydroxyphenylglycinemethyl ester ($R^1=OH, R^2=OMe$) = HPGM
2 = 6-APA
3a = ampicillin ($R^1=H$)
3b = amoxicillin ($R^1=OH$)

Ugyanazzal az enzimmel meg lehet csinálni a két ellentétes reakciót, de itt sav-származékot kell adni (pH, ionizálás!)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Félszintetikus penicillinek

Előállítás: oldallánc cserével 6-APAn keresztül

A 6-APA előállítása: - G penicillin enzimes bontásával

- direkt fermentációval
- kémiai bontás

A 6-APA is nagyon bomlékony, tárolás közben polimerizál, és reagál a légköri CO_2 -dal is.

Acilezés: - enzimesen
- kémiailag

Enzimes folyamatok: ld. a penicillin-amidáz/aciláz -nál



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Penicillin aciláz/amidáz

Termelő törzsek:

- Type I: penész típusú, pH ~10, t ~50 °C, inkább V, mint G
- Type II: baktérium típusú, pH ~8, t ~40 °C. Sokféle van, de az iparban főleg *E. coli* mutánsok és manipulált törzsek.

Fermentáció:

Indukció fenil-ecetsav adagolással (5X titernövekedés)

Glükóz: katabolit represszió miatt kis koncentrációban

O_2 : aerob, de nem túl erős levegőztetés

Feldolgozás: - nyugvósejtes tenyészet,
- immobilizált enzim



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Penicillin hidrolízis

A reakció tulajdonságai: erős S és P inhibíció, a szakaszos nem jó. Kiszámolták, hogy a töltött oszlop a legjobb. De:
 A felszabaduló fenilecetsav miatt a pH csökken, ettől a 6-APA bomlik. pH-szabályozás kellene, de az oszlopreaktorban nem megy.

Toyo-Ozo eljárás:
 recirkulációs, pH szabályozás a tartályban, ciklusidő: 30 óra, produktivitás: 33 kg/m³h konverzió: 86%

31

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Félszintetikus penicillinek

Ampicillin
(broad spectrum, acid resistant)

Carbenicillin
(broad spectrum)

Amoxicillin
(broad spectrum)

34

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Félszintetikus penicillinek

Szerkezet - tulajdonságok összefüggése:

savtűrés: elektronszívó csoportokkal lehet védeni a savamid kötést.

penicillináz rezisztencia: sztérikus védőcsoportok

hatásspektrum változtatás: -NH₂, -COOH, észter csoportok

32

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Hatásmód

- csak a szaporodókat pusztítja el (nyugvósejteket nem, → szelektív)
- a falszintézist gátolja (abnormális alakok, protoplasztok)

A hatásmechanizmus megértéséhez ismételjük át a bakteriális sejtfal szerkezetét és bioszintézisét.

N-acetil-murámsav, AM

N-acetil-glükózamin, AGA

35

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins

Penicillin G
(Gram-positive cocci)

Penicillin V
(acid resistant)

33

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A Gram-pozitív sejtfal szerkezete

lizozim ↓

← AM—AGA—AM—AGA—AM—AGA—AM → alaplánc

|

L-Ala

|

D-Glu

|

Gly—Gly—Gly—Gly—Gly—L-Lys—D-Ala—D-Ala

↓ térhálósodás

36

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A Gram-pozítív sejtfal térhálósítása

◻ N-acetylglucosamine
● D-alanine
● L-amino acid
● Glycine

37

A penicillin orvosi tulajdonságai

Hatásspektrum: elsősorban Gram + ellen, a modern fél-szintetikus származékoké szélesebb
 Rezisztencia: fokozatosan, sok generáció után jelenik meg (penicillin típusú rezisztencia)
 Bevitel: a savérzékenyek (pl. G) szájon át nem adhatók, a többi bárhogyan
 Adagolás: pl.: Maripen: 500.000 IU/tabletta 3x /nap
 Penicillin érzékenység: régen a szennyezések miatt, ma valódi allergia (haptének)

40

A penicillin a D-Ala-D-Ala láncvég szerkezet-analóga

Irreverzibilisen kapcsolódik a transzpeptidázhoz \rightarrow a falszintézis leáll \rightarrow ionkiáramlás

38



A penicillin hatásmechanizmusa

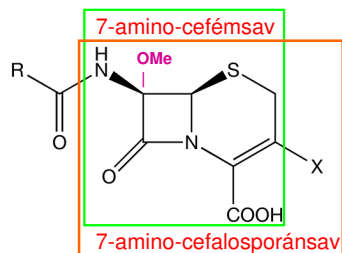
39

További β -laktám vázak

BME Alkal

Cefalosporinok

Brotzu (1948),
Cephalosporium acremonium



Cephamicinek: 7-OMe

Odalláncok:

R = α -amino-adipinsav, X=CH₂OAc - Cephalosporin C

R = fenil-glicin, X=CH₂OAc - Cephalexin

4 generációban közel ötven félszintetikus molekula



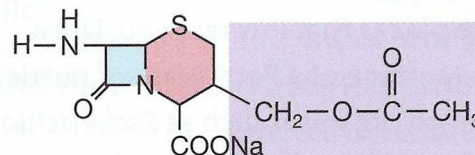
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

A cefalosporinok előállítása

Az odallánc-csere kémiaailag is megoldható (stabilabb az alpmolekula), a köztitermék a 7-ACS

7-ACS-ból a C-7 és C-3-as szénen történő származékképzéssel sokféle félszintetikus termék állítható elő.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

A cefalosporinok

Előállítása:

- *C. acremoniummal* Cef-C fermentáció, ebből odallánc cserével félszintetikus származékok
- V-penicillinből 3 kémiai lépéssel ki lehet tágítani a gyűrűt cefémsavvá, aztán odallánc csere

Tulajdonságai:

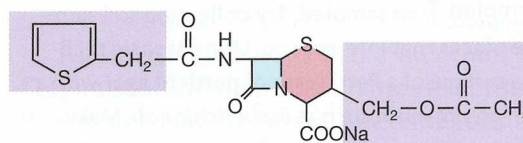
- Stabilitásuk jobb, mint a penicillineké
- Hatásspektrumuk szélesebb
- Rezisztensek sok penicillinázra (de vannak más β -ta-laktamázok, amelyek specifikusan ezt bontják)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

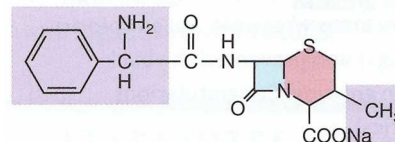
44

Első generációs cefalosporinok



Pl.: Cephalothin

Cephalexin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

A cefalosporinok előállítása

Bioszintézis: a penicillinéből ágazik el – α AAA, Cys, Val
Anyagcsere-szabályozás:

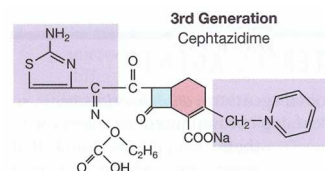
- katabolit-represszió: nehezen bontható cukrok, illetve szabályozott glükóz adagolás
- N- és P-szint: alacsonyan tartani, szabályozni, vagy MgO adagolás \rightarrow MgNH₄PO₄, rosszul oldódó só
- Cys prekursor: lizálja a sejteket, ezért inkább tioszulfát, erre rezisztens mutánsok
- α AAA prekursor: drága, inkább Lys, vagy kadáverin
- amino-donorok: 1,3-diamino propán, dimetil-formamid



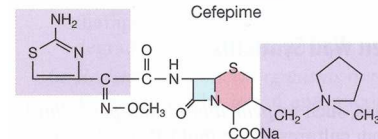
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

További példák további generációkból



4th Generation
Cefepime



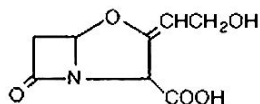
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

Klavulánsav

Nincs antibiotikus aktivitása!

Penicillinekkel együtt adagolják, mert szerkezetanalógja penicillineknek \rightarrow kompetitív inhibícióval gátolja a bontó enzimeket (penicillináz, béta-laktamáz) \rightarrow rezisztens törzsek elpusztítására is alkalmas.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

49