

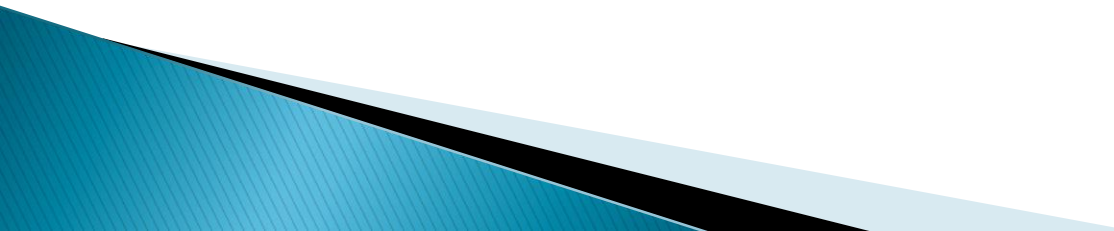
Mikrobiálne metabolity – antibiotiká

Ing. Lukáš Hleba, PhD.

Antibiotiká – charakteristika

- ▶ Sú to látky používané k liečeniu mikrobiálnych infekcií
- ▶ Pôvodne boli prírodného charakteru
- ▶ Dnes sa väčšinou pripravujú synteticky alebo semisynteticky
- ▶ Účinky by mali byť len na prokaryotické org.
- ▶ Lekár Ernest Duchesne zaznamenal že MVH *Penicilium notatum* ničia baktérie, hneď na to však zomrel a jeho výskum bol zabudnutý
- ▶ Neskôr 1927 A. Fleming

Rozdelenie antibiotík – podľa chemickej štruktúry

- ▶ Penicilíny
 - ▶ Cefalosporíny
 - ▶ Makrolidy
 - ▶ Karbapenémy
 - ▶ Aminoglykozidy
 - ▶ Tetracyklíny
 - ▶ Amfenikoly
 - ▶ Linkozamidy
 - ▶ Polymyxínové a glykopeptidové ATB
- 

Makrolidy

- ▶ Sú produktami Streptomycét a chemickej syntézy – príklady: erytromycín, azitromycín, claritromycín, fidaxomicín, telitromycín
- ▶ Sú to makrocyclické zlúčeniny produkované *Saccharopolyspora erythrea*, dnes známa ako *Streptomyces erythrea*
- ▶ Dnes sa už vyrábajú synteticky, základ však tvorí erytromycín

Produkcia erytromycínu

▶ Akumulácia biomasy:

- *S. erythreus* sa nechá sporulovať na tryptónovom médiu
- Bunky so spórami sa zozbierajú a urobí sa suspenzia v sterilnej vode
- Suspenzia sa môže uložiť na 4 °C do použitia

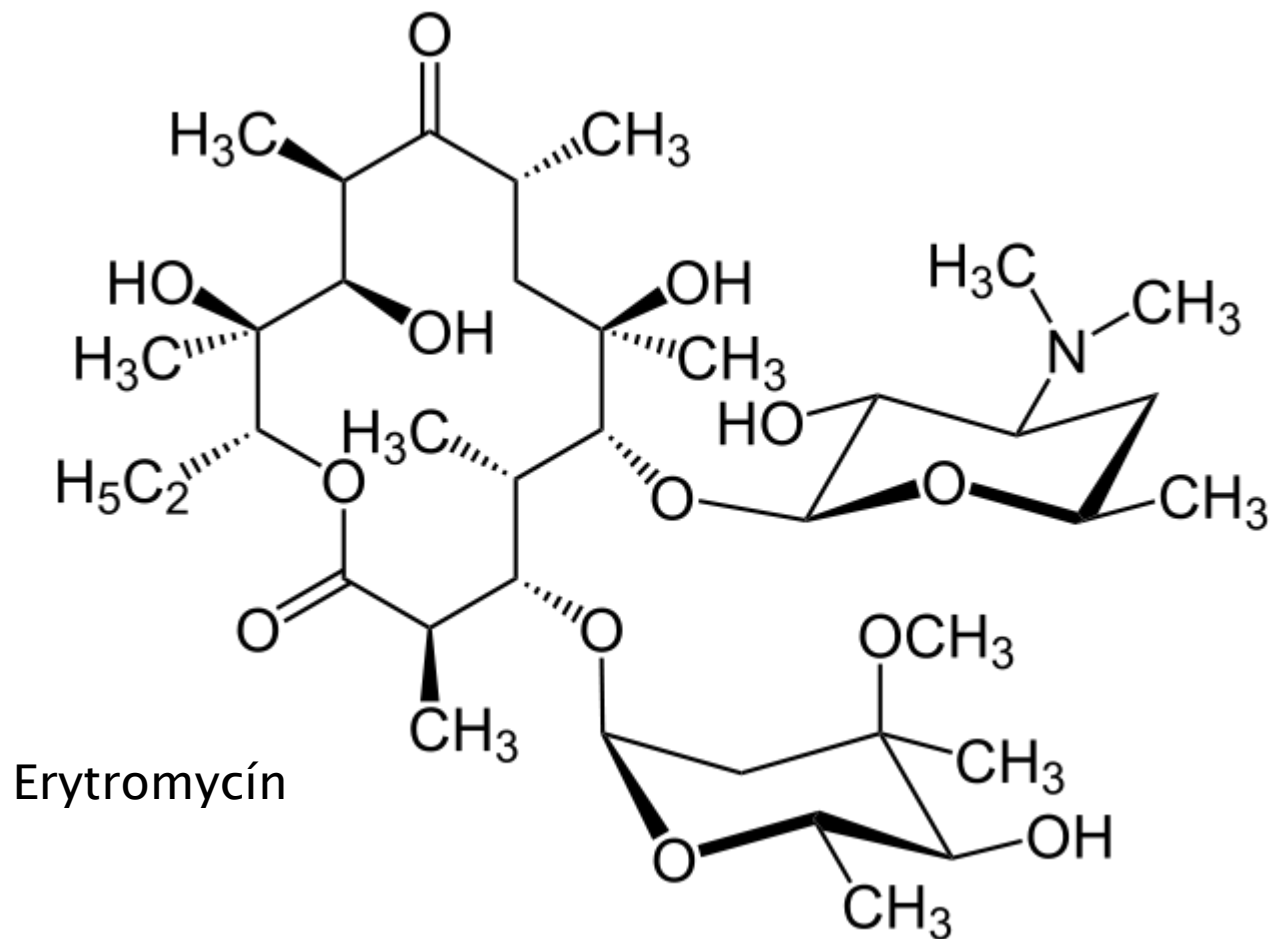
▶ Produkčná fáza:

- Používa sa premiešavací fermentor
- Médium: sacharóza 5%, kukuričný výluh 0,5%, sójový olej 1,5 %, kvasničný extrakt 1 %, CaCO₃ zrazenina 0,3%, pH 7–7,2
- Produkcia nastáva ak sa médium spení
- Prídavok n-propanolu ako prekursora zvýši produkciu erytromycínu

Izolácia a extrakcia erytromycínu

- ▶ Mycélium sa separuje centrifugáciou alebo filtrovaním
- ▶ Kyslý stav médiu sa udržiava butylacetátom, ktorý podporuje oddelenie mycélia
- ▶ Rovnako dobre rozpúšťa antibiotikum
- ▶ Nasleduje premývanie vodou
- ▶ Zmení sa pH na 9,5 za pomoci acetónu
- ▶ Pri zmene pH sa vytvára zrazenina a formuje sa do podoby kryštálov
- ▶ Následne je erytromycín získaný ako dihydrátová soľ

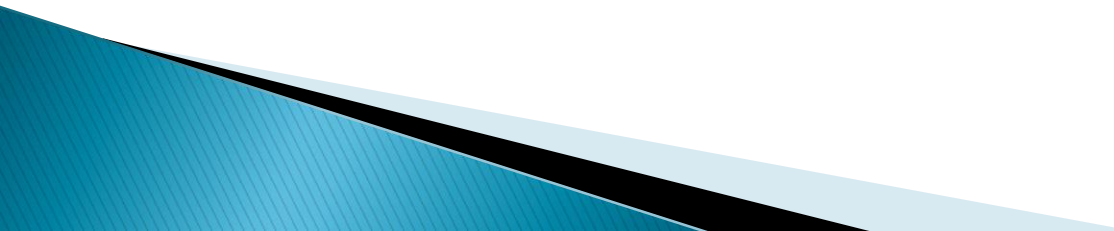
Makrolidy



Beta-laktámy – penicilíny

- ▶ Fermentáciou sa vyrábajú penicilín G a V pomocou *Penicillium chrysogenum* a *Acremonium chrysogenum*
- ▶ Používa sa dávkový kontinuálny proces (fed-batch) v nerezových fermentoroch s kapacitou 30 000 – 100 000 litrov
- ▶ Fermentácia vyžaduje 2–3 počiatočné rastové fázy po ktorých nasleduje fermentačný proces, ktorý trvá 120–200 hodín
- ▶ Je potrebné silné prevzdušňovanie
- ▶ Zhruba 65 % substrátu sa využíva na tvorbu biomasy, 20–25 % je zmetabolizovaný uhlík a 10–12 % na výrobu penicilínu
- ▶ Optimálne pH sa pohybuje okolo 6,4–6,8
- ▶ Potrebné živiny: kukuričný výluh, semená bavlníka alebo sójové semená a ich múka, amoniak alebo síran amónny
- ▶ Ako prekursor: fenylloctová kyselina – penicilín G, fenoxyoctová kyselina – penicilín V

Po fermentácii

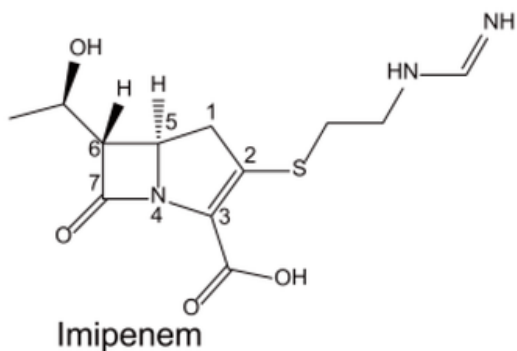
- ▶ Z tanku sa vyberá iba 20–40 % produktu, ostatok sa doplní novým médiom
 - ▶ Tento proces sa niekoľkokrát zopakuje
 - ▶ Extrakcia penicilínu z média sa robí s použitím kyselín pri kyslom pH
- 

Karbapenémy

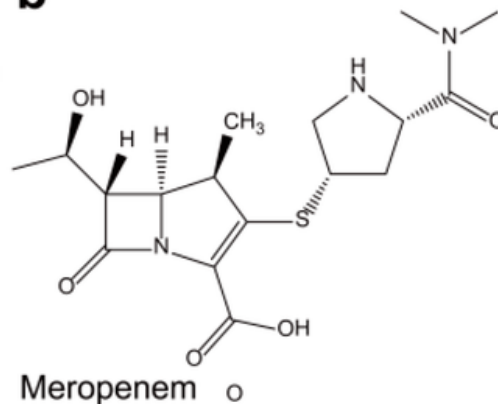
- ▶ Sú produktom *Streptomyces* sp.
- ▶ Atb tienamycin je produktom iba *S. cattleya*
- ▶ Majú betalaktámové jadro
- ▶ No na rozdiel od penicilínov nemajú síru vo vnútri molekuly ale na jej povrchu
- ▶ Ťažko sa fermentujú, preto sa vyrábajú umelou syntézou

Karbapenémy

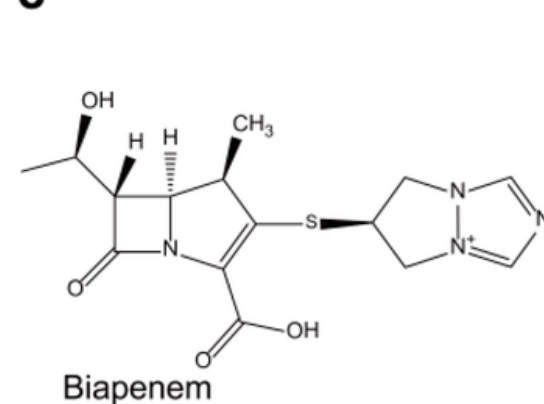
a



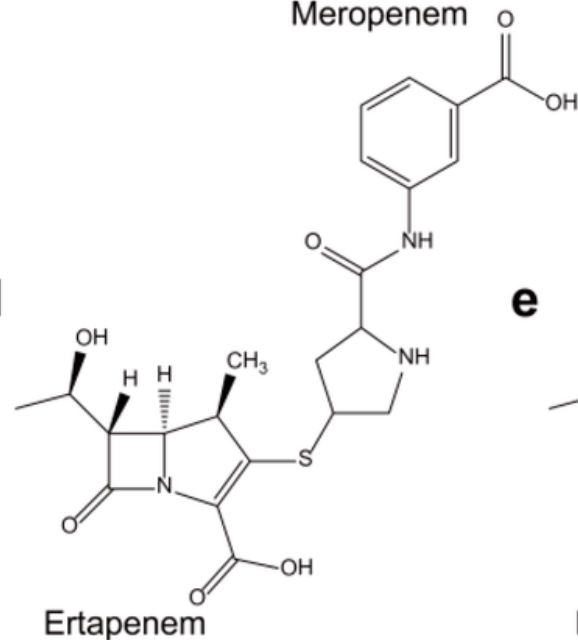
b



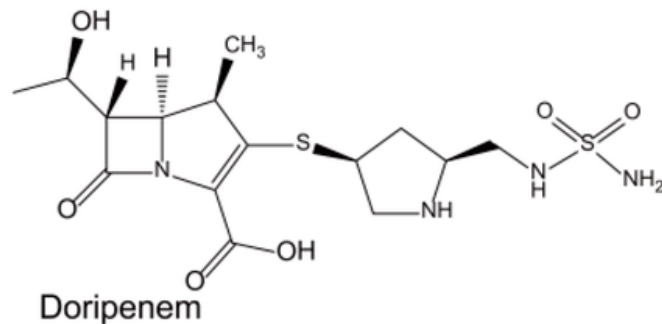
c



d



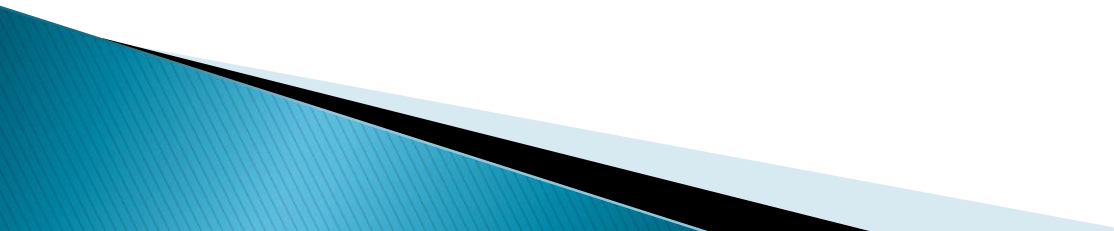
e



Cefalosporíny

- ▶ Hlavný predstaviteľ cefalosporín C
- ▶ *Acremonium chrysogenum*
- ▶ Používa sa fed–batch systém, tzn. kontinuálny fermentor s prídavkom karbohydrátov
- ▶ Prídavok olejov vedie k tvorbe artrospór
- ▶ Artrospóry potrebujú množstvo kyslíka
- ▶ V tejto fáze je obrovská produkcia cefalosporínu
- ▶ DL–metionín – prídavok pre tvorbu artrospór
- ▶ Hlavný problém fermentácie – je nestabilita cefalosporínu C

Cefalosporíny

- ▶ K fermentácii sa pridáva kvasinka *Rhodospiridium toruloides*
 - ▶ Tá produkuje acetyl estarázu, cefalosporín je stabilnejší a zvýši s produkcia až o 40 %
 - ▶ Existuje mnoho prác o zvyšovaní produkcie cefalosporínu C, selekciou kmeňov, genetickým inžinierstvom
- 

Cefalosporíny – získavanie

- ▶ Prvým krokom je odstraňovanie mycélia
- ▶ Existujú dve cesty purifikácie
 1. Použitie neiónových živíc – vysoká afinita živíc spôsobuje selekciu nielen cefalosporínu C ale aj penicilínu N, ten je odstránený pri pH 2, následná aniónová a kationový výmena produkuje vysoko kvalitný cefalosporín C
 2. Je založená na substitúcii amínovej časti za alfa-aminoadipyl postranný reťazec
- ▶ V nasledujúcom kroku je výsledná látka kryštalizovaná v kyslom prostredí, v ktorom vznikajú soli cefalosporínu

Cefamycíny

- ▶ Sú odvodené od cefalosporínu metoxyláciou C-7 pozície
- ▶ Táto reakcia bola objavená u *S. clavuligerus*
- ▶ Používa sa *S. clavuligerus* a *S. lipmanii*
- ▶ Izolácia z média je zabezpečená nízky pH

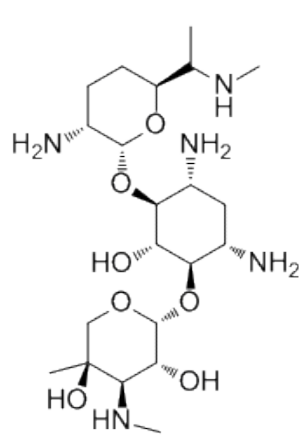
Aminoglykosidy

- ▶ Producenti: *Streptomyces* – viacero ATB, *Micromonospora* – gentamicín
- ▶ Sú to inhibítory prokaryotickej proteosyntézy
- ▶ Molekuly sú malé a dokážu prechádzať cez membránu G⁻ cez poríny, aeróbných baktérií
- ▶ Všeobecne nie sú účinné voči G⁺ a anaeróbnym G⁻
- ▶ Najznámejšie je ATB Streptomycín – produkt *Streptomyces griseus*
- ▶ Iné: kanamycín, tobramycín, gentamicín a neomycín

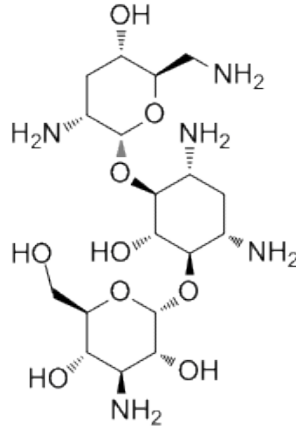
Aminoglykosidy

- ▶ Hlavný predstaviteľ gentamicín
- ▶ Producenti: *Micromonospora purpurea* a *M. echinospora*
- ▶ Používa sa iba submerzná fermentácia
- ▶ V médiu sa tvorí gentamicín C_1 , C_{1a} a C_2

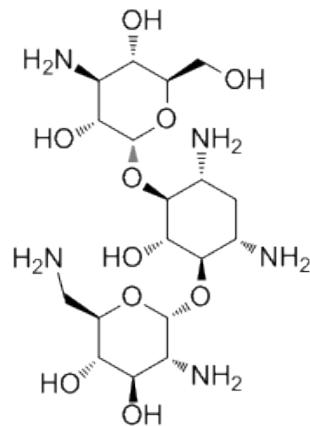
Aminoglykosidy



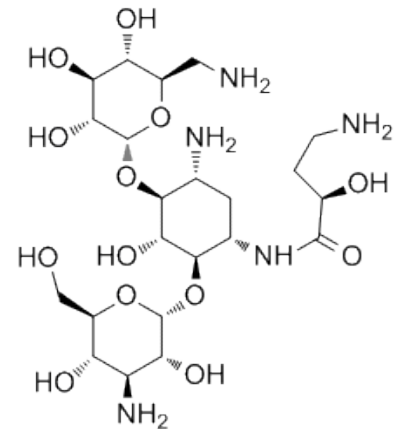
Gentamycin



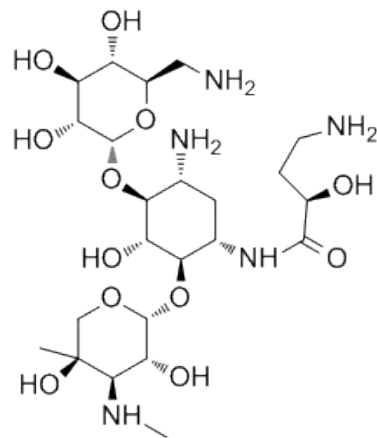
Tobramycin



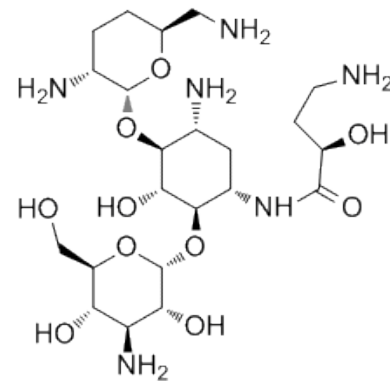
Kanamycin B



Amikacin



Isepamicin



Arbekacin