

Antibiotikumok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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, 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 \rightarrow 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 szabályozás:

- 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
- \rightarrow alacsony indulási P koncentráció, csak annyi, hogy a szaporodási szakasz végére elfogyjon.

Enzim indukció:

- A kulcsenzimek némelyike indukálható speciális tápanyaggal pl: metionin \rightarrow 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 \leftrightarrow 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 \rightarrow félszintetikus származékok

1990 \rightarrow nincsenek új molekulák, a szabadalmak lejártak \rightarrow 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, félszintetikusan, néhányat szintetikusan.

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



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



Mikrobák ellenállóképessége

Természetes rezisztencia:

állandó, örökletes tulajdonság, specieszekre, nagyobb rendszertani egységekre jellemző

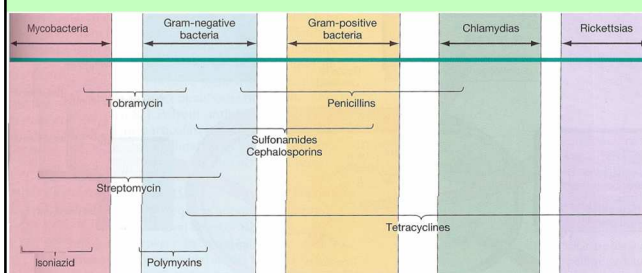
Szerzett antibiotikum-rezisztencia:

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

Ez is lehet antibiotikum csoportosítási szempont!



Mikrobák érzékenysége



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.

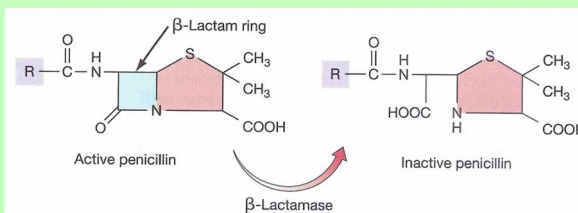
Penicillin típusú rezisztencia: fokozatosan alakul ki, generációról generációra.

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



A penicillin enzimes inaktiválása

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



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

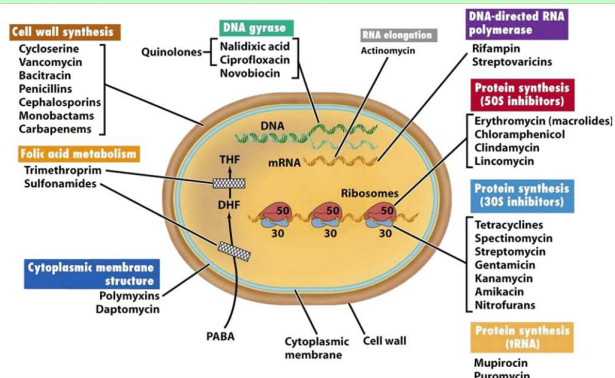
DNS replikációra hatnak - citosztatikumok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

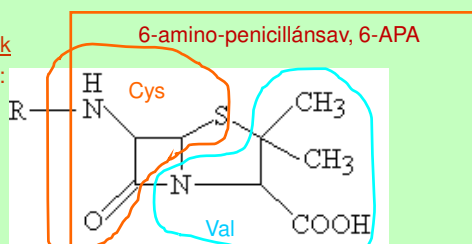
13

Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:

 β -LAKTÁM VÁZIS 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: - jó 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

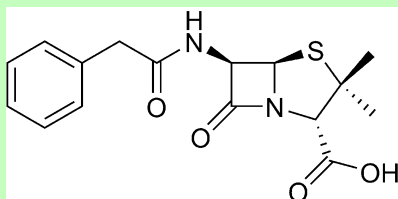
16

G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc fenilecetsav

Ez a fermentált alpmolekula, 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

1940 hadianyaggá válik

1943 klinikai kipróbálás

felületi tenyészet,

Penicillium chrysogenum

1944 2,5 tonna

szubmerz tenyészet,

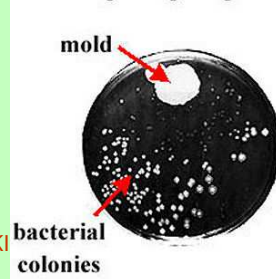
mutációs törzsjavítás

1946 32 tonna

1952 Magyarországon is, GYOKI

1980 kb. 30.000 tonna

Fleming's original plate:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

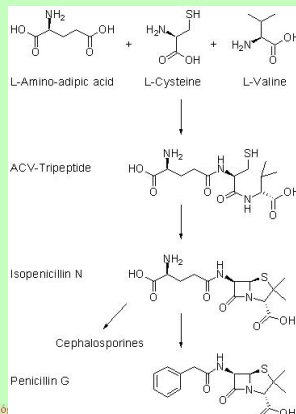
18

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): |
| – törzsiszolálás | – Felületi/szubmerz |
| – indukált mutáció | – Prekurzorok (4-8 x) |
| – szelekció | – tápdatoptimalás |
| – törzsfenntartás | – anyagcsereszabályozás (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 tápanyagellátás, 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:

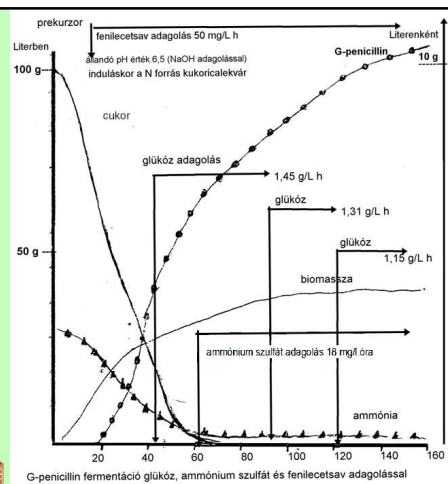
- szénforrás: limitáció (régén: nehezen bontható vegyületek (laktóz, keményítő), ma glükóz adagolás apránként, vagy program szerint, vagy az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves N-vegyületek, fehérje formájában: szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt, emellett $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$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

Reextrakció semleges vagy lúgos vizes fázissal

Kristályosítás K- vagy Na-só formájában

Pigmentek eltávolítása aktív szénnel



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

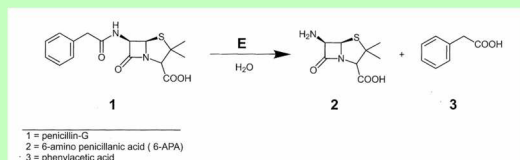


Penicillin aciláz/amidáz

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

1. Hidrolízis

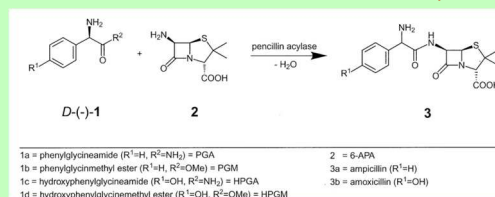
G penicillin \rightarrow 6-amino-penicillánsav (6-APA) + fenilecetsav



Penicillin aciláz/amidáz

2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése

Karbonsav származék + 6-APA \rightarrow félszintetikus penicillin



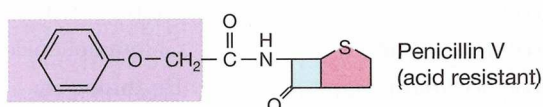
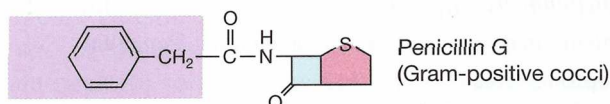
Ugyanazzal az enzimmal meg lehet csinálni a két ellentétes reakciót, de itt sav-származékot kell adni (pH, ionizálás!)



Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins



Félszintetikus penicillinek

