

## 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 kulcsenzimek 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 – „kínjában 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 szabályozás: 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 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

## 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



## 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!



## Termelő mikroorganizmusok

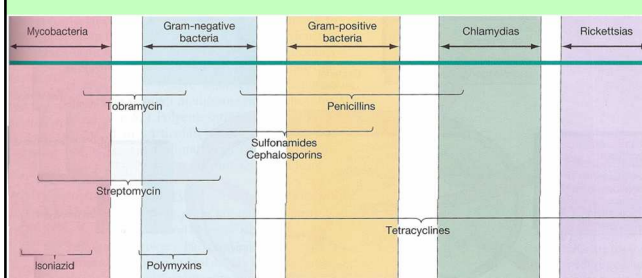
Sugárgombák (*Actinomyces*, elsősorban *Streptomyces*) → ~ 65 %

Egyéb baktériumok → ~ 12 %

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



## Mikrobák érzékenysége



## 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



## 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.

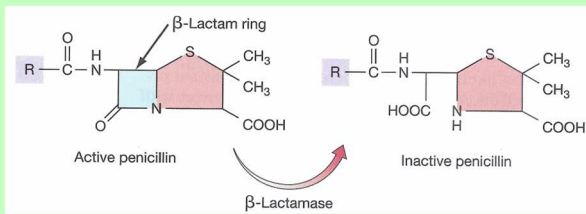
Penicillin típusú rezisztencia: fokozatosan alakul ki, generációról generációra.

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



### A penicillin enzimes inaktiválása

A  $\beta$ -laktamáz enzimek (sokféle van) felnyitják a négytagú gyűrűt.

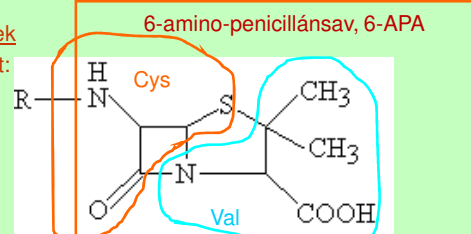


### A. SEJTFALSZINTÉZIST GÁTLÓ ANTIBIOTIKUMOK

#### I. $\beta$ -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

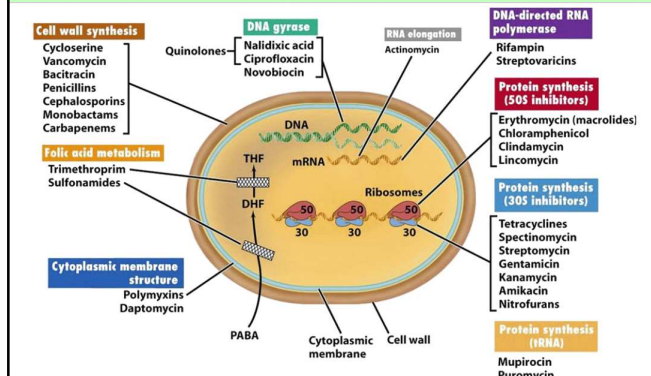
- hidrazin + Fe ionokkal színreakció

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

1 IU = 0,6  $\mu$ g G-penicillin Na sónak felel meg.



### Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:

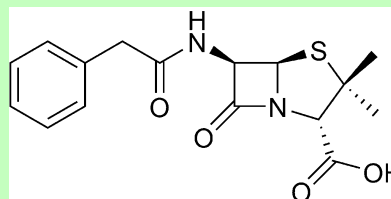


### G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc fenilecetsav

Ez a fermentált alpmolekula, ebből gyártják a többi.

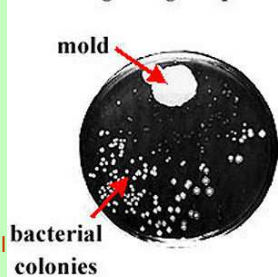
Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhető, csak kapszulában.



## A penicillin story

- 1929 A. Fleming, kioltási gyűrű, *Penicillium notatum*  
 izolálás, tisztítás, szerkezet-  
 felderítés nehezen ment  
 1940 hadianyagává 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

Fleming's original plate:



19

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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)

22

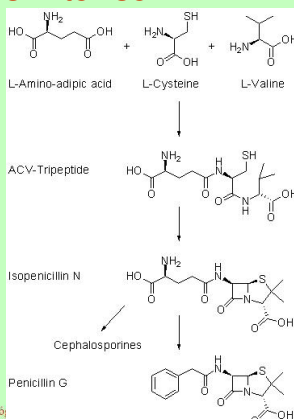
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## A penicillin bioszintézise

Három aminosavból alakul ki egy tripeptid.

Többszöri gyűrű-átrendeződések után alakul ki a  $\beta$ -laktám váz.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

## 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  $\text{NH}_4$  sók formájában, de jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére

23

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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            | – tápoldatoptimalálás                             |
| – törzsfenntartás      | – anyagcsereszabályozás (cukorlimit, C/N, Fe ion) |
|                        | – Levegőztetés, reaktor                           |
|                        | – Szabályozások (pH, t)                           |

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Fermentáció

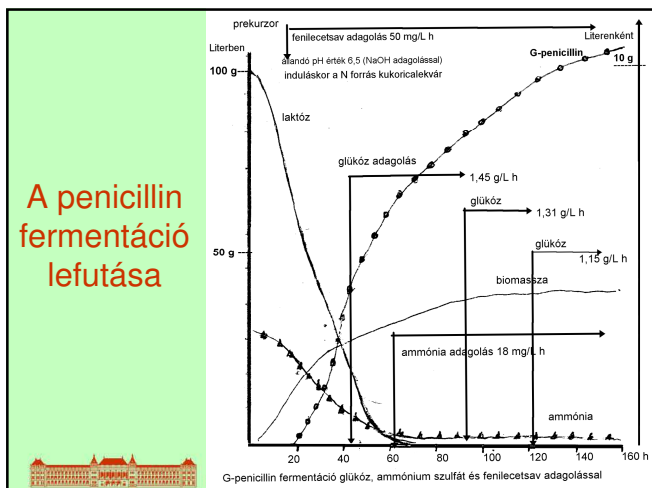
Második szakasz, termelő fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, kikényszerített másodlagos anyagcsere.

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.

24

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

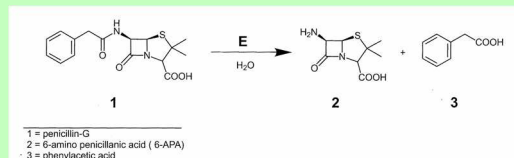


## Penicillin aciláz/amidáz

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

### 1. Hidrolízis

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



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)

Észtér típusú oldószer (BuOAc, amilacetát)

Reextrakció semleges vagy lúgos vizes fázissal

Kristályosítás K- vagy Na-só formájában

Pigmentek eltávolítása aktív szénnel

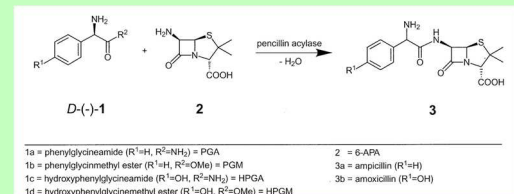
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

## Penicillin aciláz/amidáz

### 2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése

Karbonsav származék + 6-APA  $\rightarrow$  félszintetikus penicillin



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 előállítására: - 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,

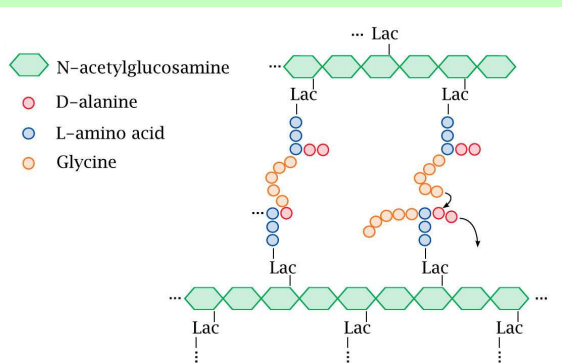
- immobilizált enzim

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30



### A Gram-pozítív sejtfal térhálósítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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)



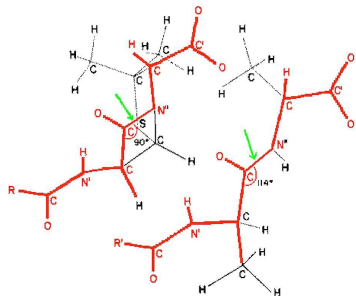
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

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

penicillin

D-Ala-D-Ala



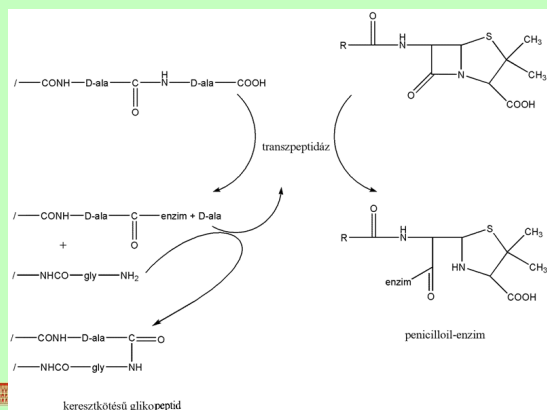
Irreverzibilisen kapcsolódik a transzpeptidázhoz  $\rightarrow$  a falszintézis leáll  $\rightarrow$  ionkiáramlás

omány Tanszék

38



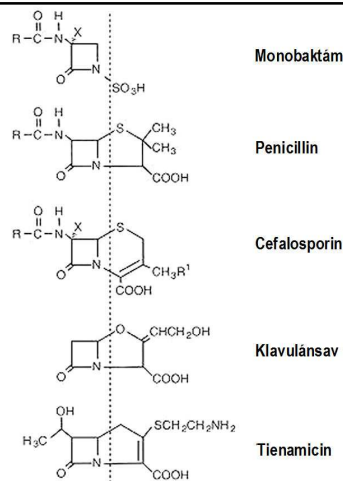
### A penicillin hatásmechanizmusa



keresztítései glikopeptid

39

### További $\beta$ -laktám vázak

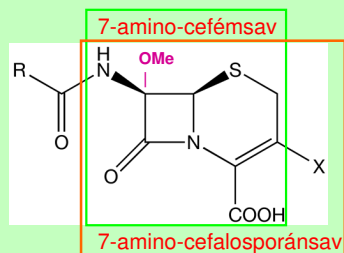


BME Alkal

## Cefalosporinok

Brotzu (1948),  
*Cephalosporium acremonium*

Cephamicinek: 7-OMe



Oldalláncok:

R =  $\alpha$ -amino-adipinsav, X=CH<sub>2</sub>OAc - Cephalosporin C

R = fenil-glicin, X=CH<sub>2</sub>OAc - Cephalixin

4 generációban közel ötven félszintetikus molekula



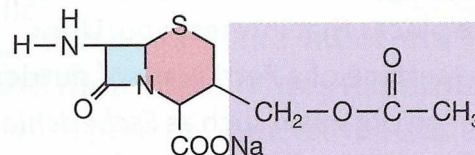
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

## A cefalosporinok előállítása

Az oldallánc-csere kémiai is megoldható (stabilabb az alampolekula), 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 oldallánc cserével félszintetikus származékok
- V-penicillinből 3 kémiai lépéssel ki lehet tágítani a gyűrűt cefémsavvá, aztán oldallánc csere

Tulajdonságai:

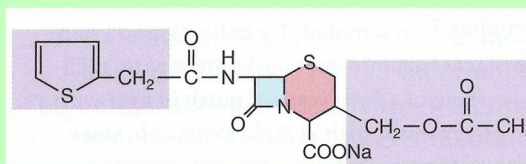
- Stabilitásuk jobb, mint a penicillineké
- Hatásspektrumuk szélesebb
- Rezisztensek sok penicillinázra (de vannak más beta-laktamázok, amelyek specifikusan ezt bontják)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

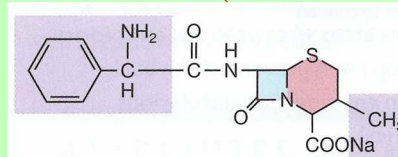
44

## Első generációs cefalosporinok



Pl.: Cephalothin

Cephalexin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

## A cefalosporinok előállítása

Bioszintézis: a penicillinéből ágazik el –  $\alpha$ AAA, Cys, Val  
Anyagcsere-szabályozás:

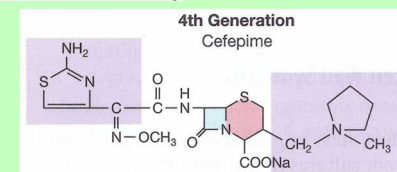
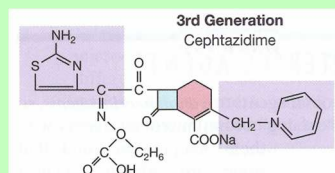
- katabolit-represszió: nehezen bontható cukrok, illetve szabályozott glükóz adagolás
- N- és P-szint: alacsonyan tartani, szabályozni, vagy MgO adagolás  $\rightarrow$  MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>, rosszul oldódó só
- Cys prekursor: lizálja a sejteket, ezért inkább tioszulfát, erre rezisztens mutánsok
- $\alpha$ 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



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.

