

Mik is az antibiotikumok?

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

Másodlagos anyagcsere-termékek:

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
2

Szekunder metabolizmus

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

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

Nitrogén szabályozás: 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

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 kulcsenzimek némelyike indukálható speciális tápanyaggal pl: metionin → cephalosporin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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

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 tenyésztésben

1944 – 1960 új antibiotikumok felfedezésének korszaka

1950 → félszintetikus származékok

1990 → nincsenek új molekulák, a szabadalmak lejártak → generikus terméké 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

Az antibiotikumok csoportosítása

Csoportosítani lehet

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

Mi most: csak a β -laktámokat tárgyaljuk, azaz egy kémiai szerkezetet



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Mikrobák ellenállóképessége

Természetes rezisztencia:

állandó, örökletes tulajdonság, specieszekre, nagyobb rendszertani egységekre jellemző

Szerzett antibiotikum-rezisztencia:

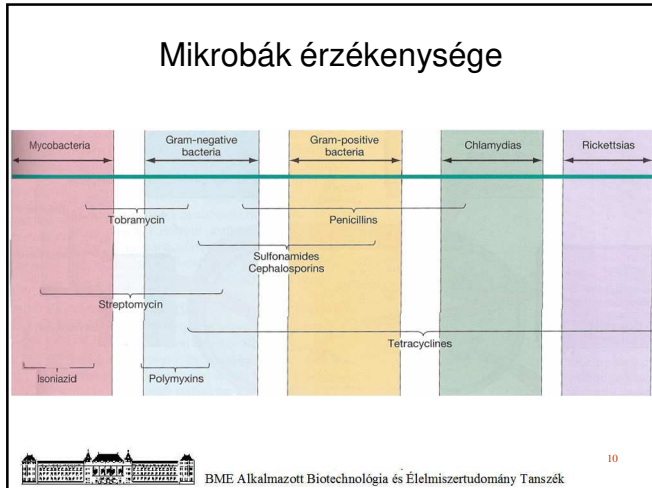
természetes érzékenységi spektrum örökletes megváltozása generációk között – egy fajon belül is lehet egyedenként különböző

Ez is lehet antibiotikum csoportosítási szempont!



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 11

A penicillin enzimes inaktiválása

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:

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

Fehérjésintézist gátlók – tetraciklinek, sztreptomycin, eritromicin

Sejtmembránra hatók – poliének, ciklopeptidek

DNS függő RNS polimerázra hat – rifampicin

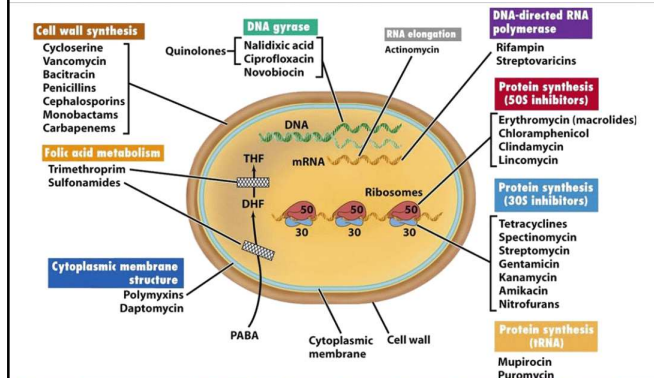
DNS replikációra hatnak - citosztatikumok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

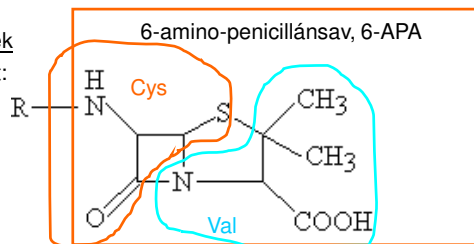
Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:



β -LAKTÁM VÁZAS ANTIBIOTIKUMOK (PENICILLIN CSOPORT)

Penicillinek

Szerkezet:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

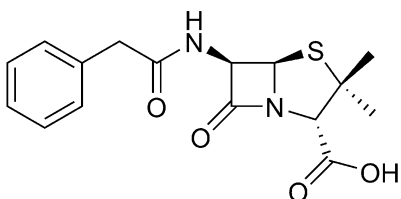
16

G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc fenilecetsav

Ez a fermentált alapmolekula, ebből gyártják a többit.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

A penicillin story

1929 A. Fleming, kioltási gyűrű, *Penicillium notatum*
Izolálás, tisztítás, szerkezet-
felderítés nehezen ment **Fleming's original plate:**

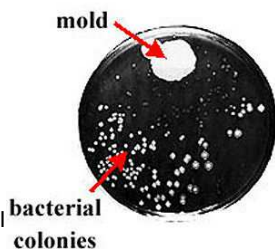
1940 hadianyaggá válik
1943 klinikai kipróbálás
felületi tenyészet,
Penicillium chrysogenum

1944 2,5 tonna
szubmerz tenyészet,
mutációs törzsjavítás

1946 32 tonna

1952 Magyarországon is, GYOKI

1980 kb. 30.000 tonna



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

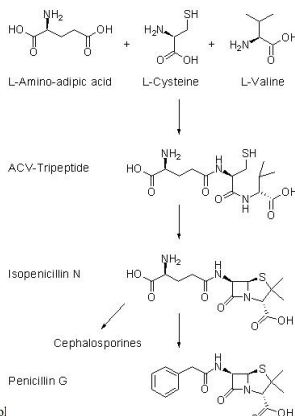
18

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 Biotechnológia

A penicillin gyártás fejlesztése

Fermentációs úton, a szintézis nem gazdaságos.

A gyártás fejlesztése két fő irányban folyt:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

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), ezért a titernövekedés túlnyomó részét a régi (65 év – több ezer lépés) mutációs-szelekciós törzsjavítással érték el (~2-3 ppb → ~50.000 ppb)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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: bőséges mennyiségben, szerves vagy szervetlen formában, 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

22

Fermentáció

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

Tápanyagellátás a második szakaszban:

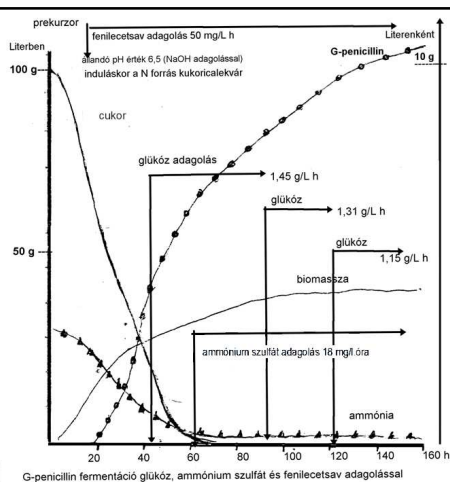
- szénforrás: limitáció (régén: nehezen bontható vegyületek (laktóz, keményítő), ma glükóz adagolás apránként, vagy program szerint, vagy az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves N-vegyületek, fehérje formájában: szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt, emellett $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow$ 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

23

A penicillin fermentáció lefutása



G-penicillin fermentáció glükóz, ammónium szulfát és fenil-ecetsav adagolással

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

25

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 CO₂-dal is.

- Acilezés:
- enzimesen
 - kémiailag



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

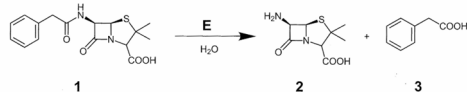
26

Penicillin aciláz/amidáz

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

1. Hidrolízis

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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Penicillin aciláz/amidáz

2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése
 Karbonsav származék + 6-APA → félszintetikus penicillin

D-(-)-1
2
3

1a = phenylglycineamide (R ¹ =H, R ² =NH ₂) = PGA 1b = phenylglycinmethyl ester (R ¹ =H, R ² =OMe) = PGM 1c = hydroxyphenylglycineamide (R ¹ =OH, R ² =NH ₂) = HPGA 1d = hydroxyphenylglycinmethyl 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

28

Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins

Penicillin G
(Gram-positive cocci)

Penicillin V
(acid resistant)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Félszintetikus penicillinek

Ampicillin
(broad spectrum, acid resistant)

Carbenicillin
(broad spectrum)

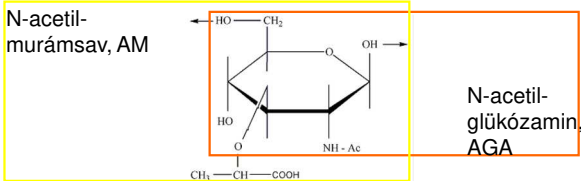
Amoxicillin
(broad spectrum)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Hatásmód

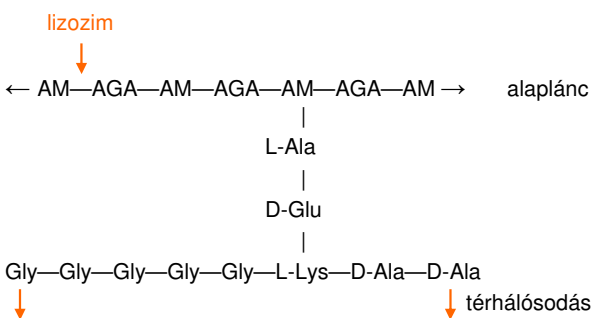
- csak a szaporodókat pusztítja el (nyugvósejteket nem, \rightarrow szelekció)
 - a falszintézist gátolja (abnormális alakok, protoplasztok)
- A hatásmechanizmus megértéséhez ismételjük át a Gram-pozitív bakteriális sejtfal szerkezetét és bioszintézisét.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

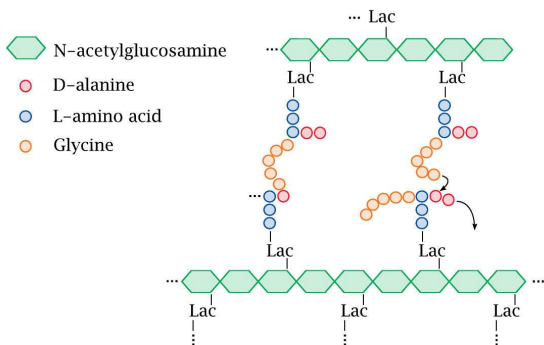
A Gram-pozitív sejtfal szerkezete



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

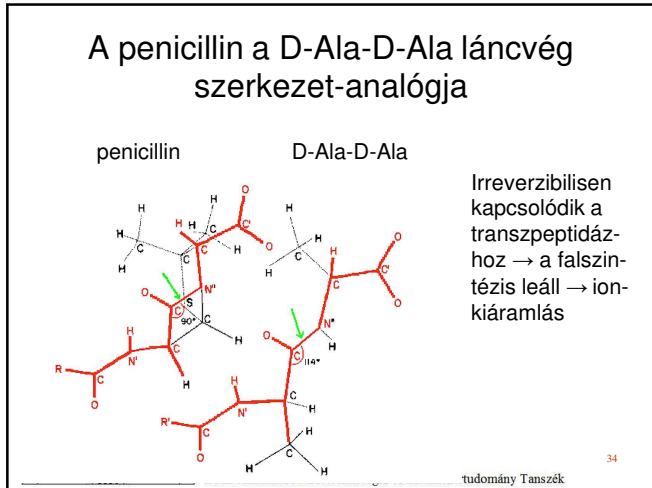
32

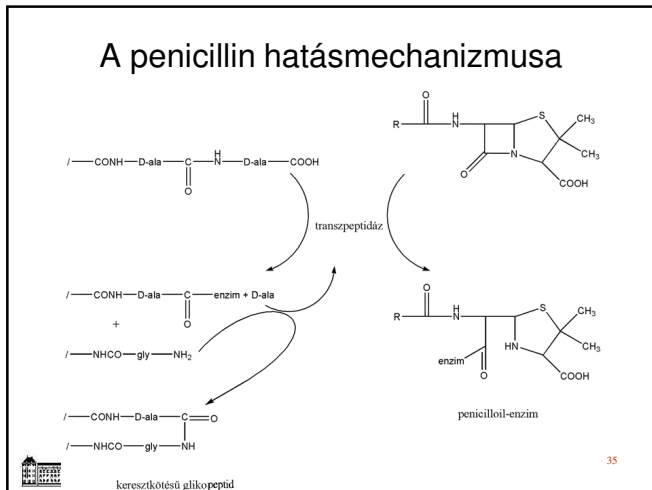
A Gram-pozitív sejtfal térhálósítása

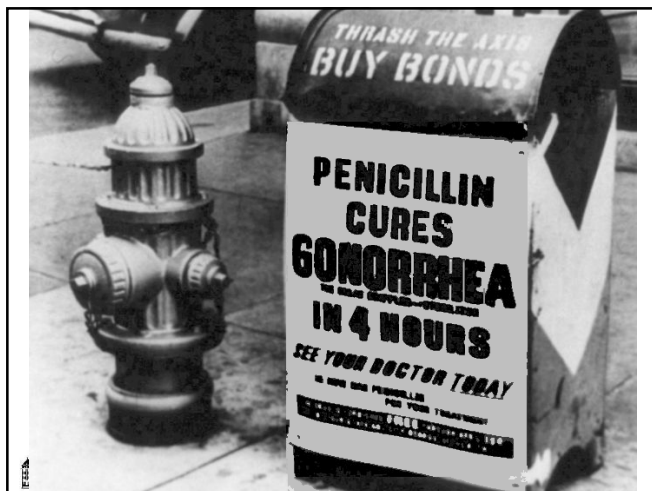


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

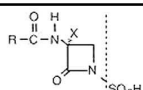
33



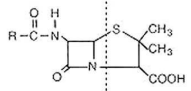




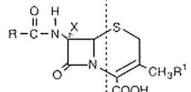
További β -laktám vázak



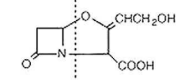
Monobaktám



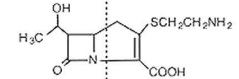
Penicillin



Cefalosporin



Klavulánsav



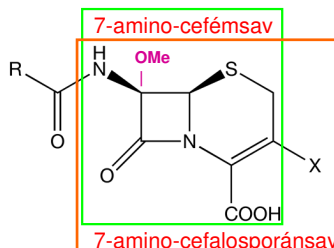
Tienamicin

BME Alka

Cefalosporinok

Brotzu (1948),
Cephalosporium acremonium

Cephamicinek: 7-OMe



Oldalláncok:
 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 38
