

# 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 – „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. →

- 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, kukoricalékvár)
- 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
- 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 kemo-  
terápia eszközei

Állatgyógyászat

Állattenyésztésben: takarmány-adalékként

Biokémiai, mikrobiológiai kutatásokban (szelektív inhibito-  
rok)

Növénypatogének ellen - mezőgazdaságban (egyre ke-  
vésbé)

Élelmiszeriparban – konzerválás (egyre kevésbé)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## Egy kis történelem

1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemin)

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 tenyészetben

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

## Termelő mikroorganizmusok

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

Egyéb baktériumok → ~ 12 %

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

## 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

## Mikrobák ellenállóképessége

Természetes rezisztencia:

állandó, örökletes tulajdonság, specieszekre, nagyobb rendszertani egységekre jellemző

Szerzett antibiotikum-rezisztencia:

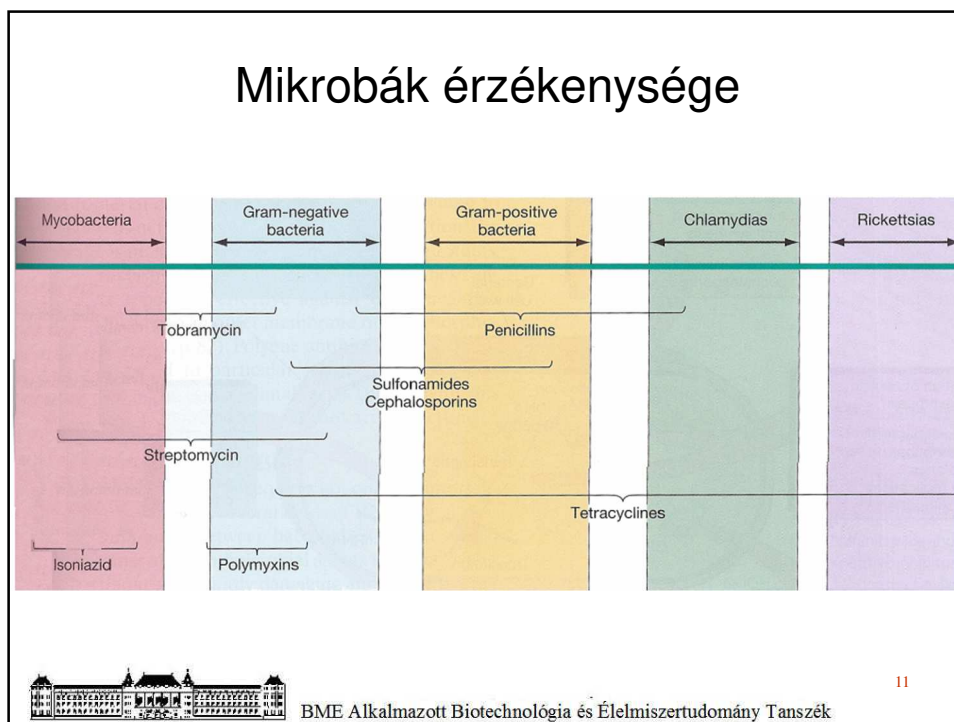
természetes érzékenységi spektrum örökletes megváltozása generációk között – egy fajon belül is lehet egyedenként különböző

Ez is lehet antibiotikum csoportosítási szempont!



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10




## 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.

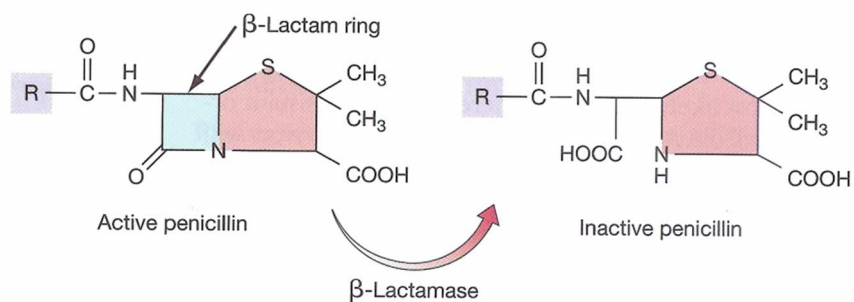
Penicillin típusú rezisztencia: fokozatosan alakul ki, generációról generációra.

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


 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
 12

## A penicillin enzimes inaktiválása

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## 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

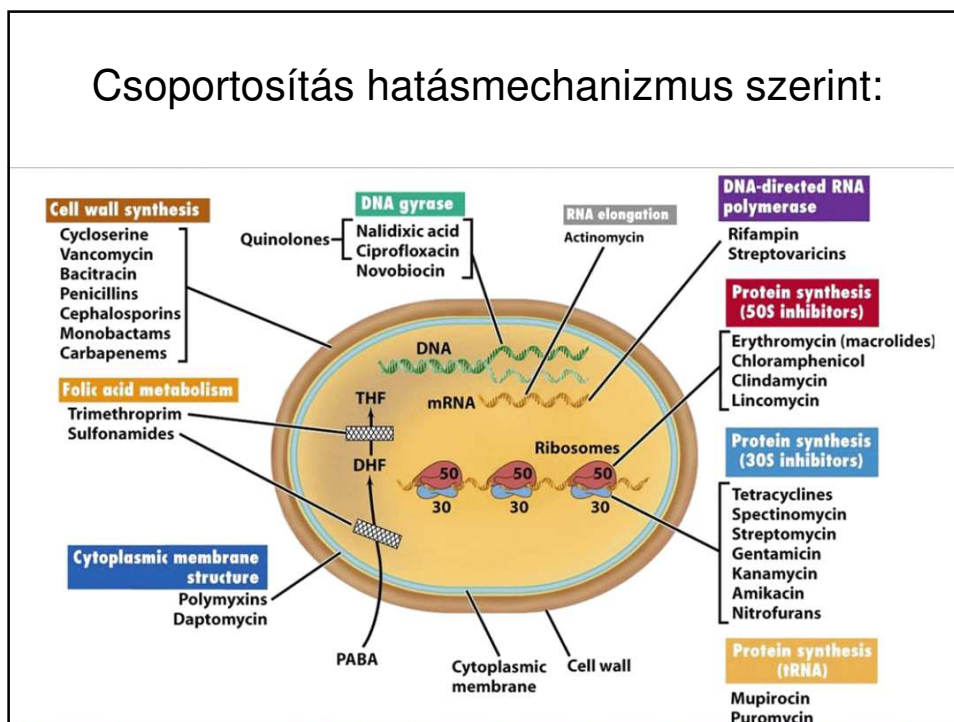


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14



## Csoportosítás hatásmechanizmus szerint:

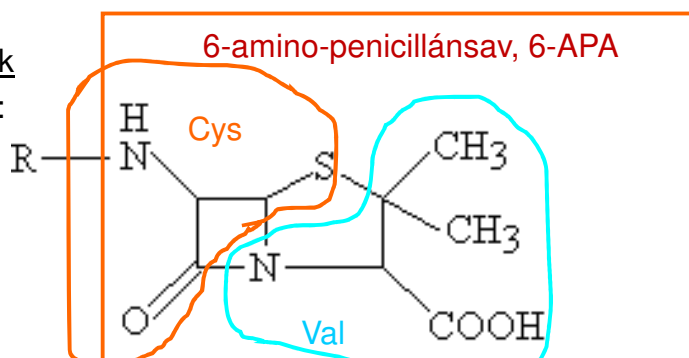


## A. SEJTFALSZINTÉZIST GÁTLO ANTIBIOTIKUMOK

### I. $\beta$ -LAKTÁM VÁZAS ANTIBIOTIKUMOK (PENICILLIN CSOPORT)

Penicillinek

Szerkezet:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16



## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

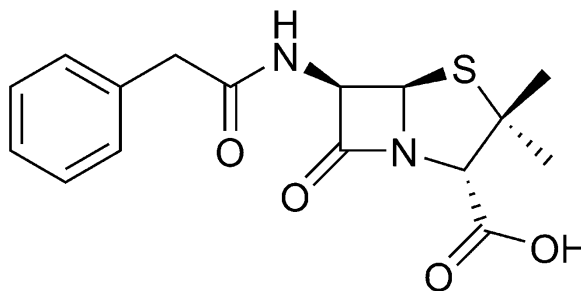
17

## 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.



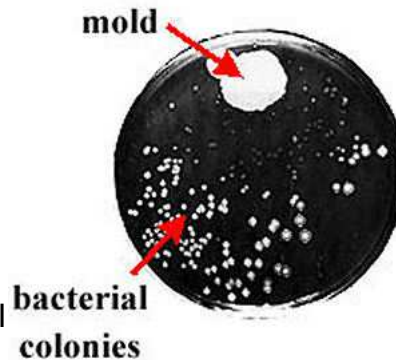
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

## 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:*

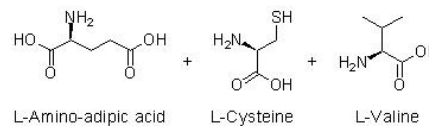


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

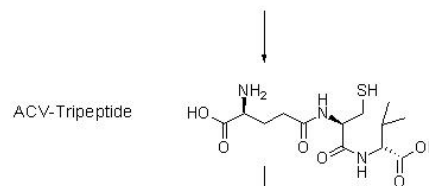
19

## A penicillin bioszintézise

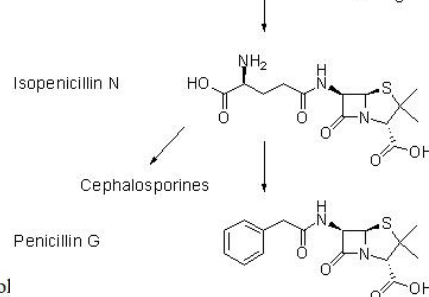
Három aminosavból alakul ki egy tripeptid.



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 Biotechnol

## A penicillin gyártás fejlesztése

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

- |   |  |
|---|--|
| <p>Törzsmunka (biológia):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– törzsizolálás</li> <li>– indukált mutáció</li> <li>– szelekció</li> <li>– törzsfenntartás</li> </ul> | <p>Technológia (mérnöki):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Felületi/szubmerz</li> <li>– Prekursorok (4-8 x)</li> <li>– tápoldatoptimalás</li> <li>– anyagcsereszabályozás (cukorlimit, C/N, Fe ion)</li> <li>– Levegőztetés, reaktor</li> <li>– Szabályozások (pH, t)</li> </ul> |
|---|--|



## 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–szelekciós törzsjavítással érték el (~2-3 ppb → ~50.000 ppb)



## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

## Fermentáció

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

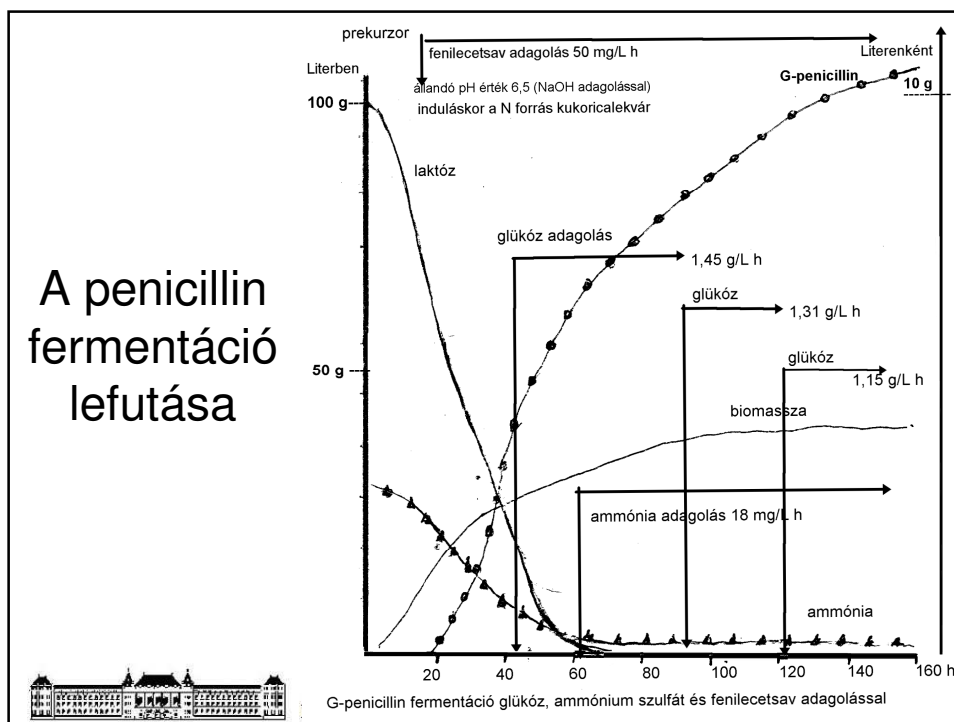
Tápanyagellátás a második szakaszban:

- 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

24



## 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



## 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  $\text{CO}_2$ -dal is.

Acilezés:                   - enzimesen  
                                  - kémiailag

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

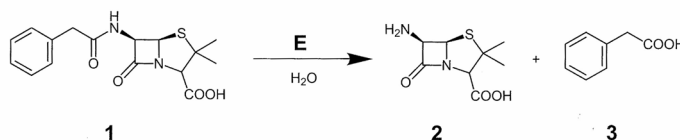
27

## Penicillin aciláz/amidáz

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



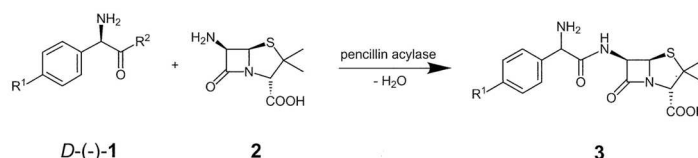
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

## 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 = 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

29

## Penicillin aciláz/amidáz

Termelő törzsek:

- Type I: penész típusú, pH  $\sim 10$ , t  $\sim 50$  °C, inkább V, mint G
- Type II: baktérium típusú, pH  $\sim 8$ , t  $\sim 40$  °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<sub>2</sub> : 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.

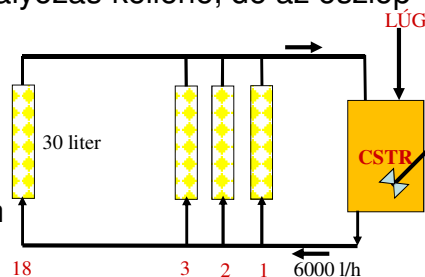
Toyo-Ozo eljárás:

recirkulációs, pH szabályozás a tartályban,

ciklusidő: 30 óra,

produktivitás: 33 kg/m<sup>3</sup>h

konverzió: 86%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## Félszintetikus penicillinek

### Szerkezet - tulajdonságok összefüggése:

savtűrés: elektronszívó csoportokkal lehet védeni a savamid kötést.

penicillináz rezisztencia: sztérikus védőcsoportok

hatásspektrum változtatás: -NH<sub>2</sub>, -COOH, észter csoportok



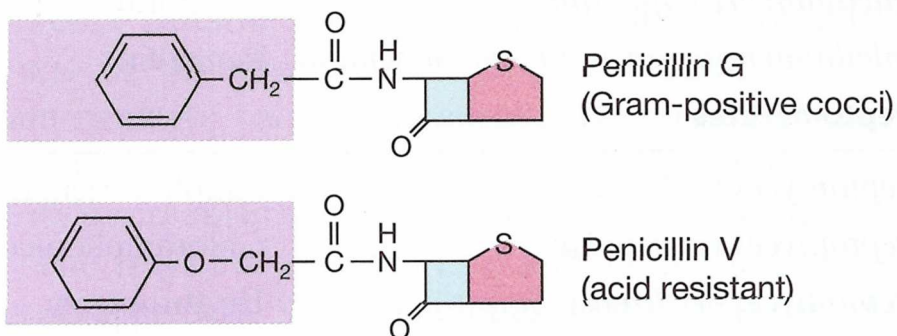
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

## Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

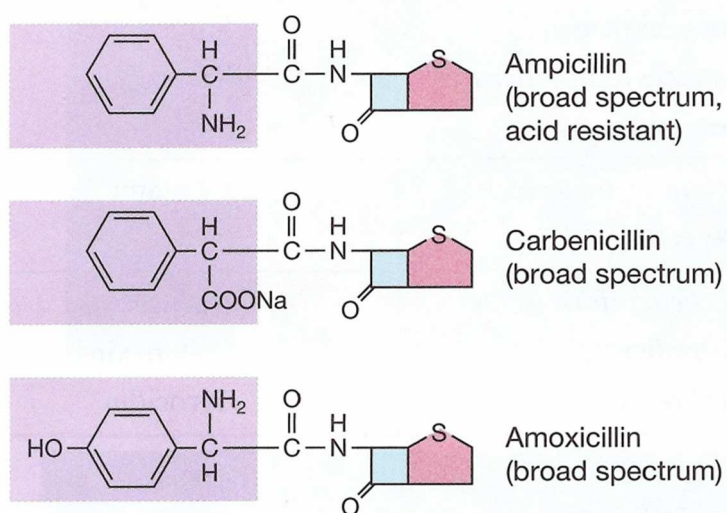
### Natural penicillins



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

## Félszintetikus penicillinek



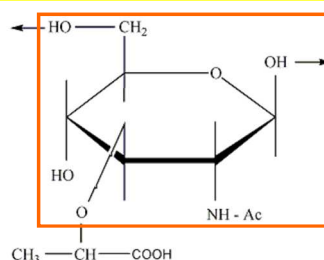
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

## Hatásmód

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

N-acetil-  
murámsav, AM



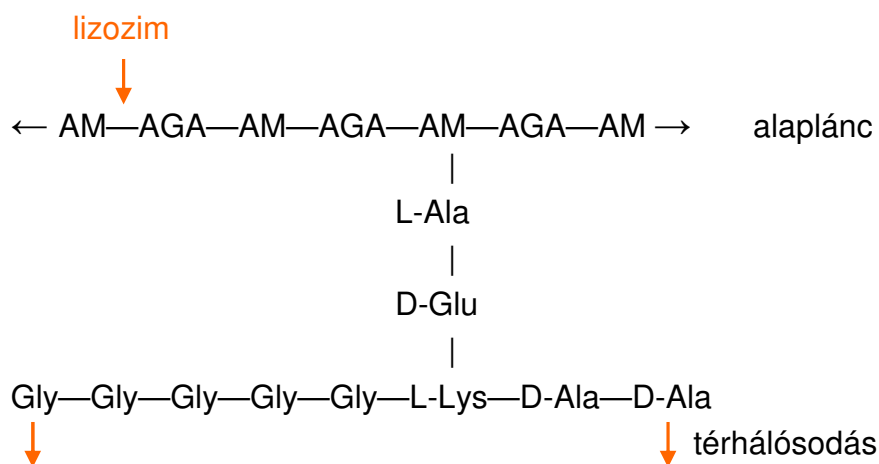
N-acetil-  
glükózamin,  
AGA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

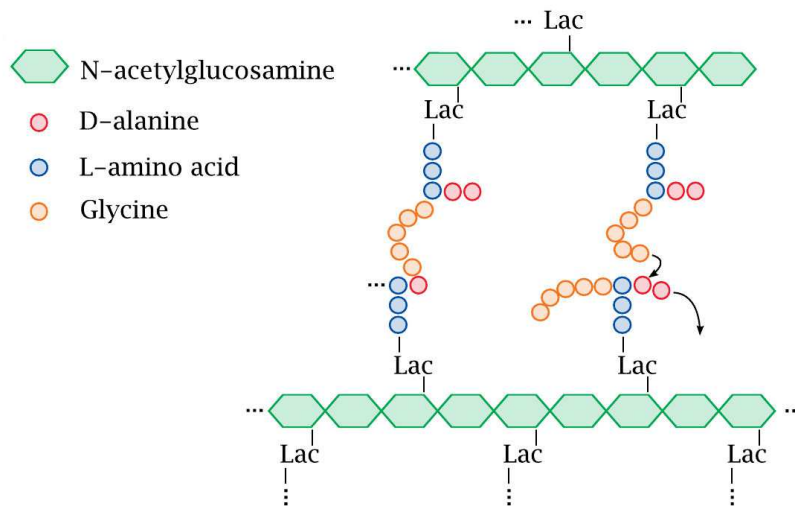
## A Gram-pozitív sejtfal szerkezete



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

## A Gram-pozitív sejtfaal térhálósítása



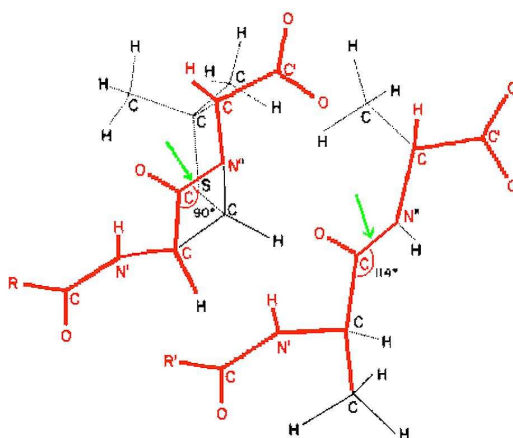
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

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

penicillin

D-Ala-D-Ala

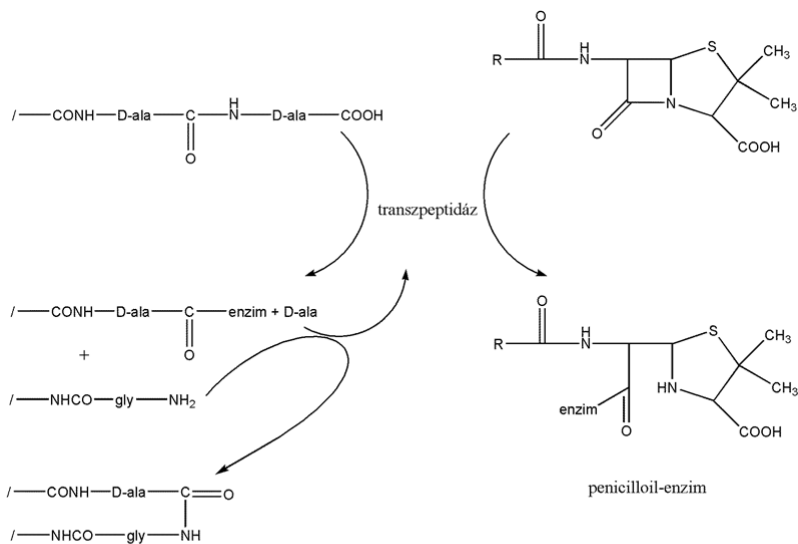


Irreverzibilisen kapcsolódik a transzpeptidázhoz  $\rightarrow$  a falszintézis leáll  $\rightarrow$  ionkiáramlás

tudomány Tanszék

38

## A penicillin hatásmechanizmusa



keresztkötésű glikopeptid

39

## 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 bárhogy

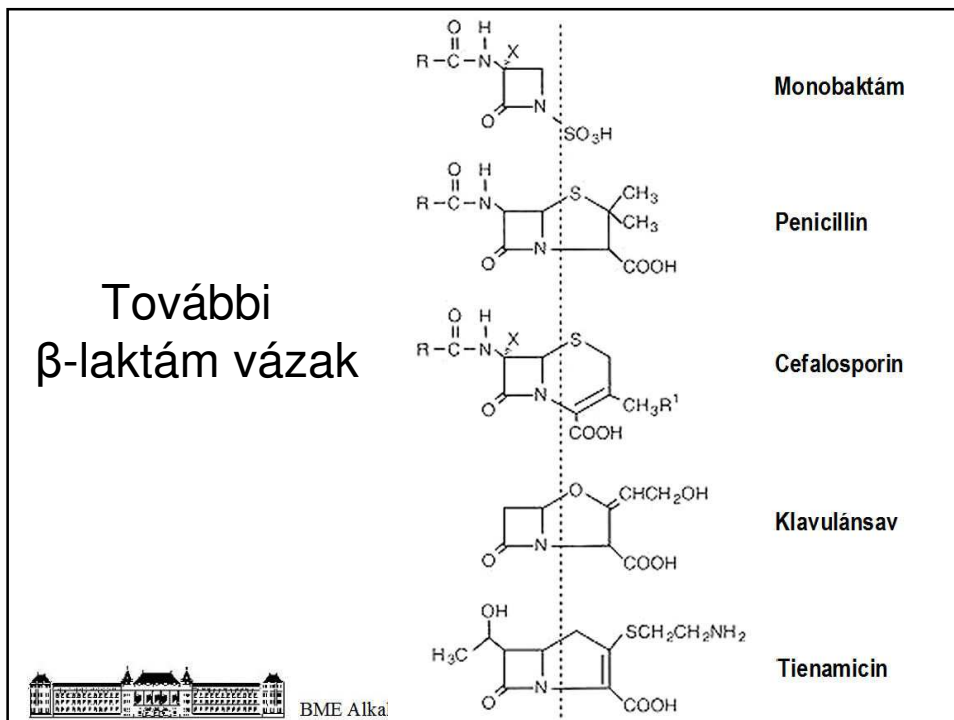
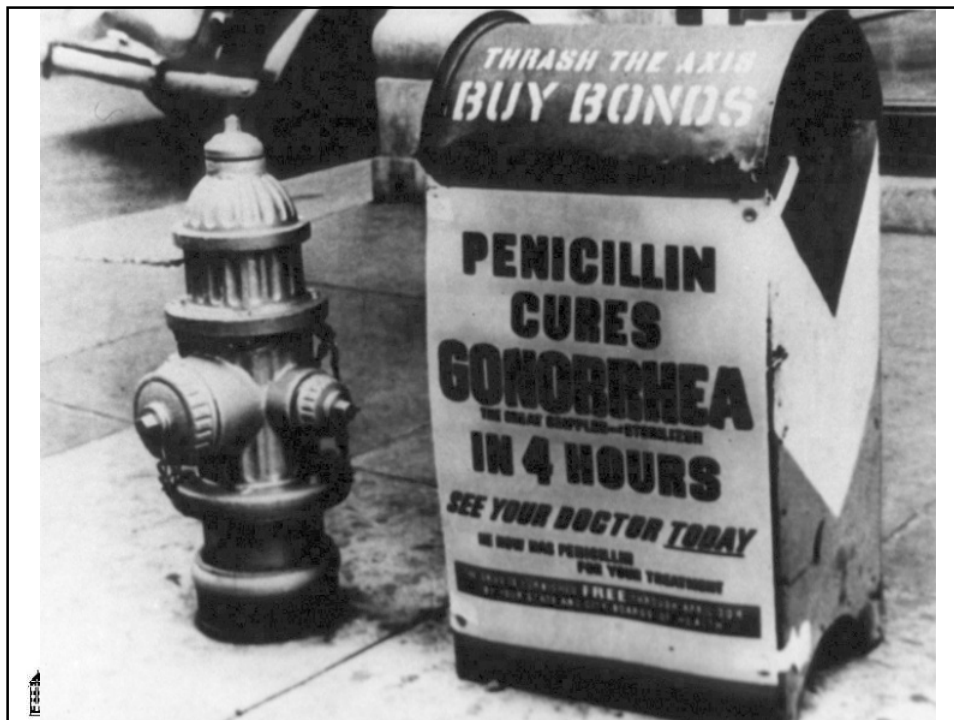
Adagolás: pl.: Maripen: 500.000 IU/tabletta 3x /nap

Penicillin érzékenység: régen a szennyezések miatt, ma valódi allergia (haptének)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

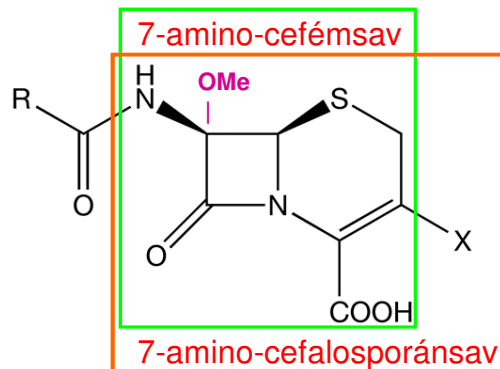
40



## 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 - Cephalexin

4 generációban közel ötven félszintetikus molekula



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

## A cefalosporinok

Előállítás:

- *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  $\beta$ -ta-laktamázok, amelyek specifikusan ezt bontják)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44



## 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  $\rightarrow MgNH_4PO_4$ , rosszul oldódó só
- Cys prekursor: lizálja a sejteket, ezért inkább tiosulfát, erre rezisztens mutánsok
- $\alpha$ AAA prekursor: drága, inkább Lys, vagy kadáverin
- amino-donorok: 1,3-diamino propán, dimetil-formamid



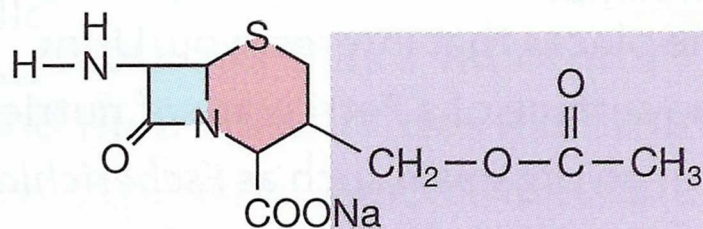
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

## A cefalosporinok előállítása

Az oldallánc-csere kémiai is megoldható (stabilabb az alapmolekula), a köztitermék a 7-ACS

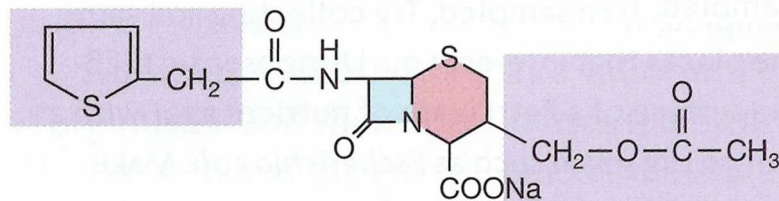
7-ACS-ból a C-7 és C-3-as szénen történő származékképzéssel sokféle félszintetikus termék állítható elő.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

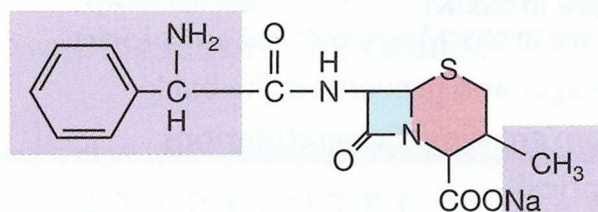
46

## Első generációs cephalosporinok



Pl.: Cephalothin

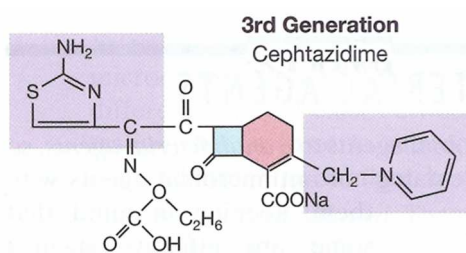
Cephalexin



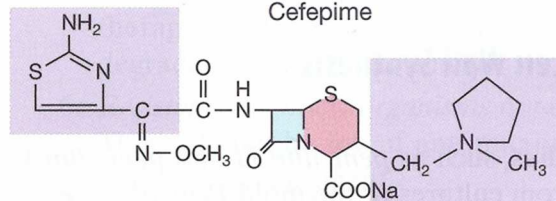
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

## 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.

