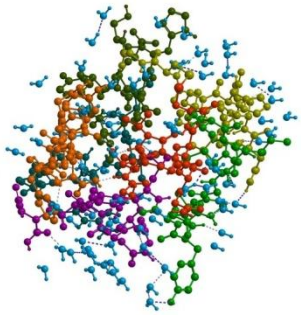
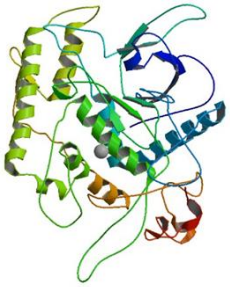
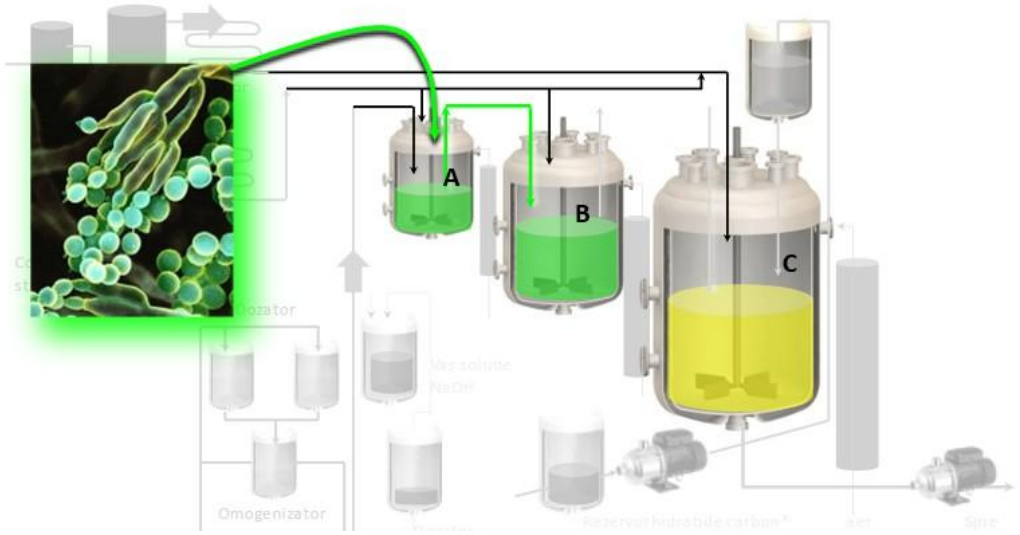


Angela LIS
Vladislav BLONSCHI
Elena BUNDUCHI



BIOTEHNOLOGIA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE ȘI COSMETICE

NOTE DE CURS



Chișinău 2025

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică
Departamentul Chimie Industrială și Ecologică
„Academician Gheorghe Duca”

Angela LIS, Vladislav BLONSCHI, Elena BUNDUCHI

BIOTEHNOLOGIA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE ȘI COSMETICE

NOTE DE CURS

Aprobat de
Consiliul Calității al USM
Proces-verbal nr. 1 din 23 octombrie 2025

Chișinău 2025

CZU 606:[615.2+687.55](075.8)

Recomandat de:
Departamentul Chimie industrială și ecologică „Acad. Gheorghe Duca”
Proces-verbal nr. 9 din 27 iunie 2025;
Comisia de Asigurare a Calității a Facultății de Chimie și Tehnologie Chimică
Proces-verbal nr. 1 din 25 august 2025;
și Consiliul Facultății de Chimie și Tehnologie chimică
Proces-verbal nr. 1 din 25 august 2025

Recenzenți:
***Liliana Cepoi**, dr. hab., conf. cercetător,* Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al UTM;

***Sergiu Calancea**, dr., conf. univ.,* Universitatea din Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Franța;

***Alexandru Ciocârlan**, dr. hab., conf. cercetător,* cercetător ştiinţific coordonator la Institutul de Chimie al Universității de Stat din Moldova, Laboratorul Chimia compușilor naturali și biologic activi.

Descrierea CIP a Camerei Naţionale a Cărţii din Republica Moldova

Lis, Angela.

Biotehnolgia substanţelor medicamentoase şi cosmetice : Note de curs / Angela Lis, Vladislav Blonschi, Elena Bunduchi ; Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Departamentul Chimie Industrială şi Ecologică "Academician Gheorghe Duca". – Chişinău : Editura USM, 2025. – 356 p. : fig., tab.

Bibliogr. la sfârşitul compartimentelor. – 20 ex.

ISBN 978-9975-62-937-9.

606:[615.2+687.55](075.8)

L 65

ISBN 978-9975-62-937-9

© A. Lis, V. Blonschi, E. Bunduchi, 2025
© Editura USM, 2025

Cuprins

PREFAȚĂ 8

1. BIOTEHNOLOGIA: ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE 10

1.1. Apariția și dezvoltarea biotehnologiei 10

1.2. Aplicații ale biotehnologiei în industria farmaceutică și cosmetică 11

1.3. Etapele unui proces biotehnologic 13

1.4. Procesul de creștere a microorganismelor 19

1.5. Influența factorilor de mediu asupra creșterii microorganismelor 20

Întrebări pentru autoevaluare 24

***Bibliografie* 25**

2. BIOTEHNOLOGIA PENICILINELOR NATURALE 27

2.1. Antibiotice: istoric, clasificarea, structura și mecanismele de acțiune 27

2.2. Peniciline: clasificarea, structura chimică, mecanismul de acțiune și proprietățile biologice 31

2.3. Structura și nomenclatura penicilinelor naturale 33

2.4. Biosinteza penicilinelor naturale 34

2.5. Biotehnologia penicilinelor naturale: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare, purificare și condiționare 35

Întrebări pentru autoevaluare 50

***Bibliografie* 50**

3. BIOTEHNOLOGIA PENICILINELOR DE SEMISINTEZĂ 52

3.1. Peniciline de semisinteză: structura și mecanismele de acțiune 52

3.2. Biotehnologia acidului 6-aminopenicilanic (6-APA) 57

3.3. Biotehnologia penicilinelor de semisinteză: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare 59

Întrebări pentru autoevaluare 64

***Bibliografie* 65**

4. BIOTEHNOLOGIA CEFALOSPORINELOR 67

4.1. Cefalosporine: clasificarea, structura chimică și mecanisme de acțiune 67

4.2. Biosinteza cefalosporinelor naturale 72

4.3. Biotehnologia cefalosporinelor naturale: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare 73

4.4. Biosinteza cefalosporinelor semisintetice. Obținerea și spectrul de acțiune ... 76

Întrebări pentru autoevaluare 92

***Bibliografie*..... 93**

5. BIOTEHNOLOGIA AMINOACID- ȘI PEPTIDO-ANTIBIOTICELOR ..95

5.1. Aminoacid- și peptido-antibiotice: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică 95

5.2. Biosinteza aminoacid-antibioticelor pe exemplul *D*-cicloserinei. Procesul biotehnologic de producere a *D*-cicloserinei 97

5.3. Caracteristicile generale și structurale ale peptido-antibioticelor 99

5.4. Biosinteza și biotehnologia gramicidinelor, polimixinelor și bacitracinelor: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare 101

Întrebări pentru autoevaluare 113

***Bibliografie*..... 113**

6. BIOTEHNOLOGIA AMINOGLICOZIDELOR 117

6.1. Aminoglicozide: clasificare, structură, proprietăți chimice și utilizarea farmaceutică. Mecanismele de acțiune biologică a aminoglicozidelor și dezvoltarea rezistenței la aminoglicozide 117

6.2. Biosinteza aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei 121

6.3. Procesul biotehnologic de producere a aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei 129

Întrebări pentru autoevaluare 132

***Bibliografie*..... 133**

7. BIOTEHNOLOGIA MACROLIDELOR 134

7.1. Macrolide: clasificare, structură și proprietăți chimice, utilizare farmaceutică 134

7.2. Mecanismele de acțiune biologică a macrolidelor. Dezvoltarea rezistenței la macrolide 136
7.3. Căile metabolice de biosinteză a macrolidelor 138
7.4. Procesul biotehnologic de producere, separare și purificare a macrolidelor . 139
7.5. Macrolidele polienice 140
Întrebări pentru autoevaluare 145
***Bibliografie* 146**
8. BIOTEHNOLOGIA TETRACICLINELOR 147
8.1. Structura, clasificarea și activitatea biologică a tetraciclinelor 147
8.2. Mecanismul de acțiune și de dezvoltare a rezistenței la tetracicline 149
8.3. Biosinteza tetraciclinelor 150
8.4. Procesul biotehnologic de producere, separare și purificare a tetraciclinelor 155
8.5. Producerea tehnologică a tetraciclinelor de semisinteză 159
Întrebări pentru autoevaluare 164
***Bibliografie* 164**
9. BIOTEHNOLOGIA PROTEINELOR RECOMBINANTE 166
9.1. Proteine recombinante: clasificare, structură, proprietăți, utilizare farmaceutică și/sau cosmetică 166
9.2. Proteine folosite în cosmetologie: colagenul, cheratina și cheratina hidrolizată, toxina botulinum 174
9.3. Biotehnologia producerii insulinei: materii prime, etape de prefermentare, biosinteză, izolare și purificare 187
Întrebări pentru autoevaluare 197
***Bibliografie* 198**
10. BIOTEHNOLOGIA VITAMINELOR 199
10.1. Vitamine: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică și/sau cosmetică 199
10.2. Biosinteza vitaminelor C și B 202
10.3. Biotehnologia vitaminelor C, B_2 și B_{12}: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare 210
Întrebări pentru autoevaluare 220
***Bibliografie* 220**

11. BIOTEHNOLOGIA AROMELOR COSMETICE 222

11.1. Arome cosmetice: clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică 222

11.2. Biosinteza eugenolului, 2-feniletanolului, vanilinei și a γ-decalactonei 223

11.3. Biotehnologia 2-feniletanolului: materii prime, biosinteză, izolare și purificare 233

Întrebări pentru autoevaluare 239

***Bibliografie* 239**

12. BIOTEHNOLOGIA POLIFENOLILOR, TERPENELOR ȘI A CAROTENOIDELOR DE INTERES COSMETIC 242

12.1. Polifenoli, terpene și carotenoide: clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică 242

12.2. Biosinteza acidului elagic, galic, ferulic și a resveratrolului 243

12.3. Biotehnologia acidului elagic: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare 254

Întrebări pentru autoevaluare 260

***Bibliografie* 261**

ANEXE 262

PREFAȚĂ

În contextul actual al transformărilor globale, ocrotirea sănătății și protecția mediului înconjurător constituie priorități majore ale societății moderne. Dezvoltarea industrială intensă, deși benefică economic, a generat multiple provocări ecologice și de sănătate publică. În acest sens, biotehnologiile moderne au devenit un instrument esențial în găsirea unor soluții sustenabile, având implicații economice, sociale și ecologice profunde. Tot mai multe țări investesc resurse considerabile în cercetarea și aplicarea biotehnologiilor pentru a aborda probleme din domeniile farmaceutic, medical, agricol și de mediu. Biotehnologiile moderne contribuie la crearea de noi tipuri de microorganisme, utilizate în procesele de producere, de depoluare a mediului şi de soluționare a diferitor probleme de sănătate și de mediu: realizarea proceselor industriale prietenoase mediului; obținerea produselor alimentare, farmaceutice și cosmetice prin procese biotehnologice; tratarea apelor reziduale și bioremediere; monitorizarea mediului; agricultură etc.

Biotehnologia se concentrează pe utilizarea microorganismelor și a enzimelor în scopul obținerii unor produse de interes practic, într-un mod prietenos cu mediul. Printre produsele obținute prin biotehnologie se numără ***antibioticele*** (peniciline, cefalosporine, aminoacid- și peptido-antibiotice, tetracicline, macrolide), ***proteine recombinante, vitamine*** (vitaminele B, C, D), ***arome de interes cosmetic*** (vanilină, eugenol, 2-feniletanol, γ-decalactona), ***polifenoli, terpene*** și ***carotinoide de interes cosmetic*** (cum ar fi acidul hialuronic, acidul kojic, (E/Z)-resveratrolul, acidul elagic, galic și ferulic etc.).

Disciplina ***„Biotehnologia substanțelor medicamentoase și cosmetice”*** urmărește să dezvolte competențe privind: *biosinteza substanțelor medicamentoase și cosmetice; selectarea și valorificarea complexă a materiei prime și a coproduselor* (stabilirea consecutivității operațiilor și procesul tehnologic); *selectarea și utilizarea echipamentelor specifice proceselor biotehnologice*; *etapele de prebiosinteză, biosinteză, izolare, purificare, utilizarea eficientă a energiei și a bioreactoarelor*; *măsurile de protecție a mediului ambiant*; *aplicarea metodelor fizico-chimice de analiză spectrală* (IR, UV) și *cromatografice* (HPLC) *în scopul stabilirii identității și purității produsului finit*.

Materialul prezentat în lucrare este structurat în baza curriculumului disciplinei la programul de studii *Tehnologia produselor cosmetice și medicinale*, Ciclul I, licență, Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Departamentul Chimie Industrială și Ecologică „Acad. Gh. Duca”. Lucrarea include aspecte

teoretice și aplicative, oferind o viziune integrată asupra proceselor biotehnologice utilizate în industrie, alături de exemple practice, metode de analiză și studii de caz.

Pentru studenți, această lucrare oferă nu doar cunoștințe teoretice solide, ci și abilități aplicabile în industrie, necesare în laboratoarele de cercetare, în sectoarele de producție farmaceutică și cosmetică, precum și în instituțiile de control și evaluare a calității. Formarea unor astfel de competențe sporește considerabil șansele de integrare pe piața muncii națională și internațională, în domenii cu cerere crescândă de specialiști.

Sperăm că lucrarea de față le va deschide noi perspective, îi va inspira în aprofundarea cunoștințelor biotehnologice și va contribui la formarea lor profesională ca viitori specialiști într-un domeniu aflat în plină expansiune.

Autorii

1. BIOTEHNOLOGIA: ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE

1.1. Apariția și dezvoltarea biotehnologiei
1.2. Aplicații ale biotehnologiei în industria farmaceutică și cosmetică
1.3. Etapele unui proces biotehnologic
1.4. Procesul de creștere a microorganismelor
1.5. Influența factorilor de mediu asupra creșterii microorganismelor

Abilități

Studentul:

- analizează etapele-cheie ale evoluției biotehnologiei și impactul lor;
- definește și utilizează concepte fundamentale în contexte aplicative;
- identifică și clasifică substanțe biotehnologice, explicând importanța acestora;
- evaluează avantajele și limitele obținerii pe cale biotehnologică a substanțelor medicamentoase și cosmetice față de alte metode;
- descrie și explică etapele principale ale unui proces biotehnologic, incluzând controlul factorilor operaționali;
- compară și interpretează procesele biochimice de bază din metabolismul aerob și anaerob, corelându-le cu aplicațiile în biosinteza industrială;
- modelează și analizează curba de creștere a microorganismelor, aplicând cunoștințele la optimizarea proceselor biotehnologice;
- explică structura și funcția principalilor biocatalizatori utilizați în biotehnologie;
- evaluează influența factorilor de mediu asupra dezvoltării microorganismelor și propune soluții pentru optimizarea condițiilor de cultură.

1.1. Apariția și dezvoltarea biotehnologiei

Termenul **„biotehnologie”** a fost introdus pentru prima dată în anul **1919** de către **Károly Ereky**, un inginer agronom și om de știință maghiar. În viziunea lui, biotehnologia reprezentă **„toate acele aplicații tehnologice în care materia primă este transformată în produse utile cu ajutorul organismelor vii”** (*K. Ereky, 1919*). Această definiție timpurie punea accentul pe **rolul transformator al organismelor vii** în procesele tehnologice și avea o orientare predominant practică, în special în agricultură și în industria alimentară.

În anii 1960, termenul „**biotehnologie**” a început să fie utilizat în contextul cercetărilor legate de producerea unui produs sau serviciu care implică organisme vii și procese biologice. În prezent, majoritatea cercetătorilor definesc

biotehnologia ca o disciplină științifică nouă bazată pe biologie al cărei scop este utilizarea în tehnică a microorganismelor sau a produselor derivate de la acestea, a culturilor de celule vegetale și animale pentru producerea de substanțe utile în agricultură, industria alimentară, farmaceutică etc. în folosul activității umane.

De menționat că, de-a lungul istoriei, omenirea a folosit microorganisme în producerea băuturilor alcoolice, fermentarea aluatului și în producerea lactatelor fermentate. Dar abia la mijlocul secolului al XIX-lea omul de știință francez **Louis Pasteur** a dovedit științific relația dintre activitatea microorganismelor și procesele de fermentare.

Pe parcursul secolului XX, odată cu progresul geneticii, microbiologiei și a ingineriei biochimice, conceptul de biotehnologie s-a extins și s-a rafinat. Definițiile actuale reflectă complexitatea și multidisciplinaritatea domeniului.

O definiție modernă, acceptată pe scară largă, este cea propusă de **Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE): „Biotehnologia este aplicarea principiilor științifice și inginerești asupra proceselor biologice, organismelor, celulelor sau componentelor acestora, pentru a dezvolta produse și servicii utile".**

Uniunea Europeană definește biotehnologia într-un mod asemănător, accentuând aplicabilitatea în diverse domenii: **„utilizarea științifică a organismelor vii sau a părților acestora pentru a produce bunuri și servicii".**

Astfel, **biotehnologia** a evoluat de la un concept simplu, centrat pe utilizarea practică a organismelor, la un domeniu științific complex, cu aplicații în **medicină, agricultură, industrie, mediu și cosmetică**, reflectând progresele extraordinare ale științelor vieții și ale tehnologiilor de vârf.

În esență, scopul principal al biotehnologiei este obținerea de produse sau servicii utile activității umane, cu ajutorul organismelor vii (de exemplu microorganisme) sau enzimelor (molecule proteice cu funcție catalitică). Procesul de bază în biotehnologie este „***procesul biochimic***", după cum procesul de bază în tehnologia chimică este „***procesul chimic***". În tabelul A.1.1 sunt prezentate tipuri de produse comerciale obținute pe cale biotehnologică utilizând diferite tipuri de microorganisme.

1.2. Aplicații ale biotehnologiei în industria farmaceutică și cosmetică

Dezvoltarea biotehnologiei moderne este determinată în primul rând de descoperirile recente din domeniul biologiei moleculare, dar și de problemele societății contemporane, precum criza energetică, epuizarea rezervelor de resurse de pe planetă, probleme ecologice și de bioremediere. În acest sens, aceste biotehnologii pot fi clasificate:

1) în funcție de tipul de celule cu care se lucrează, se deosebesc biotehnologii *microbiene, vegetale* și *animale*.

2) în funcție de domeniul de aplicare a produsului obținut pe cale biotehnologică, se deosebesc:

- *biotehnologii industriale*: farmaceutice, cosmetice, alimentare și de depoluare;
- *biotehnologii agricole*: vegetale și în zootehnie;
- *biotehnologii medical-veterinare.*

Obiectul ***biotehnologiilor farmaceutice și cosmetice*** este obținerea cu ajutorul microorganismelor sau al enzimelor a unor produse de biosinteză și eventual modificarea lor prin semisinteză.

În categoria biotehnologiilor farmaceutice intră:

- producerea biomasei proteice;
- biosinteza antibioticelor;
- producerea acizilor organici;
- producerea aminoacizilor, enzimelor, probioticelor, hormonilor, vitaminelor, polizaharidelor.

În funcție de gradul de puritate, produsele obținute pot fi utilizate atât pentru consumul uman, cât și animal.

Extinderea spectrului substanțelor obținute pe cale biothenologică se poate efectua prin intermediul ingineriei genetice. În acest caz microorganismele (bacteriile sau fungii) native sunt modificate genetic (microorganisme modificate genetic). Acest fapt presupune modificarea prin tehnici adaptate, a ADN-ului nativ al unui microorganism, cu segmente de ADN ce conține informația genetică despre biosinteza produsului terapeutic. Astfel, se obține insulina și interferonul uman cu ajutorul bacteriilor și drojdiilor modificate genetic. Medicamentele și cosmeticele astfel obținute sunt mai puțin costisitoare, prezintă o toxicitate redusă și o biocompatibilitate înaltă.

În industria farmaceutică sunt comune proteinele terapeutice și antibioticele produse prin tehnologii genetice și fermentatre microbiană. De exemplu, insulina umană recombinantă este fabricată prin cultivarea ADN-ului uman în bacterii *E. coli* (sau drojdii *S. cerevisiae*) modificate genetic, iar interferonii recombinanți (*α, β, γ*) se obțin tot în *E. coli* (cu *IFNβ-1a glicozilat* produs în linii celulare CHO). Eritropoietina (EPO), fiind o glicoproteină complexă, este produsă în culturi de celule mamifere (CHO). Antibioticele (penicilina, streptomicina etc.) se obțin prin fermentare microbiană folosind fungi și bacterii (*Penicillium, Streptomyces* etc.). Vaccinurile de ultimă generație pe bază de ARN mesager (ex., vaccinurile COVID-

19 *Pfizer–BioNTech/Moderna*) sunt sintetizate *in vitro* prin transcripție ARN rapidă și scalabilă.

În cosmetice, ingredientele active sunt de asemenea obținute biotehnologic. Acidul hialuronic pentru creme și seruri este produs prin fermentare bacteriană (de ex., *Streptococcus zooepidemicus*). Colagenul recombinant (de tip III uman) este produs de microorganisme modificate (de ex., drojdii *Pichia pastoris*). Antioxidanții naturali (polifenoli, vitamine) sunt obținuți prin procese biotehnologice: fie extrași din culturi celulare, fie prin biosinteză microbiană/bioconversie (de ex., drojdii/bacterii).

Biotehnologia modernă joacă un rol esențial în transformarea industriei farmaceutice și cosmetice, oferind soluții inovatoare care răspund cerințelor actuale de eficiență, siguranță și sustenabilitate. Datorită progreselor în ingineria genetică, fermentarea industrială și cultura celulară, este posibilă producerea unor ingrediente active de înaltă puritate, cu aplicabilitate precisă și controlată. Procesele biotehnologice utilizează materii prime regenerabile (glucoză, apă), reducând consumul de resurse naturale și impactul asupra mediului. Prin optimizarea microorganismelor și condițiilor de cultură se obțin cantități mari de produs cu consum energetic și de resurse mai redus. Produsele obținute biotehnologic au o puritate înaltă și conțin mai puține reziduuri chimice sau contaminanți, reducând efectele adverse. Controlul strict al procesului biologic asigură standarde ridicate de calitate și siguranță, esențiale pentru utilizarea medicală și dermatologică. Biotehnologia permite dezvoltarea de tratamente și produse adaptate profilului genetic al pacientului sau nevoilor individuale ale pielii.

1.3. Etapele unui proces biotehnologic

Procesul biotehnologic cuprinde mai multe etape:

a) Selectarea microorganismelor și ameliorarea performanțelor acestora

În natură dezvoltarea microorganismelor este influențată de condițiile specifice ale mediului din care a fost prelevată proba. În biotehnologie se utilizează o cultură pură de microorganisme; prin urmare, este importantă identificarea condițiilor de dezvoltare ale acestora în scopul obținerii produsului de interes. La selectarea microorganismelor se utilizează mai multe metode: metoda *Lister*, metoda *Linder*, metoda *Koch*, metoda *Naumov* etc. Pentru creșterea productivității se utilizează culturi pure de înaltă performanță rezultate prin selecții repetate a celor mai bune tulpini și obținere prin procedee de *mutasinteză* a mutanților înalt productivi. *Mutanții* sunt indivizi care diferă de populația speciei prin unul sau mai multe caractere ce se transmit ereditar. Noile caractere apar datorită modificărilor genetice care se produc, de regulă, din cauza șocurilor termice, pasteurizării sau

carenței din mediu a unor principii utile dezvoltării normale. Calități urmărite la *mutanți*: productivitate înaltă, rezistență la diverși agenți patogeni, la diferite valori de pH, asimilarea unor medii nutritive ieftine, termosensibilitate etc.

b) Pregătirea mediilor de cultură

Microorganismele necesită condiții fizice (temperatură, agitare, vâscozitate), chimice (compoziția mediului de cultură) și biologice (sterilizarea mediului) optime pentru creșterea și biosinteza produsului de interes. În acest scop, mediile de cultură sunt constituite din suporturi nutritive sterilizate care permit dezvoltarea unui microorganism în afara nișei ecologice naturale. Biomasa este formată din 73–86% apă, restul fiind substanța uscată (C, N, O, H, P, S, K, Mg, Fe, Mn, Zn, Na, Ca, Cl, Si).

Mediile de cultură se clasifică în funcție de:

- *consistență* – medii lichide, solide, semisolide;
- *compoziție – medii naturale* (care conțin elemente nutritive, de origine vegetală sau animală) și *medii sintetice (*care conțin numai compuși cu structură chimică cunoscută care pot fi dozați);
- *tipul de metabolism al microorganismelor cultivate* – medii pentru microorganisme aerobe sau anaerobe;
- *scopul și frecvența utilizării* – medii de uz curent, medii utilizate în special pentru izolarea microorganismelor la nivel de laborator (elective, selective, de îmbogățire, de conservare, de identificare)*;*
- *faza de biosinteză* la care este utilizat mediul de cultură – medii de laborator, pilot sau medii de cultură industrială;
- *destinația finală a culturii dezvoltate* – mediile pot fi utilizate pentru cultura inocul sau pentru cultura de regim, numite și medii de fermentare sau medii de biosinteză.

În biotehnologie se utilizează în mod curent **mediile naturale** ce conțin subproduse agroalimentare, cum ar fi: melasa, șrotul de floarea-soarelui, de soia, făina de porumb, tărâțea de grâu, extractul de porumb. Aceste medii conțin în general substanțe nutritive necesare dezvoltării microorganismelor, la care se adaugă de obicei cantități mici de săruri minerale.

Mediile naturale sunt în general mai ieftine, dar prezintă dezavantajul variabilității compoziției, ceea ce nu permite o standardizare și, prin urmare, o reproducere a procesului de biosinteză cu un randament constant. Spre deosebire de mediile naturale, mediile sintetice au o compoziție constantă.

Un mediu de cultură utilizat pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să conțină:

- **sursa de carbon** (în general glucide – glucoză, amidon, lactoză, zaharoză etc.);
- **sursa de azot** care poate fi organic (aminoacizi, proteine, uree) sau anorganic (NH_3, $(NH_4)_2SO_4$ etc.);
- **sursa de fosfor** (H_3PO_4, $(NH_4)_3PO_4$, KH_2PO_4 etc.);
- **oligoelemente**: K (KCl sau K_2HPO_4); Mg ($MgSO_4$); Fe ($FeCl_3$);
- **factori de creștere**: aminoacizi, proteine, vitamine și coenzime.

Compoziția mediului nutritiv pentru un microorganism se stabilește în laborator, prin cultivarea acestuia, alegându-se astfel, în funcție de scopul urmărit, mediul optim de cultivare. Uneori, pentru creșterea randamentului în faza de biosinteză a produsului de interes în mediu se adaugă precursori, substanțe care au fragmente structurale ale moleculei produsului de biosinteză.

În procesele de biosinteză, sursa principală de energie o constituie sursa de carbon (glucidele). În procesele catabolice, prin oxidarea biochimică a glucozei se eliberează o cantitate mare de energie, din care o parte este înmagazinată în compușii macroergici (substanțe chimice de tipul ATP care prin hidroliză eliberează energie), iar excesul este eliberat sub formă de căldură, preluată cu ajutorul schimbătoarelor de căldură ale bioreactoarelor.

Mediile de cultură utilizate în *producția de enzime* trebuie să conțină elementele esențiale: carbon, azot, oxigen, sulf, fosfor, magneziu, calciu și oligoelemente (în cantități foarte mici): fier, cupru, cobalt, zinc, mangan, molibden, care sunt necesare decurgerii metabolismului. De cele mai multe ori este necesară utilizarea unui mediu de producere a enzimei cât mai ieftin și reproductibil pentru o perioadă cât mai lungă de timp. În acest sens, se recurge la utilizarea unor substraturi ieftine și accesibile în conjunctura economică respectivă. Substituirea unui component din compoziția mediului nutritiv conduce la variații în randamentul de producere al enzimei. Astfel, influența diferitelor componente ale mediului de cultură asupra biosintezei unei enzime se determină prin studii de cercetare vizând creșterea celulară și reglarea metabolică impusă tehnogen.

Sursa de carbon utilizată în compoziția mediilor de cultură este suplinită în mod obișnuit de glucide de o anumită puritate sau de un produs de origine naturală conținând un amestec de glucide. Astfel, melasa de sfeclă sau de trestie este folosită în multe cazuri drept sursă de zaharoză. Alte surse de carbon utilizate în producția de enzime: siropul de glucoză, amidonul de porumb sau de cartofi, hidrolizatul de amidon de cereale (grâu, orez, porumb) sunt în mod frecvent folosite ca surse de glucoză, zerul – ca sursă de lactoză.

Sursa de azot poate fi de origine anorganică, cum ar fi: amoniacul, sărurile de amoniu sau amestecuri complexe de tipul extractului de drojdie, de porumb,

peptonă, făină de soia etc. Fosforul, sulful și cationii esențiali sunt, în general, suplinițI de sărurile anorganice. Uneori se adaugă elemente specifice în cantități mici, dar de obicei acestea sunt asigurate de apă sau de alte componente ale mediului.

Deoarece fenomenele de spumare sunt frecvent întâlnite în cazul culturilor aerate, este necesară adăugarea în mediile de cultură a agenților de antispumare, uleiuri sau grăsimi animale cu puncte de topire scăzute (ulei de floarea-soarelui și soia) sau utilizarea spărgătoarelor de spumă mecanice.

c) Sterilizarea

Sterilizarea este necesară pentru asigurarea omogenității populației culturilor intensive (prezența unui singur tip de microorganisme). Se sterilizează aparatajul, mediul de cultură, aerul și se folosește o cultură pură. Procedeele de sterilizare utilizate sunt de natură fizică, mecanică, chimică și sunt alese în funcție de materialul de sterilizat. Sterilizarea termică este metoda cea mai utilizată la nivel industrial: la temperaturi peste 60ºC încep să se distrugă formele termolabile, iar la 160ºC sunt distruși și cei mai rezistenți spori bacterieni.

d) Fermentarea

Fermentarea cuprinde totalitatea proceselor biochimice prin care microorganismele produc energie, elaborează metaboliții (care reprezintă, de regulă, scopul biosintezei) și se multiplică.

e) Separarea și purificarea

Înainte de a fi purificate, produsele organice de interes obținute pe cale biotehnologică sunt în prealabil izolate din lichidul de cultură (dacă sunt extracelulare) sau din biomasă (daca sunt intracelulare) utilizând metode de separare general valabile pentru toate produsele de biosinteză.

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză se face prin filtrare, centrifugare, decantare, concentrare a fazei lichide, dezagregare a celulelor (pentru produsele intracelulare), extracție, uscare, atomizare. Pot fi aplicate și procedee specifice: precipitarea cu solvenți sau cu săruri anorganice, purificarea și concentrarea prin ultrafiltrare.

Echipamentele industriale implicate sunt complexe și specifice. Schema de flux variază de la un produs la altul.

Dificultățile provin din faptul că produsele farmaceutice obținute, în general, prin biosinteză sunt sensibile la acțiunea temperaturii, variația pH-ului, acțiunea substanțelor chimice. Pentru a selecta o metoda de separare corespunzătoare a produselor biosintetizate, este necesar să se cunoască proprietățile fizico-chimice ale acestora, și anume:

- *solubilitatea* în apă sau în soluții diluate ale sărurilor; în solvenți organici

polari (metanol, etanol, acetonă) și puțin polari (cloroform, hidrocarburi);
- *stabilitatea în soluție* (influența pH-ului, temperaturii; a soluțiilor tampon, solvenților organici) și *stabilitatea în stare solidă* (influența temperaturii, umidității);
- *proprietățile fizice*: dializabilitatea prin membrane, adsorbția pe suprafețele solide, migrarea în câmp electric, sedimentarea în ultracentrifugă;
- *proprietățile chimice*: stabilitatea față de diverse enzime și substanțe chimice.

Pentru separarea produsului din mediile de biosinteză se aplică, în general, următoarele metode: *extracția cu solvenți organici*, *separarea pe schimbători de ioni*, *cromatografia*, *adsorbția*.

Cel mai des utilizate operații chimice și aplicate industrial în biotehnologia enzimelor sunt: *filtrarea*, *concentrarea*, *dezagregarea celulară* și *atomizarea*.

f) Filtrarea

Filtrarea mediilor de sinteză poate impune probleme tehnice determinate de compoziția complexă a mediilor și de caracteristicile biomasei (bacterii, fungi) formate în cursul procesului de biosinteză. De obicei, se utilizează una dintre următoarele metode de filtrare:

- pe materialul filtrant (pânză de filtru, hârtie) se aplică un strat subțire de material adjuvant (prin filtrarea unei suspensii apoase de adjuvant). Prin patul filtrant astfel format se execută operația de filtrare;
- adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat; se execută filtrarea, recirculând primele porțiuni de filtrat până la limpezirea totală a acestuia;
- raclarea permanentă a stratului de adjuvant, cu ajutorul unor cuțite speciale, astfel încât stratul de adjuvant de filtrare este menținut la o valoare optimă, iar viteza de filtrare este menținută constantă. Această variantă este aplicată în cazul filtrelor rotative.

O varianta a operației de filtrare frecvent utilizată în biotehnologie este filtrarea sterilizantă. La prelucrarea suspensiilor se face mai întâi o prefiltrare grosieră urmată de filtrarea sterilizantă propriu-zisă. Filtrarea sterilizantă are loc prin mai multe placi de filtru (din acetat de celuloză, azbest sau polimeri sintetici) cu diametru redus al porilor (de 0,22 μm), care rețin majoritatea bacteriilor.

Uscarea prin atomizare a mediilor de fermentare cu activitate enzimatică se folosește pentru materialele care în faza inițială sunt lichide (soluții, suspensii, paste subțiri). În uscatoarele de pulverizare, mediile lichide sunt pulverizate în particule de dimensiuni foarte mici (între 2 și 200 μm), de unde și denumirea metodei de atomizare. Uscarea are loc foarte repede, materialul nu are timp să se

încălzească peste limita admisibilă și temperatura mediului lui este apropiată de temperatura de evaporare a lichidului. Produsul uscat se obține sub formă de pulbere și nu este necesară o mărunțire ulterioară.

Pentru recuperarea produselor farmaceutice formate intracelular este necesară distrugerea membranelor celulare. Această operație se realizează prin *procedee de dezagregare*.

În funcție de natura agentului de dezagregare utilizat, procedeele de dezagregare a celulelor se clasifică în:

- *procedee mecanice*: dezagregarea celulelor în mori coloidale sau în mori vibratoare. Creșterea tempertaurii este evitată prin circulația unui agent de răcire prin mantaua aparatului;
- *procedee fizice nemecanice:* decomprimarea rapidă, prin înghețare lentă, (datorită creșterii volumului apei la trecerea în stare solidă) sau prin șoc osmotic. Dezintegrarea celulelor microbiene se poate efectua și prin acțiunea vibrațiilor ultrasonice cu frecvențe de cca 20000 Hz;
- *procedee chimice:* distrugerea componentelor lipoproteice ale membranei celulare și eliberarea în faza lichidă a produselor de interes se poate efectua prin acțiunea asupra membranelor a detergenților cationici sau anionici sau a solvenților organici;
- *procedee enzimatice:* lezarea celulelor bacteriene poate fi indusă prin acțiunea enzimelor care scindează selectiv legăturile α-1,4- dintre moleculele de *N*-acetilglucozamină și acidul *N*-acetilmuramic ale pereteului celular.

Concentrarea mediilor de biosinteză

Mediile de biosinteză sunt concentrate prin operații specifice industriei chimice, însă cu atenție sporită la protejarea componentelor biologice, datorită sensibilității și permeabilității acestora.

Concentrarea prin ultrafiltrare. Ultrafiltrarea este un proces de separare a componentelor unei soluții bazat pe diferențele de dimensiuni moleculare, utilizând o membrană semipermeabilă. Ultrafiltrarea este un procedeu de separare și purificare a substanțelor biologic active care prezintă următoarele avantaje:

- efectuarea concentrării la temperaturi scăzute reducând fenomenele de autodigerare și pierderea activității biologice a produselor de interes;
- nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
- nu utilizează substanțe chimice;
- se pot purifica soluții prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior produsului de interes.

În procesul de elaborare a unei tehnologii de obținere a unui produs, o atenție deosebită se acordă proceselor de ultrafiltrare, care urmăresc stabilirea

posibilităților de utilizare eficientă a unor tipuri de membrane la concentrarea și purificarea produselor biologic active. Ultrafiltrarea este frecvent utilizată în concentrarea și purificarea enzimelor de origine microbiană. De exemplu, în procesul de izolare și purificare a enzimelor, una dintre etape o constituie demineralizarea soluției enzimatice. Această operație are loc în paralel cu concentrarea prin ultrafiltrare, întrucât ionii anorganici, având volum mic, trec prin membrana de ultrafiltrare. Aplicarea metodei de concentrare prin ultrafiltrarea soluțiilor enzimatice exclude operația de dializă, frecvent utilizată într-un flux de purificare.

1.4. Procesul de creștere a microorganismelor

Viteza de multiplicare a microorganismelor este excepțional de mare. Durata de viață a unei generații este tipică pentru fiecare specie și poate varia la aceeași specie în funcție de condițiile de mediu.

Procesul multiplicării populațiilor bacteriene este bine cunoscut. Acesta cuprinde mai multe faze (Fig. 1.1.).

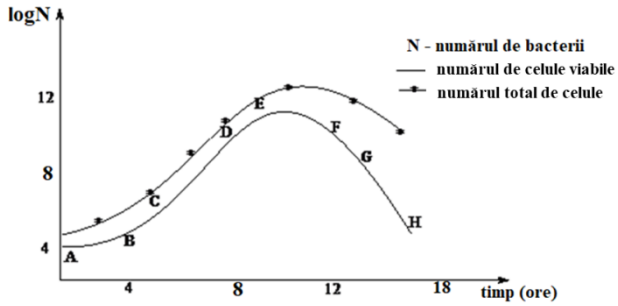


Figura 1.1. Curba de creștere a unei populații bacteriene (Gh. Zarnea)

unde: A → însămânțare; A-B → faza latentă sau lag; B-C → faza de accelerare a ritmului de creștere; C→ faza de multiplicare logaritmică sau log; D-E → faze de încetinire a ritmului de creștere; E-F → faza staționară; F-G → faza intermediară de declin; G-H → faza de declin.

Faza lag* sau *latentă este cuprinsă între momentul introducerii germenului în mediul de cultură (inoculare) și momentul în care celulele acestuia încep să se dividă. În aceasta fază, numărul microorganismelor din inocul rămâne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază durează în medie câteva ore. Faza latentă apare ca o perioadă de adaptare la noile condiții de cultivare. În această perioadă are loc adaptarea metabolismului prin sinteza enzimelor necesare pentru recunoașterea substratului. Durata perioadei de latență variază în funcție de noile condiții de mediu pe care microorganismele le

găsesc la transvazare. Cu cât condițiile noi (mediu nutritiv, temperatură, pH, aerație) sunt mai apropiate de cele anterioare, cu atât perioada de *lag* este mai scurtă.

Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică este precedată de o perioada scurtă (aproximativ 2–3 ore) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă. După această perioadă, diviziunile sunt bine sincronizate, astfel încât numărul celulelor viabile se dublează, la intervale regulate după o progresie geometrică 2, 2^0, 2^1, 2^2, 2^3, , 2^n.

Faza de încetinire a creșterii corespunde perioadei în care, ca urmare a epuizării treptate a nutrienţilor, reducerii concentrației în oxigen și acumulării compușilor de catabolism ce pot avea efect inhibitor asupra celulelor, creșterea ia toate valorile intermediare între creșterea cu o rată maximă și 0.

Faza staționară de creștere este atunci când se stabilește un echilibru între numărul de celule care se formează și cel al celulelor autolizate. Chiar dacă cantitatea de biomasă rămâne constantă, compoziția celulelor se schimbă. Datorită lezării unor celule se eliberează noi substraturi care vor servi drept nutrienţi pentru celulele vii. În cazul în care este necesară menținerea purității culturii de microorganise, faza staționară de creștere poate fi extinsă, prin modificarea unor factori care scad viteza metabolismului celular. Această fază poate dura de la câteva ore până la câteva zile, în funcție de sensibilitatea microorganismelor la condițiile de mediu.

Faza de declin corespunde unei scăderi progresive a numărului de celule vii din cauza decesului unui număr important de celule. Faza de declin a celulelor are loc ca urmare a:

- lipsei surselor de nutriție și energie;
- denaturării componentelor celulare în prezența substanțelor acumulate (alcooli, acizi etc.);
- procentului de celule autolizate.

Celulele din această fază sunt bătrâne și apar fenomene de involuție: celulele mici, sferice, deformate, gigante sau ramificate, care se colorează slab sau dezvoltă afinitate față de coloranții acizi.

1.5. Influența factorilor de mediu asupra creșterii microorganismelor

Creșterea microorganismelor într-un bioreactor este influențată de o serie de factori de mediu, dintre care cei mai importanți sunt:

- *concentrația substratului;*
- *calitatea și cantitatea inoculului;*
- *temperatura;*

- *pH-ul mediului de biosinteză;*
- *viteza de agitare;*
- *concentrația oxigenului dizolvat* (pentru bioprocesele aerobe);
- *suspendarea particulelor*.

Concentrația substratului. Mărirea concentrației de substrat în mediul de cultură poate duce la sporirea numărului de celule microbiene până la o anumită limită, când procesul de multiplicare este inhibat.

Mecanismele prin care are loc inhibiția sunt:

- reacție chimică cu una sau mai multe componente celulare;
- adsorbția sau complexarea unor enzime sau coenzime;
- intervenția în reacțiile biochimice (modificarea metabolismului);
- intervenția în disocierea complexelor enzimatice (inhibiția enzimatică);
- modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (pH, tărie ionică, constantă dielectrică, capacitate de solvatare);
- intervenția în funcțiile de control celular.

Din cauza acestor fenomene concentrațiile mari ale substratului inhibă dezvoltarea microorganismelor; procesul de inhibiție poate fi total. Din acest motiv, pentru un proces biotehnologic se determină concentrația optimă a substratului atât în momentul inițial, cât și pe parcursul procesului de biosinteză. De exemplu, pentru foarte multe bacterii concentrația de 10–15% a sursei de carbon (glucoză, zaharoză) este inhibitoare, concentrațiile optime ale sursei de carbon fiind până la 10%. Acesta este motivul pentru care în soluțiile foarte concentrate de zahăr (de ex., dulcețuri, siropuri) microorganismele în general nu se dezvoltă, de aceea aceste produse pot fi conservate pe o lungă perioadă de timp.

Calitatea și cantitatea inoculului. În majoritatea cazurilor, volumul inoculului ocupă între 3 și 10% din volumul total al culturii. Pentru fiecare proces tehnologic se stabilește așa-numitul „raport optim de inoculare” care definește dimensiunile optime ale inoculului.

În scopul obținerii unei productivități maxime în produsul de interes, în timpul procesului de biosinteză se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de dezvoltare și se determină parametrii specifici (numărul de germeni pe unitatea de volum sau conținutul lor în biomasa uscată raportat la unitatea de volum). Efectele determinate de mărimea și vârsta inoculului sunt specifice pentru diferite microorganisme.

De exemplu, la bacterii, cantitatea inoculului influențează etapele ulterioare de dezvoltare a culturii și metabolismul acesteia și, prin urmare, capacitatea de biosinteză a produsului de interes. Când se utilizează o cantitate mare de inocul, se micșorează faza *lag* datorită formării și acumulării unor metaboliți intermediari

esențiali care pot difuza în celule și în mediul de cultură mai rapid decât în cazul utilizării unui inocul mic. Uneori însă cantitățile mari de inocul determină apariția unui fenomen de autoinhibiţie din cauza sensibilității celulelor bacteriene față de unii produși metabolici intermediari. S-a observat că, în cazul bacteriilor, pentru inițierea dezvoltării unui inocul este necesară prezența în mediul de cultură a unei concentrații critice de metale grele. De exemplu, pentru un inocul de *Bacillus subtilis* este necesară prezența în mediul de cultură a unei concentrații minime de mangan, în vederea inițierii dezvoltării. Aceste cercetări subliniază importanța ionilor metalelor grele pentru faza *lag* la bacterii.

În cazul levurilor, cantitatea de inocul poate influența de asemenea durata fazei *lag* sau etapele ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

În cazul fungilor, importanța standardizării inoculului vegetativ este determinantă. Pentru obținerea unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul sub formă de suspensie de spori. De asemenea, poate să apară fenomenul de autoinhibiţie sau autostimulare a germinării sporilor datorită prezenței unor substanțe produse în timpul germinării sau în fazele ulterioare. În cazul fungilor, cantitatea de inocul influențează mărimea și forma miceliului, precum și randamentul în metaboliți. Raportul de inoculare trebuie să fie stabilit astfel încât cantitatea de miceliu ce se va forma să nu fie prea mare în detrimentul secreției metabolitului de interes. O dezvoltare abundentă a masei miceliene conduce în același timp la un consum mare de sursă de carbon, cultura fiind astfel ineficientă.

Temperatura. Temperatura mediului în care are loc procesul de biosinteză este un factor extrem de important pentru dezvoltarea și activitatea microorganismelor. Temperatura este un factor care acționează în mod direct asupra microorganismelor; diferența dintre temperatura mediului înconjurător și cea din interiorul celulei trebuie să fie nulă. Pentru un proces de biosinteză industrial, temperatura este considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanți, iar efectele acesteia sunt folosite în optimizarea procesului.

Variațiile temperaturii influențează randamentul de transformare a substratului în produsul dorit, preferințele nutritive ale microorganismului și compoziția biomasei obținute, precum și viteza de creștere microbiană. În funcție de domeniul de temperatură în care microorganismele ating viteza maximă de creștere, acestea se clasifică în: *criofile*, *mezofile* și *termofile*. Microorganismele industriale sunt în general mezofile; ele prezintă o viteză maximă de creștere în intervalul 25–35ºC.

Temperatura mediului de biosinteză influențează creșterea microorganismelor prin acțiunea asupra proceselor metabolice ce determină compoziția biomasei în proteine, lipide, ARN etc. Membrana celulară se adaptează la variațiile termice în anumite intervale prin modificarea organizării straturilor lipidice.

Efectul pH-ului asupra creşterii microorganismelor. Valoarea pH-ului este un parametru important în procesele de biosinteză. Influența pH-ului asupra dezvoltării culturilor microbiene poate fi evidențiată prin:

- *viteza net specifică de creștere a microorganismelor* care atinge valoarea maximă la pH optim pentru dezvoltare. De exemplu, pentru anumite specii de drojdii domeniul optim de pH se situează între valorile de pH 4 şi 5. Există însă și specii de drojdii care cresc la valori de pH spre 2 sau, dimpotrivă, la valori ridicate ale pH-ului de aproximativ 8 (de ex., drojdiile din genul *Rhodotorula* folosite pentru biosinteza fenilalaninei). Cultivarea microorganismelor la valori scăzute ale pH-ului (3 – 4) prezintă avantajul unui risc mai scăzut de contaminare, ceea ce este apreciat în mod deosebit în cazul unei cultivări industriale;
- *randamentul de conversie a substratului la produsul de interes*. Formarea produsului de interes în procesul de biosinteză poate să fie legată de un domeniu foarte îngust de pH. În timpul dezvoltării unei culturi microbiene, pH-ul poate varia în raport cu valoarea optimă, ceea ce poate avea consecințe nefaste asupra procesului de biosinteză. Variația pH-ului poate fi determinată fie de consumul unui nutrient (sursa de carbon sau de azot), fie de producerea unui acid organic de către microorganism. Pentru ajustarea pH-ului la valoarea optimă se adaugă selectiv diverse substanțe chimice (acizi – HCl, H_2SO_4, H_3PO_4, baze – NaOH, KOH sau amoniac gazos, soluții ale sărurilor – KH_2PO_4, $NaHPO_4$ ș.a.) în funcție de mai mulți factori: de necesarul în ionii de Na^+ și K^+ al microorganismului; de caracteristicile microorganismului (ionul Cl^- să nu inhibe creșterea), de compoziția chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric ar putea conduce la formarea unor săruri greu solubile), precum și de materialul de construcție a vaselor de reacție și a bioreactoarelor (probleme de coroziune);
- *efectul de disociere a acizilor şi bazelor*. pH-ul acționează asupra caracteristicilor suprafeței celulei, modificând proprietățile acesteia de aderare la diferite materiale (sticlă, metale), precum și cele de floculare.

Concentrația oxigenului dizolvat. În culturile aerobe, este esențial să se realizeze dizolvarea în mediu a cantității de oxigen necesare microorganismului în orice moment al fermentării. În cazul în care procesul de biosinteză se desfășoară în

laborator în baloane cu agitare, aerarea depinde de *viteza de rotație a agitatorului* și de *volumul baloanelor Erlenmayer*.

Eficiența aerării unui mediu de cultură este definită de concentrația de oxigen dizolvat. Alegerea parametrilor sistemului de aerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantități de oxigen suficiente pentru a asigura o valoare maximă a activității metabolice în reactoarele de biosinteză. Pentru decurgerea unui proces în condiții optime, se efectuează calcule privind *necesarul de oxigen al microorganismului* și *viteza de barbotare a acestuia*.

Necesarul de oxigen al culturii este influențat de tipul sursei de carbon folosit în procesul de biosinteză. De exemplu, la fungii din genul *Penicillium* necesarul de oxigen este dublu la utilizarea glucozei ca sursă de carbon față de zaharoză.

Alți factori care influențează transferul de O_2 sunt:

- *agenții tensioactivi* din mediul de cultură care determină o micșorare a coeficienților de transfer de masă;
- *densitatea celulară*: la concentrații ridicate vâscozitatea mediului crește, iar eficiența sistemului de aerare scade, bulele au tendința să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare;
- *sistemul de agitare* al bioreactorului influențează concentrația oxigenului dizolvat: o agitare optimă a mediului de cultură conduce la o dispersie eficientă a bulelor de aer și, deci, la mărirea coeficientului de transfer al oxigenului;
- echipamentul de aerare utilizat influențează dispersia bulelor de aer.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Descrieți etapele de dezvoltare ale biotehnologiei și principalele domenii de utilizare.
2. Descrieți principalele etape ale evoluției biotehnologiei ca știință și descoperirile semnificative care au marcat dezvoltarea acesteia.
3. Prezentați exemple de produse biotehnologice utilizate în industria farmaceutică și cosmetică și explicați importanța acestora.
4. Evaluați avantajele obținerii pe cale biotehnologică a substanțelor medicamentoase și cosmetice față de alte metode.
5. Propuneți și explicați etapele generale ale unui proces biotehnologic incluzând controlul factorilor operaționali.
6. Modelați și analizați curba de creștere a microorganismelor.
7. Evaluați influența factorilor de mediu asupra dezvoltării microorganismelor și propuneți soluții pentru optimizarea condițiilor de cultură.

8. Propuneți metode de optimizare a productivității într-un proces biotehnologic.
9. Argumentați importanța selectării unui anumit microorganism pentru fiecare proces biotehnologic și influența acestuia asupra productivității produsului final.
10. Propuneți metode și echipamente de sterilizare și condiționare a mediului pentru a susține creșterea optimă a microorganismelor în timpul unui proces biotehnologic.

BIBLIOGRAFIE

1. SAURABH, B. History, scope and development of biotechnology (Chapter 1). In: *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*, Volume 1, IOP Publishing Ltd, 2018, pp. 1-61. ISBN 978-0-7503-1299-8. https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1299-8ch1.
2. FARCAS, A. Biotehnologii farmaceutice. Cluj-Napoca: Presa Universitară Clujeană, 2021. 288 p. ISBN 978-606-37-1276-0.
3. WITTMANN, C., LIAO, J. C. *Industrial biotechnology: products and processes*. Wiley-VCH, 2017. 640 p. ISBN 978-3-527-34181-8.
4. PANDEY, A., HÖFER, R., TAHERZADEH, M., NAMPOOTHIRI, M., LARROCHE, C. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier, 2015. 730 p. ISBN 9780444634641.
5. PATEL, R.N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018, 26(7), pp. 1252–1274. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.02.
6. GOMES, C., SILVA, A.C., MARQUES, A.C., SOUSA LOBO, J., AMARAL, M.H. Biotechnology Applied to Cosmetics and Aesthetic Medicines. In: *Cosmetics*, 2020, 7(2), 33. https://doi.org/10.3390/cosmetics7020033.
7. DANIELSON, N., MCKAY, S., BLOOM, P., DUNN, J., JAKEL, N., BAUER, T., HANNON, J., JEWETT, M.C., SHANKS, B. Industrial Biotechnology – An Industry at an Inflection Point. In: *Industrial Biotechnology*, 2020, 16(6), pp. 321-332. https://doi.org/10.1089/ind.2020.29230.nda.
8. KRASTEVA, G., GEORGIEV, V., PAVLOV, A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. In: *Engineering in Life Sciences*, 2020, 21(3-4), pp. 68–76. https://doi.org/10.1002/elsc.202000078.
9. NIELSEN, J., TILLEGREEN, C.B., PETRANOVIC, D. Innovation trends in industrial biotechnology. In: *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(10), pp. 1160 – 1172. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.007.
10. ALLEN, R.J., WACLAW, B. Bacterial growth: a statistical physicist's guide. In: *Rep. Prog. Phys*, 2019, 82(1), 016601. https://doi.org/10.1088/1361-6633/aae546.

11. ZARNEA, G., MENCINICOPSCHI, Gh., BRĂGĂREA, Șt. *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*. București: Editura Tehnică, 1980. 418 p.
12. GUPTA, V., SENGUPTA, M., PRAKASH, J., TRIPATHY, B.C. An Introduction to Biotechnology. In: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 2016, pp. 1–21. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_1.
13. IVANOV, V., STABNIKOV, V. Basics of Biotechnology for Civil and Environmental Engineers. In: *Construction Biotechnology. Green Energy and Technology*. Singapore: Springer, 2017, pp.23-40. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1445-1_2.
14. BULL, A.T., WARD, A.C., GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3), pp. 573-606. https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.573-606.2000.
15. MOSHELION, M., ALTMAN, A. Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology. In: *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(6), pp. 337–342. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.001.

2. BIOTEHNOLOGIA PENICILINELOR NATURALE

1. Antibiotice: istoric, clasificarea, structura și mecanismele de acțiune
2. Peniciline: clasificarea, structura chimică, mecanismul de acțiune și proprietățile biologice
3. Structura și nomenclatura penicilinelor naturale
4. Biosinteza penicilinelor naturale
5. Biotehnologia penicilinelor naturale: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare, purificare și condiționare

Abilități

Studentul:

- relatează despre istoria descoperirii antibioticelor;
- prezintă structura și mecanismele de acțiune a antibioticelor;
- enumeră tipurile de peniciline naturale;
- explică mecanismul biochimic care determină rezistența microorganismelor la antibiotice;
- scrie reacțiile de biosinteză a penicilinelor naturale;
- relatează despre materiile prime și principalele echipamente folosite în fermentarea, separarea și purificarea penicilinelor naturale;
- descrie etapele și parametrii tehnici ai unui proces biotehnologic de biosinteză a penicilinelor naturale;
- elaborează scheme tehnologice de producere industrială, separare și purificare a penicilinelor naturale;
- propune metode de condiționare a penicilinelor naturale în scopul ameliorării proprietăților biologic active.

2.1. Antibiotice: istoric, clasificarea, structura și mecanismele de acțiune

Antibioticele, la momentul actual, reprezintă cele mai importante produse comerciale obținute prin biosinteză și sunt substanțe chimice produse de microorganisme, care distrug sau inhibă creșterea altor microorganisme.

În 1921, ca urmare a studiilor din timpul carierei sale militare, *Alexander Fleming* descoperă o enzimă natural antiseptică, pe care a numit-o ***lizozim***. Această substanță există în țesuturi și secreții naturale, precum mucus, lacrimi și albușul de ou, dar care nu a avut un efect important asupra germenilor patogeni. Într-o dimineață din septembrie 1928, când Alexander Fleming se întorcea dintr-o vacanță, a găsit în laboratorul său plăci cu culturi vechi de stafilococi, contaminate cu alte specii microbiene. În timp ce făcea decontaminarea acestor plăci, a observat

o inhibiție a creșterii în jurul unei ciuperci (mucegai). Acest fapt i-a atras atenția deoarece cercetările sale anterioare erau axate pe descoperirea unor agenți antibacterieni. Fleming a identificat ciuperca *Penicillium notatum,* iar extractul obținut din aceasta l-a numit *penicilină*. Această substanță activă, nou descoperită, a fost eficace chiar și atunci când a fost diluată de 800 de ori. În 1929 publică această descoperire în „*British Journal of Experimental Pathology*“. Cu toate acestea, abia în 1940 Chain, Florey și Abraham, la Oxford, prin liofilizare, au reușit să izoleze penicilina din mediul de cultură (*Penicillium notatum)* și să o introducă în terapia antiinfecțioasă. Pentru această descoperire, care a revoluționat științele medicale, în 1944 Alexander Fleming a fost înnobilat cu titlul de „Sir“, iar în 1945 Fleming, Florey şi Chain devin laureați ai Premiului Nobel pentru Fiziologie și Medicină.

Anii 1940-1960 sunt anii de glorie, când au fost descoperite cele mai multe dintre antibioticele utilizate în prezent. În deceniile 1980–1990, cercetările genetice s-au concentrat pe descifrarea genomului bacterian și pe identificarea țintelor moleculare specifice din celula bacteriană asupra cărora acționează antibioticele. În prezent sunt cunoscute numeroase clase de agenți antimicrobieni, clasificate pe baza mecanismelor lor de acțiune.

Aminoglicozidele au fost descoperite cu peste 75 de ani în urmă. La începutul anilor 1940 a fost descoperită prima aminoglicozidă – streptomicina – din *Streptomyces griseus*. În 1949 şi 1957 neomicina şi, respectiv, kanamicina au fost izolate din alte specii de *Streptomyces*, iar în anii 1960 a fost descoperită gentamicina – din *Micromonospora purpurea*. Primii derivați semisintetici au fost obținuți şi caracterizați în anii 1970 (netilmicina – derivată din sisomicină – şi amikacina – derivată din kanamicină).

***β*-Lactaminele**. În ultimii 35 de ani au fost dezvoltate noi antibiotice *β*-lactamice. Familia *β*-lactaminelor include peniciline şi derivaţi, cefalosporine, carbapeneme, monobactame, inhibitori ai *β*-lactamazei. În ceea ce privește penicilina care este unul dintre cele mai vechi antibiotice, este important de a semnala că aceasta încă este activă față de multe bacterii; este în continuare antibioticul de selecție pentru infecțiile cauzate de *Streptococcus pyogenes* (streptococul *β-hemolitic* de grup A), până în momentul actual nefiind detectată nicio tulpină de SGA rezistentă la penicilină.

Dintre glicopeptide, vancomicina a fost izolată ca produs de fermentare dintr-o bacterie din sol, *Streptomyces orientalis*, care prezintă activitate antimicrobiană, fiind introdusă în terapia antimicrobiană la sfârșitul anilor 1950. Aproape 35 de ani mai târziu a urmat un alt antibiotic glicopeptidic, teicoplanina.

Din clasa macrolidelor, eritromicina A a fost descoperită la începutul anilor 1950. Principala componentă structurală a acestei molecule este un inel lactonic legat prin legături glicozidice de structuri zaharidice şi/sau aminozaharidice. Pentru a depăși limitările eritromicinei, cum ar fi instabilitatea chimică, absorbţia slabă şi gustul amar, au fost dezvoltate şi alte macrolide, care au inelul lactonic cu 14, 15 şi 16 atomi de carbon, cum ar fi claritromicina şi azitromicina.

Dintre tetracicline, clortetraciclina a fost prima izolată în 1948 din *Streptomyces aureofaciens*. În deceniile următoare au mai fost izolate oxitetraciclina și tetraciclina din alte specii de *Streptomyces*; de asemenea, au fost dezvoltate tetracicline semisintetice: doxiciclina, minociclina. Tetraciclinele au constituit primul grup major de antibiotice la care s-a utilizat termenul „*antibiotice cu spectru larg*“. Datorită spectrului larg de activitate, siguranței relative și costului redus, tetraciclinele au fost utilizate pe scară largă în toată lumea, ocupând locul doi în consumul mondial după penicilină.

Clasificarea antibioticelor

1. În funcție de acțiunea lor, antibioticele sunt de două tipuri:

bactericide – omoară bacteriile, interferând formarea peretelui celular al bacteriei, sau cu formarea conținutului celular al acesteia. Exemple de antibiotice bactericide: penicilina, fluorochinolonele, metronidazolul, nitrofurantoina, cotrimoxazolul;

bacteriostatice – stopează multiplicarea bacteriilor fără să le omoare, interferând cu sinteza proteică bacteriană, replicarea ADN-ului sau alte aspecte ale metabolismului celulei bacteriene. Exemple de antibiotice bacteriostatice: tetraciclinele, sulfonamidele, trimetoprimul, cloramfenicolul, macrolidele şi lincozamidele.

2. În funcție de spectrul de activitate, acestea sunt:

antibiotice cu spectru larg, sunt active atât față de microorganismele gram-pozitive, cât și față de cele gram-negative; de obicei, sunt indicate în cazul infecțiilor polimicrobiene, de exemplu în infecțiile abdominale cu germeni anaerobi. Exemple de antibiotice cu spectru larg: tetracicline, fenicoli, fluorochinolone, cefalosporine de generația a 3-a și a 4-a;

antibiotice cu spectru redus (îngust), au activitate limitată și sunt utilizate numai față de o anumită specie bacteriană; de exemplu, într-o infecție cutanată stafilococică. Exemple de antibiotice cu spectru îngust: glicopeptidele și bacitracina sunt eficiente doar împotriva bacteriilor gram-pozitive; polimixinele sunt eficiente numai față de bacteriile gram-negative; aminoglicozidele și

sulfonamidele sunt eficiente numai față de microorganismele aerobe, iar nitroimidazolii sunt în general eficienți numai pentru bacteriile anaerobe.

3. În funcție de modul de acțiune asupra bacteriilor sau acțiunea fiziologică, antibioticele inhibă:

- *formarea peretelui bacterian;*
- *formarea membranei citoplasmatice;*
- *sinteza proteică;*
- *replicarea acizilor nucleici;*
- *diferite procese metabolice*.

Structura generală a unor clase de antibiotice este prezentată în tabelul A.2.1.

Mecanisme de acțiune a antibioticelor

Diferite antibiotice acționează în mod diferit, în funcție de natura structurii acestora și de gradul de afinitate față de anumite situsuri-ţintă din celula bacteriană. Astfel, antibioticele pot acționa împotriva agenților bacterieni prin diverse mecanisme, precum:

Inhibiția sintezei peretelui bacterian este foarte importantă pentru viața agenților bacterieni. Un antibiotic care țintește peretele celulei bacteriene poate să distrugă sau să inhibe bacteria. Exemple de astfel de antibiotice: β-lactaminele (penicilinele, cefalosporinele), glicopeptidele (vancomicina), de natură fosfonică (fosfomicina).

Inhibiția sintezei membranei celulare. Membranele celulare sunt bariere importante, care separă și reglementează fluxul intra- şi extracelular al substanțelor. O întrerupere sau deteriorare a acestei structuri reduce viabilitatea celulei bacteriene. Membranele celulare sunt prezente atât la celulele procariote, cât și la cele eucariote. Acțiunea acestor antibiotice este puțin selectivă, putând fi toxice pentru mamifere dacă se utilizează pe cale sistemică. Prin urmare, utilizarea clinică este limitată la aplicații topice. Exemple: gramicidine (gramicidinele A, B şi C) şi polimixine (polimixina B și colistin).

Inhibiția sintezei proteice. Enzimele și structurile celulare sunt compuse din proteine. Sinteza proteinelor este un proces esențial pentru multiplicarea și supraviețuirea tuturor celulelor bacteriene. Câteva tipuri de agenți antimicrobieni inhibă sinteza proteinelor bacteriene, prin legarea la subunitatea 30S sau 50S a ribozomilor intracelulari. Acest fapt blochează metabolismul bacterian ce determină moartea sau inhibiția creșterii și multiplicării bacteriene. Exemple: aminoglicozide, macrolide, lincozamide, streptogramine (MLS), cloramfenicol, tetracicline, trimetoprim/sulfametoxazol.

Inhibiția sintezei acizilor nucleici. ADN-ul și ARN-ul sunt cheia pentru replicarea tuturor formelor vii, inclusiv a bacteriilor. Unele antibiotice acționează prin legarea la substanțele implicate în procesele de sinteză a ADN-ului și ARN-ului, interferând cu procese normale celulare și astfel compromit multiplicarea și supraviețuirea bacteriană. Exemple: fluorochinolone, metronidazol și rifampicina.

Inhibitori ai altor procese metabolice. Alte antibiotice interferă procesele celulare esențiale vizând supraviețuirea agenților bacterieni patogeni. De exemplu, sulfonamidele și trimetoprimul întrerup formarea acidului folic, care este o etapă necesară în producerea de către bacterie a precursorilor importanți pentru sinteza ADN-ului. Sulfonamidele se leagă la dihidropteroat-sintetază, iar trimetoprimul inhibă dihidrofolat-reductaza; aceste enzime sunt esențiale pentru producerea acidului folic.

2.2. Peniciline: clasificarea, structura chimică, mecanisme de acțiune și proprietățile biologice

Penicilinele sunt antibiotice naturale sau de semisinteză, având comun nucleul de bază, *acidul 6-aminopenicilanic* (Fig. 2.1), un acid monobazic format dintr-un inel tiazolic şi unul *β*-lactamic. Penicilinele au la baza un sistem heterociclic numit *penam* format prin condensarea unui ciclu azetidin-2-onic (*β*-lactamic) cu un ciclu tiazolidinic (Fig. 2.2). Penicilinele sunt inhibitoare ale sintezei peretelui bacterian și fac parte din grupa chimioterapicelor antibacteriene *β*-lactamice.

Atomii de carbon 2, 5, 6 sunt asimetrici, având configurațiile absolute [2*S*, 5*R*, 6*R*]. Prezența celor trei atomi de carbon asimetrici face ca penicilinele sa fie substanțe optic active.

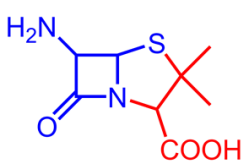


Figura 2.1. Formula de structură a acidului 6-aminopenicilanic

Clasificarea penicilinelor

1. Peniciline naturale *(Tab. A.2.2)*: benzilpenicilina (penicilina G); procainpenicilina (penicilina G procainică); benzatinpenicilina (penicilina G benzatinică); fenoximetilpenicilina (penicilina V) etc.
2. Peniciline de semisinteză:

- *Cu spectru îngust de acțiune*: izoxazolilpeniciline (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina).
- *Cu spectru larg de acțiune*: aminopeniciline (ampicilina, amoxicilina), carboxipeniciline (carbenicilina, ticarcilina), ureidopeniciline (piperacilina, mezocilina, azlocilina), amidinopeniciline (furazlocilina).

Pe lângă *clasificarea structurală* a penicilinelor, o importanță foarte mare pentru practica clinică o reprezintă clasificarea farmacologică a acestora. Fiecare element structural specific penicilinelor contribuie atât la acțiunea terapeutică, cât și la stabilitatea chimică și/sau enzimatică a moleculei, absorbție etc. (Fig. A.2.1).

Mecanismele de acțiune a penicilinelor privind inhibiția sintezei peretelui bacterian pot avea loc prin legarea covalentă la receptori specifici (penicilinele leagă proteinele prin inhibiția transpeptidazei sau prin activarea autolizinelor). Principalul mecanism de acțiune a antibioticelor *β-lactamice* se referă la blocarea biosintezei stratului peptidoglicanic. Peptidoglicanul este un heteropolimer format din polizaharide unite prin peptide (Fig. 2.2). Lanțul de polizaharide este format din acidul *N*-acetilmuramic (NAM) și *N*-acetilglucozamină (NAG) (Fig. 2.3).

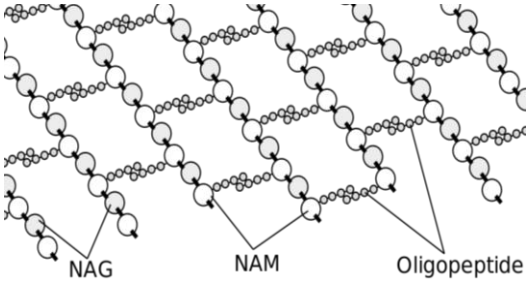


Figura 2.2. Structura peptidoglicanului

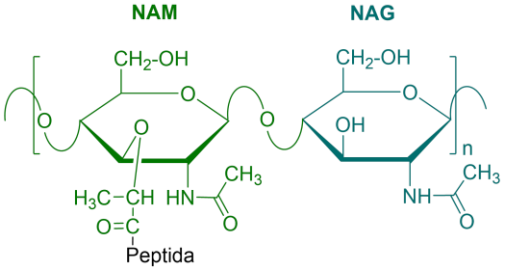
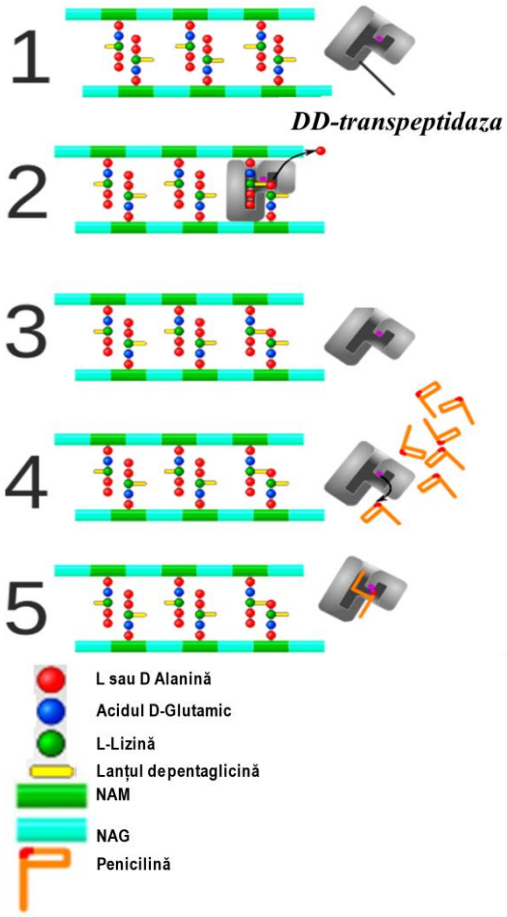


Figura 2.3. Structura polizaharidei formate din acidul *N*-acetilmuramic (NAM) și *N*-acetilglucozamină (NAG)

Legăturile dintre polizaharide sunt de tip *β*-1→4. Lanțurile de polizaharide sunt conectate prin fragmente peptidice formate din 3 până la 5 fragmente de aminoacizi, stabilite prin intermediul NAM (Fig. A.2.2). Grosimea stratului peptidoglicanic la G(+) este cuprins între 20 și 80 nm, iar la G(-) între 7 și 8 nm.

Biosinteza peptidoglicanului decurge în cinci etape. Antibioticele *β-lactamice* blochează biosinteza peptidoglicanului la etapele 4 și 5. Schematic acest proces este redat în figura 2.4.



Etapele 1-3 – reticularea stratului peptidoglicanic

În biosinteza stratului peptidoglicanic participă mai multe enzime. Una din ele, ***DD-transpeptidaza,*** catalizează **reticularea fragmentelor peptidice (transpeptidarea)**. Acest fapt are loc prin eliminarea unui fragment de **alanină (*D*- sau *L*-)** și legarea a **cinci fragmente de glicină** de restul rămas de **alanină,** care sunt ulterior conectate la un fragment de **lizină** din peptida învecinată.

Etapele 4 și 5 – blocarea procesului de biosinteză a peptidoglicanului de către *β*-lactame

β-Lactamele sunt similare structural **fragmentului *D*-alanil-alanină (substrat)**, care participă în transpeptidare, de aceea concurează cu acesta pentru a se lega de enzimă. Astfel, *β*-lactamele se leagă de DD-transpeptidaze (**numite și antibiotice care leagă proteinele**) și astfel blochează activitatea acestora. Acest fapt determină distrugerea stratului peptidoglicanic și moartea celulară (liza celulară).

Figura 2.4. Mecanismul de blocare a biosintezei peptidoglicanului de către *β*-lactame

2.3. Structura și nomenclatura penicilinelor naturale

Penicilinele naturale, ca și cele de semisinteză, au structura generală prezentată în figura 2.5 (a), unde ciclul *tiazolidin β-lactamic* conține trei atomi de carbon asimetrici (*), figura 2.5 (b), ale căror configurații absolute sunt: C_2 – (*S*), C_5 - (*R*), C_6 – (*R*), care asigură activitatea antibiotică propriu-zisă. Ciclul pentaatomic de tiazolidină tinde spre planeitate, iar câteva unghiuri caracteristice sunt după cum urmează: $C_5S_4C_3$ – 95,2º; $C_2N_1C_7$ – 125º; $S_4C_5C_6$ – 119,7º.

Conform sistemului internațional IUPAC, penicilinele sunt considerate ca derivați ai biciclohеptanului, în care atomii de carbon din pozițiile 1 și 4 sunt

substituiți prin azot (azo) și respectiv sulf (tia). Astfel, penicilinele sunt amide ale acidului (3*S*, 5*R*, 6*R*)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-aza-bicicloheptan-2-carboxilic. Pentru fiecare dintre peniciline, prefixul 6-amino este înlocuit cu numele restului corespunzător.

Penicilinele naturale sunt produse de *Penicilium notatum/crysogenum*. Ele diferă după tipul radicalului R (Fig. 2.5 (a)) și sunt notate cu litere ale alfabetului latin sau cu cifre romane.

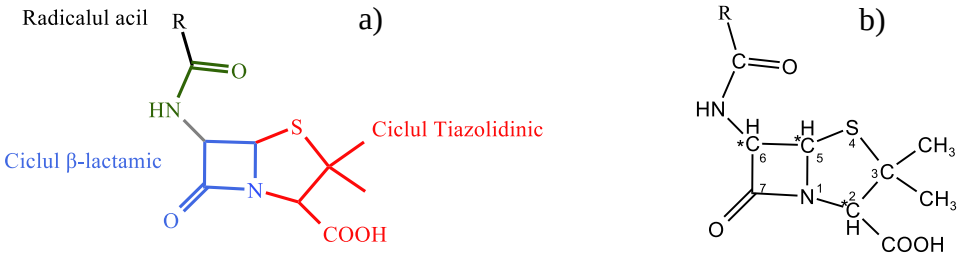


Figura 2.5. Formula generală de structură a penicilinelor (a) și centrele de chiralitate (b)

Clasificarea penicilinelor naturale în funcție de radicalul acil și denumirea acestora sunt prezentate în tabelul A.2.2.

În scopul simplificării nomenclaturii penicilinelor, acestea au fost denumite amide ale acidului 6-amino penicilanic, pentru care în literatura în limba română se utilizează cel mai frecvent abrevierea acid 6-AP (în unele cazuri abrevierea folosită este 6-APA, care provine din denumirea în limba engleză: 6-aminopenicillanic acid). Denumirea Comună Internațională (D.C.I.) a penicilinelor prevede abrevierea acidul 6-AP, care include un prefix corespunzator structurii chimice și un sufix „cilina".

2.4. Biosinteza penicilinelor naturale

O tulpină de microorganisme produce multe antibiotice cu structură similară, însă cu activitate biologică diferită. Dar în procesul de biosinteză dirijată, prin adăugarea de diferiți precursori chimici: A_1, A_2, A_3, … A_n., pot fi obținute antibiotice de interes, ca în exemplul din figura 2.6.

Din totalitatea penicilinelor naturale, utilitate practică au penicilinele G și V, obținute industrial, în scopul comercializării sau ca materie primă pentru obținerea acidului 6-APA, care este folosit la obținerea penicilinelor semisintetice. Mecanismul de biosinteză dirijată a penicilinelor G (Fig. A.2.3) și V (Fig. A.2.4), decurge în trei etape consecutive.

Inițial are loc condensarea acizilor *L*-aminoadipic și *L*-cisteina cu formarea *N*-(*L*-aminoadipinoil)-*L*-cisteinei, care ulterior condensează cu *L*-valină cu

formarea tripeptidei *δ*-(*L*-2-aminoadipil)-*L*-cisteinil-*D*-valină. Ambele reacții sunt catalizate de enzima *δ*-(*L*-α-aminoadipil)-*L*-cisteinil-*D*-valin-sintetaza (ACVS), peptidă non-ribozomală.

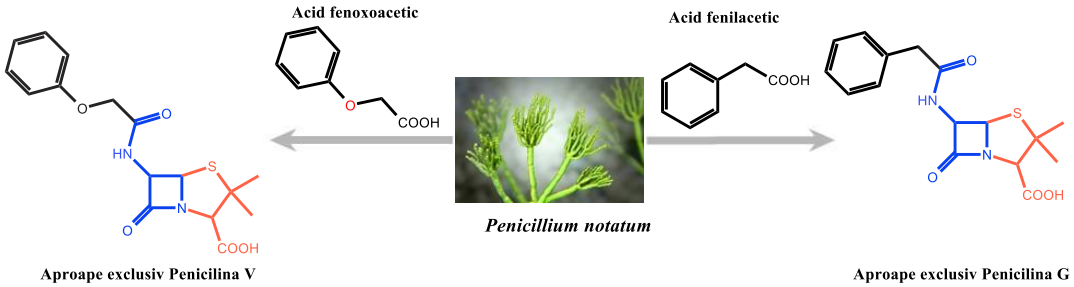


Figura 2.6. Biosinteza dirijată a penicilinei G sau V, din *Penicillium notatum*, prin adăugarea unui precursor chimic corespunzător

A doua etapă a biosintezei penicilinei G este ciclizarea oxidativă a tripeptidei într-o moleculă biciclică, denumită izopenicilina N. Reacția are loc în prezența enzimei izopenicilin *N*-sintetaza (IPNS).

Izopenicilina N este un intermediar care nu prezintă activitate antibiotică, de aceea este convertită ulterior în penicilina G sau V prin adăugarea precursorilor chimici: acidul fenilacetic (Fig. A.2.3) și acidul fenoxiacetic (Fig. A.2.4) corespunzător. În această reacție de transamidare catalizată de izopenicilin *N*-*N*-aciltransferaza are loc substituirea fragmentului *α*-aminoadipil din izopenicilina N prin fragmentul aciloil corespunzător.

2.5. Biotehnologia penicilinelor naturale: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare, purificare și condiționare

1. *Selectarea microorganismelor și determinarea compoziției mediului nutritiv*

Mediul nutritiv asigură condițiile pentru dezvoltarea microorganismelor și producerea antibioticelor. Compoziția mediului de cultură diferă în funcție de etapele procesului biotehnologic și de tipul microorganismului implicat în biosinteză.

Mediul nutritiv conține: sursă de carbon, surse de constituție, factori activi, regulatori ai pH-ului, precursori, oligoelemente etc.

a) În calitate de sursă de carbon pot fi zaharidele brute sau zaharidele de puritate înaltă:

- zaharoza, glucoza, lactoza de diferită puritate;
- amidonul din porumb sau din cartofi;
- melasa din sfecla de zahăr;
- unele microorganisme au nevoie de molecule proteice ca sursă nutritivă.

b) În calitate de surse de constituție servesc aminoacizii și polipeptidele introduse sub formă de concentrate de peptonă sau în formă brută: făină de soia, mazăre, porumb.

c) Dintre principalii factori activi sunt azotul și fosforul.
Ca sursă de N se folosește: $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, $(NH_4)_3PO_4$
Ca sursă de P se folosește: K_3PO_4, $(NH_4)_3PO_4$.

d) Oligoelementele sunt o clasă de nutrienți constituită din elemente minerale pure necesare vieții în cantități foarte mici. Se adaugă la etapa de fermentare sub formă de săruri solubile de Mn, Mg, Co, Zn în concentrații de ordinul μg/L. Extractul de porumb este important deoarece are un conținut înalt de N și P, de aminoacizi și vitamine.

2. Pregătirea mediului nutritiv

a) Inițial se introduce apa în fiecare vas pentru pregătirea mediului: inoculator, intermediar și fermentatorul de regim (Fig. A.2.5).

b) Apa introdusă se încălzește la temperatura de 50-60ºC.

c) Se dozează extractul de porumb din rezervor (în acest caz principala sursă de aminoacizi) și se fierbe timp de 40-60 min.

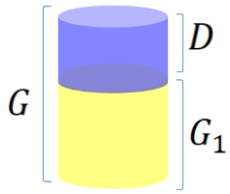
d) Amestecul se răcește până la 50-60ºC și se dozează restul componentelor în ordinea: $CaCO_3$, NH_4NO_3, Na_2SO_4, $MgSO_4$, $MnSO_4$; KH_2PO_4, $ZnSO_4$, lactoză și glucoză. Lactoza și glucoza se adaugă doar în vasele pentru pregătirea mediului pentru fermentorul intermediar și fermentorul de regim.

În anumite cazuri glucoza și lactoza se dizolvă și se sterilizează separat, pentru a evita formarea bazelor Schiff (azometine) prin condensarea hidraților de carbon cu aminoacizii și/sau moleculele proteice (Fig. A.2.6).

3. Sterilizarea mediului nutritiv

A treia etapă în procesul de biosinteză a penicilinelor este sterilizarea mediului nutritiv, care se face cu abur direct, de aceea din cantitatea de apă care se adaugă pentru prepararea mediului se scade cantitatea de apă acumulată din condensarea aburului în timpul sterilizării.

Astfel, ținând cont de bilanțul de materiale **(a)** și de bilanțul termic (**b**) se poate calcula cantitatea de abur ce condensează la sterilizare:



$$G = G_1 + D \quad (2.1)$$

$$G \cdot C_p(t_s - t_i) = D \cdot r + D \cdot C_{pa}(t_a - t_s) \quad (2.2)$$

$$D = \frac{G \cdot C_p(t_a - t_i)}{r + C_{pa}(t_a - t_s)} \quad (2.3)$$

unde: G – cantitatea totală a mediului ce trebuie obținută pentru fermentare, kg;

G_1 – cantitatea de mediu care se prepară pentru sterilizare, kg;
D – cantitatea de abur care condensează la sterilizare, kg;
C_p – căldura specifică a mediului, $kJ \cdot kg^{-1} \cdot ^oC$;
C_{pa} – căldura specifică a apei, 4,19 $kJ \cdot kg^{-1} \cdot ^oC$;
r – căldura latentă de vaporizare, 2258 kJ/kg (P = 1,013 bar și t = 99,6ºC);
t_a, t_s, t_i – temperatura aburului, temperatura de sterilizare și temperatura inițială,ºC.

În cazul vasului cu mediu pentru fermentatorul inoculator (a), sterilizarea mediului are loc direct în *fermentatorul inoculator* A (Fig. A.2.5). Conservarea proprietăţilor aseptice ale culturilor monocelulare unice impune luarea unor măsuri riguroase atât în etapa de inoculare, cât şi în faza de transvazare dintr-un bioreactor în altul mai mare, pentru creşterea biomasei microbiene. Pentru însămânţarea aseptică a materialului de inoculare sunt cunoscute câteva tehnici, dintre care:

- inocularea sub protecţia unei flăcări;
- inocularea cu ajutorul unei instalaţii concepute pentru acest scop.

În primul caz flacăra trebuie să asigure sterilizarea zonei capacului în care se găseşte gura de inoculare, iar în timpul introducerii suspensiei de microorganism flacăra trebuie să asigure securitatea împotriva unei eventuale infestări.

Sterilizarea mediului de cultură în fermentatorul inoculator (A) se face cu ajutorul aburului direct la temperatura de 120-125ºC, timp de 10-12 minute. De menţionat că raportul dintre cantitatea de mediu supus sterilizării şi cantitatea de abur direct utilizat pentru încălzire trebuie să fie de aproximativ 10.

Pentru transvazarea biomasei microbiene dintr-un bioreactor în altul se poate folosi fie un racord flexibil şi o pompă peristaltică, fie transvazarea cu aer steril sub presiune. În prealabil se resterilizează toate traseele de trecere a biomasei, prin care se trece abur de 125-130ºC, timp de 20-25 minute. În cazul vaselor cu mediu pentru *fermentatoarele intermediar* B și *de regim* C, sterilizarea se face în instalația de sterilizare continuă (Fig. A.2.7). Aceasta este alcătuită din coloane de sterilizare (1), zonă de menținere termică (2) și unitate de răcire (3), mediul nutritiv pregătit se încălzește la 120-125ºC, timp de 10-12 min, apoi se răcește până la 60-65ºC. Coloana de sterilizare este concepută din două ţevi concentrice, prin ţeava interioară fiind introdus aburul, mediul de cultură circulând prin spaţiul dintre cele două ţevi. Încălzirea mediului se face prin barbotarea aburului prin intermediul fantelor practicate pe ţeava interioară, acesta fiind dirijat tangenţial şi uniform cu ajutorul unui şnec montat pe exteriorul ţevii. Mediul staţionează în coloană 4-6 secunde, după care pătrunde în zona de menținere termică, unde rămâne 10-12 minute pentru perfectarea procesului de sterilizare. În final, mediul este răcit,

într-un schimbător de căldură tip ţeavă în ţeavă, la 60-65ºC, temperatura la care este introdus în fermentator. Sterilizarea are ca scop distrugerea totală a oricăror microorganisme (bacterii, fungi etc.). Totuși, sterilizarea nu se poate efectua la temperaturi foarte înalte, deoarece există riscul descompunerii mediului nutritiv.

4. Fermentarea

Fermentarea are loc în 3 etape: inoculator, intermediar și de regim (Fig. A.2.5) care corespund unele etape de dezvoltare a microorganismelor. Principalii factori ce influențează fermentarea biochimică sunt:

- conformația genetică a microorganismului;
- compoziția echilibrată a mediului de cultură;
- dozarea corectă a raportului glucoză (sursa de energie pentru creșterea microorganismelor) și lactoză (sursa de energie pentru producerea penicilinei);
- dozarea corectă a precursorilor (acidului fenilacetic, pentru producerea penicilinei G; acidului fenoxiacetic, pentru producerea penicilinei V);
- substanțele minerale;
- necesarul de oxigen;
- pH-ul stabil la valorile 6,7-7,0.

Valorile parametrilor procesului de fermenatre, care trebuie menținuți, sunt prezentate în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Parametrii procesului de fermentare

Etapa de fermentare	**Temperatura, ^{0}C**	**Viteza de agitare, rpm**	**Debit aer $L \cdot L^{-1}$ (mediu)$\cdot min^{-1}$**	**Presiunea, Atm**	**Durata procesului, ore**
Inoculator	26 ± 1	270	1,0	1,2-1,3	30-40
Intermediar	26 ± 1	170	1-1,2	1,2-1,3	20-40
Regim	26 ± 1	120	0,6-1,0	1,2-1,3	90-120

Inocularea. Pentru producerea penicilinelor naturale se folosește *Penicillium chrysogenum,* o ciupercă filamentoasă cu forma tipică speciei *Penicillium*. Adaptararea inoculului durează **30-40 de ore**. Compoziția mediului de inoculare variază în funcție de proces. Una dintre cele mai reușite compoziții pentru acești fungi este: hidrați de carbon (0,5-2,0%), sursă de azot (0,2-1,0%), $CaCO_3$ (0-1%), K_2HPO_4 (0-1%), $MgSO_4$, Na_2SO_4, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ (0–0,5%), agar Oxoid (30%), care este un amestec de polizaharide extrase din alegele roșii numite *agarofite*. Deoarece specia *Penicillium chrysogenum* include microorganisme aerobe, în procesul de inoculare se admite aer steril, sterilizat prin

două filtre cu care este echipat fiecare bioreactor (Fig. A.2.8) cu un debit de 1 $L \cdot L^{-1}$ (mediu)$\cdot min^{-1}$, iar pentru asigurarea oxigenului în tot volumul mediului de cultură are loc agitarea continuă cu o viteză de 270 rpm.

Filtrul de aer individual este plasat la intrare în fermentator, figura A.2.8 (A). Acest tip de filtre este confecționat din fibre disc cu membrană (filtre absolute, filtre milipori), redate schematic în figura A.2.8 (B). Membranele folosite sunt microporoase cu dimensiuni ale porilor 0,2 μ. Sterilizarea filtrului se face cu abur direct introdus pe direcția fluxului de aer. Dacă membrana filtrului este formată dintr-un material hidrofob, umiditatea aerului nu deranjează procesul de filtrare, respectiv de sterilizare, ceea ce permite utilizarea lor şi ca filtre de ieşire.

Filtrul de aer general (Fig. A.2.8 (C)) este alcătuit din material fibros și este amplasat în apropiere de bioreactor (Fig. A.2.8 (A). Carcasa filtrelor poate să includă unul sau mai multe elemente de filtrare. Filtrarea se realizează fie printr-o membrană, fie prin trei straturi de fibre înfășurate în jurul unei țevi poroase. Avantajele acestor filtre sunt: suprafața mare de filtrare, posibilitatea sterilizării unor debite mari de aer într-un timp scurt, durată lungă de funcționare, întreținere simplă și schimbarea rapidă a elementelor de filtrare (10-12 minute).

În procesul de sterilizare a aerului se monitorizează următorii parametri: temperatura punctului de rouă a aerului comprimat (temperatura la care apa din aer condensează); temperatura aerului după filtrul individual; temperatura aerului la ieșirea din barbotator.

Variația parametrilor de biosinteză în procesul de producere a penicilinelor în timp este prezentată în figura A.2.9.

În fermentătorul inoculator cu capacitatea de sute de litri (Fig. A.2.10) are loc adaptarea microorganismelor la noile condiții de dezvoltare.

Creșterea biomasei în fermentatorul intermediar (B). La această etapă are loc acumularea masei celulare prin înmulțirea exponențială a microorganismelor, capacitatea fermentatorului intermediar este de 1000-2000 L. Etapa de creștere exponențială a microrganismelor durează 20-40 de ore. Compoziția mediului pentru acest proces este următoarea: extract de porumb (5-8%), $CaCO_3$ (0-1,6%), K_2HPO_4 (0-1%), $MgSO_4$, Na_2SO_4, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ (0-0,5%), lactoză și glucoză (5-8%), ulei de floarea-soarelui alimentar (0-0,5%), în calitate de antispumant. În fermentatorul intermediar se transvazează conținutul inoculului (cu aer steril sub presiune, prin traseele sterilizate în prealabil, pentru a evita infectarea mediului de cultură) (Fig. A.2.11). La fel, în fermentatorul intermediar se dozează, în cantități mici, precursorii chimici: acidul fenilacetic, pentru producerea penicilinei G și acidul fenoxiacetic, pentru producerea penicilinei V. În această etapă, parțial, ca rezultat al distribuției vârstelor

microorganismelor, începe producerea penicilinei. În procesul de acumulare a biomasei se introduce aer steril cu un debit de 1,0-1,2 $L \cdot L^{-1}$ (mediu)$\cdot min^{-1}$. Pentru asigurarea oxigenului în tot volumul mediului de cultură acesta se agită cu o viteză inferioară etapei de inoculare, de 170 rpm, în scopul de a se evita distrugerea biomasei.

Fermentarea în fermentatorul de regim (C). În fermentatorul de regim se trece conținutul fermentatorului intermediar (cu aer steril sub presiune, prin traseele sterilizate în prealabil, pentru a evita infectarea mediului de cultură) (Fig. A.2.12). La această etapă are loc terminarea procesului de creștere a microorganismelor și producerea penicilinelor. Capacitatea fermentatorului de regim este de 50.000-100.000 L. Procesul de fermentare durează 90-120 de ore. Compoziția mediului pentru acest proces este următoarea: extract de porumb (5-9%), $CaCO_3$ (0,1%), K_2HPO_4 (0-0,5%), $MgSO_4$, Na_2SO_4, $MnSO_4$ $ZnSO_4$, $FeSO_4$ (0-1%), lactoză și glucoză (5-10%), ulei de floarea-soarelui alimentar în calitate de antispumant (0,3-0,8%), acidul fenil acetic/fenoxiacetic (0,3-0,6%). În procesul de fermentare se introduce aer steril cu un debit de 0,6-1,0 $L \cdot L^{-1}$ (mediu)$\cdot min^{-1}$, iar pentru asigurarea oxigenului în tot volumul mediului de cultură are loc agitarea continuă cu o viteză inferioară etapei de inoculare, de 120 rpm, pentru a evita distrugerea biomasei și a penicilinei produse. Pe tot parcursul procesului de biosinteză a penicilinelor pH-ul se menține în intervalul 6,7-7,0, iar temperatura în intervalul 25-27^{0}C.

Procesul de fermentare se consideră terminat atunci când concentrația zahărului scade până la 0,2-0,6%, iar concentrația penilicinei este de 1,0-1,8%.

Procesul de biosinteză este aerob, alimentarea cu O_2 este fundamentală pentru a asigura viteza maximă de creștere a masei celulare și producerea penicilinei. Transferul O_2 prin pelicula de lichid aflată la suprafața bulei este descrisă de ecuația (2.4), în timp ce ecuația (2.5) descrie transferul de masă al O_2 prin pelicula de lichid de la suprafața microorganismului (Fig. A.2.13):

$$r_a = k_l a(C_e - C) \quad (2.4)$$

$$r_L = k'_L a'(C - C_i) \quad (2.5)$$

$$r_a = r_L = k_L a(C_e - C) = k'_L a'(C - C_i) \quad (2.6)$$

unde: r_a – viteza de transfer al O_2 din aer spre mediul de cultură, mmol O_2/h; r_L – viteza de transfer al O_2 din mediul de cultură spre celulă, mmol O_2/h; k_L, k'_L– coeficienții de transfer prin difuzie în filmul de lichid de la suprafața bulei, respectiv celulei, $m \cdot h^{-1}$; a, a'– suprafața de contact dintre bulele de aer și lichid, respectiv dintre celule și lichid, m^2/m^3; C, C_e– concentrația momentană și de echilibru a O_2 dizolvat, mmol $O_2 \cdot L^{-1}$; C_i – concentrația ipotetică a O_2 la suprafața celulei, mmol $O_2 \cdot L^{-1}$.

Coeficientul de transfer de masă, k_L, în aparatele de agitare poate fi determinat din ec. (2.7)-(2.10); aceste ecuații matematice sunt folosite pentru determinarea cantității de oxigen transferat din faza gazoasă în faza lichidă:

$$Sh = Re^{a} \cdot Sc^{\gamma} \tag{2.7}$$

$$\frac{k_L \cdot d}{D} = \left(\frac{nd^2 \cdot \rho}{\mu}\right)^{\alpha} \left(\frac{\mu}{\rho \cdot D}\right)^{\gamma} \tag{2.8}$$

$$k_L = 0{,}31(Sc)^{-\frac{2}{3}} \left(\frac{\mu \cdot V_a}{V}\right)^{\frac{1}{3}} \tag{2.9}$$

$$\alpha = \frac{1{,}44 \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0{,}4} \cdot \rho^{0{,}2}}{\sigma^{0{,}6}} \cdot \left(\frac{v_s}{v_f}\right)^{0{,}5} \tag{2.10}$$

unde: Sh – numărul Sherwood; Re – numărul Reynolds; Sc – numărul Schmidt; D – coeficientul de difuzie moleculară a gazului; ρ – densitatea fazei lichide, kg/m^3; n – turația agitatorului, rpm; d – diametrul agitatorului, m; σ – tensiunea superficială a lichidului; α – suprafața de contact dintre bulele de aer și lichid, m^2/m^3; v_f – viteza finală a aerului în fermentator, m·s^{-1}; v_s – viteza aerului la ieșirea din barbotator, m·s^{-1}; V_a, V – volumul de aer, respectiv de mediu, m^3; P_a, P – puterea consumată la agitarea masei aerate și neaerate, kW; μ – viscozitatea cinetică a mediului, m^2/s.

Cantitatea oxigenului transferat poate fi determinată folosind coeficientul de absorbție volumetric, K_v, ecuațiile (2.11)-(2.16), pentru:

Agitator cu turbină



$$K_v = 0{,}0635 \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0{,}95} \cdot v_s^{0{,}67} \tag{2.11}$$

$$\frac{P_a}{V} > 0{,}074 \frac{kw}{m^3\ lichid} \Rightarrow v_s < 90\ m/s \tag{2.12}$$

Agitator cu palete



$$K_v = 0{,}038 \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0{,}53} \cdot v_s^{0{,}67} \tag{2.13}$$

$$\frac{P_a}{V} < 0{,}044 \frac{kw}{m^3\ lichid} \Rightarrow v_s < 21\ m/s \tag{2.14}$$

$$P_a = P\left(1 - 1{,}26 \frac{V_a}{n \cdot d^3}\right)\ pentru\ \left(\frac{V_a}{n \cdot d^3} < 0{,}035\right) \tag{2.15}$$

$$P_a = P\left(0{,}62 - 1{,}85 \frac{V_a}{n \cdot d^3}\right)\ pentru\ \left(\frac{V_a}{n \cdot d^3} > 0{,}035\right) \tag{2.16}$$

Acumularea biomasei (creșterea viscozității mediului) determină scăderea coeficientului de transfer de masă. Pentru a soluționa această problemă se mărește viteza de agitare. Intensitatea agitării se caracterizează prin timpul de agitare, definit ca timpul necesar pentru a egala concentrația în toată masa de lichid în fermentător.

5. *Separarea şi purificarea penicilinelor*

O schemă generală a prelucrării în aval de bioreactor este prezentată în figura A.2.14. Pentru fiecare tip de produs (extracelular sau intracelular) există mai multe metode de prelucrare. Alegerea unei metode de prelucrare şi selectare a operației (operaţiilor) unitare corespunzătoare se face ţinându-se cont de proprietățile produsului, impurităţilor, microorganismelor, celulelor sau țesuturilor producătoare. Procesul tehnologic de separare va consta în alegerea succesiunii operațiilor în conformitate cu cele 5 reguli euristice prezentate anterior, pe baza schemei din figura A.2.14. Majoritatea bioproceselor, în special în cazul obţinerii produselor de mic tonaj şi de valoare ridicată, sunt concepute pentru a fi conduse în regim discontinuu. Bioprocesele continue de bioseparare sunt utilizate în cazul produselor de valoare relativ redusă, fabricate în cantităţi considerabile: etanol, butanol, acizi organici etc.

Recuperarea primară reprezintă prima etapă a procesului de prelucrare în aval de bioreactor, etapă în care are loc o purificare preliminară şi o reducere a volumului de material supus prelucrării. Aşa cum reiese din figura A.2.14, alegerea căii care va fi urmată depinde de localizarea intracelulară sau extracelulară a produsului de interes.

În cazul produselor extracelulare, prima etapă în procesul de separare o reprezintă îndepărtarea biomasei. Această etapă se realizează utilizând una sau mai multe dintre următoarele operaţii unitare: filtrarea în filtre rotative cu vid, centrifugarea în centrifuge cu discuri sau centrifuge cu decantor, filtrarea prin filtre presă, ultrafiltrarea, flotaţia etc. Întrucât fiecare operaţie unitară prezintă avantaje şi dezavantaje pentru diverse produse şi microorganisme, e dificil de selectat operația optimă pentru un sistem dat.

Filtrarea soluțiilor native

Reieșind din faptul că penicilinele naturale sunt metaboliți extracelulari ai *Penicillium notatum*, acestea se găsesc în soluție și pentru separarea soluției native (soluție în care se conține penicilina de interes) de biomasă, de regulă, se folosește metoda de filtrare. Filtrarea soluției rezultată din procesul de fermentare urmărește separarea miceliului, iar soluția rezultată se răcește până la 3–5ºC, după care se depozitează în rezervorul de așteptare, de unde este trimisă la extracție.

Printre metodele de separare şi purificare utilizate în biotehnologii, metodele de extracție lichid – lichid (L–L) sunt utilizate frecvent, deoarece aceste metode sunt bine cunoscute şi testate industrial cu succes în alte aplicații, sunt adesea ieftine, se scalează cu succes în unități cu funcționare continuă.

Extracția L–L este utilizată în special pentru separarea din mediul de cultură a unor metaboliţi (alcooli, acizi carboxilici, aminoacizi, antibiotice), pentru prepararea unor produse farmaceutice izolate din compuși naturali sau obținute prin sinteză parțială (sulfamide, fenobarbital, antihistaminice, cortizon, estrogeni, alcaloizi), pentru rafinarea grăsimilor vegetale şi animale (procedeul Solexol de extracţie cu propan, extracţia cu furfural), pentru extracţia proteinelor din peşte, extracţia vitaminelor A şi D din uleiul de ficat de peşte, extracţia vitaminei E din uleiurile vegetale. Pe măsură ce scara de operare se măreşte, extracţia L–L devine din ce în ce mai atractivă datorită, pe de o parte, faptului că problemele referitoare la transpunerea la scară sunt cunoscute şi multe dintre ele rezolvate, iar, pe de altă parte, datorită costurilor de investiţii şi exploatare mult mai scăzute comparativ cu alte metode de bioseparare, cum ar fi cromatografia lichidă.

Un solvent ideal trebuie să fie selectiv, nemiscibil cu materia primă, ieftin şi uşor de recuperat, netoxic, neinflamabil şi necoroziv. El nu trebuie să reacţioneze ireversibil cu solutul. Viscozitatea acestuia trebuie să fie scăzută: astfel consumurile energetice pentru vehiculare vor fi mai reduse şi, în plus, o valoare mică a viscozităţii influenţează favorabil coeficienţii de transfer de căldură şi de masă. O diferenţă de densitate cât mai mare între solvent şi materia primă ameliorează dispersia şi măreşte viteza de deplasare a picăturilor, favorizând astfel transferul de masă. Tensiunea superficială trebuie să aibă o valoare optimă: la valori prea mari, deşi se uşurează separarea fazelor se îngreunează dispersia, în timp ce la valori prea mici există pericolul formării unor emulsii stabile între solut şi solvent, emulsii greu de separat.

Solvenţii utilizaţi în bioprocese trebuie în plus să nu denatureze biomoleculele extrase (peptide, proteine etc.). Ca regulă generală, cu cât biomoleculele sunt mai mari, cu atât mai complexă este structura lor spațială şi cu atât mai mare este riscul de denaturare. Drept urmare, peptidele mari şi proteinele nu se supun extracţiei cu solvenţi organici, ele separându-se prin extracţie în sisteme apoase bifazice.

Penicilinele G și V (care sunt de interes industrial) se separă prin extracție L–L, la un pH al fazei apoase corespunzător formei nedisociate a antibioticului. Studiile cu un solvent organic relevă faptul că:

- în solventul organic trec doar moleculele de penicilină acid nedisociate, prin urmare este necesar un mediu puternic acid;
- între moleculele de penicilină în mediul acid nu au loc asociații moleculare;
- în solvent organic penicilinele nu disociază.

Extracția se face cu acetat de butil sau izobutil, iar solventul epuizat se regenerează și se folosește pentru o nouă extracție. Deoarece procesul de extracție

impune un pH puternic acid, la care penicilinele degradează, pentru a reduce la minim procentul de degradare a penicilinei se folosesc extractoare orizontale (Podbielniak, Fig. A.2.15 (A)) și verticale (Luwesta, Fig. A.2.15 (B)).

Extractorul Podbielniak este primul extractor centrifugal folosit la scară industrială (1950). Acesta este dotat cu o coloană cu talere perforate înfășurată în jurul unui arbore cilindric care se rotește cu 2000-5000 rpm (Fig. A.2.16).

Câmpul de forțe centrifuge duce la reducerea înălțimii echivalente a unei trepte teoretice (IETT), precum şi a timpului de contact între faze. Datorită câmpului de forțe centrifugal şi diferenței de densitate are loc o curgere radială, în contracurent, a celor două faze. Productivitatea acestor extractoare este de 2,5-10,0 m^3/oră, dar poate ajunge şi până la 98 m^3/oră.

Avantaje: timpul de contact al fazelor este scurt; permit prelucrarea unor amestecuri având o diferență mică de densitate între faze şi care emulsionează ușor; necesită un spațiu redus pentru amplasare.

Dezavantajele principale: cost ridicat; întreținere mai pretențioasă decât la alte categorii de extractoare.

Extractorul Luwesta (Fig. A.2.17)

Avantaje: productivitate ridicată (1,25-120,00 m^3/oră într-o singură treaptă); timp de contact scurt (câteva secunde); consum redus de solvent.

Dezavantaje: cost ridicat; întreținere mai pretențioasă; apariția la periferia cilindrului rotativ a unor presiuni locale de peste 10 MPa, cu efecte directe asupra numărului de trepte de contact necesare.

Aceste extractoare pot amesteca fazele, efectua transferul de masă și separa fazele în câteva secunde. Timpul de contact scurt și o temperatură redusă (0-5ºC) asigură un randament de 70-75% în faza de extracție.

Penicilinele naturale sunt antibiotice slab acide, (pK scăzut), de aceea pH-ul utilizat în extracţie trebuie scăzut până sub valoarea pK, pentru a obține antibioticul în formă acidă nedisociată. Coeficienții de distribuție ai penicilinei G în sisteme apă – solvent organic la 0ºC sunt prezentați în tabelul A.2.3.

Deoarece la nivel industrial în calitate de solvent de extracție în mare parte se folosește acetatul de butil, în tabelul A.2.4 sunt prezentate gradele de extracție în acesta a unor peniciline și precursori de biosinteză.

Dacă extracţia antibioticelor se face cu un solvent nepolar, cum este acetatul de butil, gradul de extracţie va fi maxim numai dacă antibioticele se găsesc în soluția apoasă supusă extracției sub formă nedisociată. În faza apoasă, penicilinele disociază datorită grupării carboxil. La nivel industrial, pentru extracția

penicilinelor naturale se folosește acetatul de butil. Acidularea soluției native se face cu soluție de acid sulfuric (Fig. A.2.18).

Coeficienții de repartiție caracterizează distribuția penicilinei în faza apoasă și în cea organică. Pentru calculul coeficienților de repartiție se folosesc constantele de disociere, care se determină conform ecuațiilor (2.17)-(2.20):

$$K_d = \frac{[RCOO^-][H^+]}{[RCOOH]} \quad (2.17)$$

$$K_d = \frac{C_a^- \cdot [H^+]}{C_a'} \quad (2.18)$$

$$K_0 = \frac{C_s}{C_a'} \quad (2.19)$$

$$K = \frac{C_s}{C_a} \quad (2.20)$$

unde: C_a^- – concentrația penicilinei disociate în faza apoasă; C_a' – concentrația penicilinei nedisociate în faza apoasă; C_s – concentrația penicilinei în faza organică; C_a – concentrația totală a penicilinei în faza apoasă; K – coeficientul total de repartiție; K_0 – coeficientul de repartiție a penicilinei nedisociate.

La determinarea valorii optime a pH-ului pentru extracția penicilinelor G și V în acetatul de butil se calculează coeficientul total de repartiție:

$$K = \frac{K_0}{1+10^{pH-pk_a}} \quad (2.21)$$

Dacă: K_0 = 47, coeficientul de repartiție a penicilinei în apă; pKa (penicilina G) = 2,75; pKa (penicilina V) = 2,70.

Ca urmare, pentru a exista în stare nedisociată, pH-ul fazei apoase din care se realizează extracţia < 2,7.

Dacă pH = 2, atunci coeficientul de repartiție a penicilinei G este:

$$K = \frac{47}{1+10^{2-2,75}} = 31,9 \quad (2.22)$$

Dacă pH = 5, atunci coeficientul de repartiție a penicilinei G este:

$$K = \frac{47}{1+10^{5-2,75}} = 4,48 \quad (2.23)$$

Din ecuațiile (2.18)–(2.19) rezultă că, pentru a obține un grad de extracție maxim, valoarea pH trebuie să fie ≤ 2. Totuși, într-un mediu puternic acid viteza de dezactivare a penicilinelor este foarte mare, la pH = 1,5 și temperatura de 35ºC timpul de inactivare a penicilinei G este de aproximativ 4 minute. Prin urmare, pH-ul utilizat în procesul de extracție reprezintă un compromis între stabilitatea penicilinei și valoarea gradului de extracție, respectiv a coeficientului de repartiție. Pentru a minimiza timpul de expunere a penicilinei la pH scăzut, contactarea fazei apoase cu solventul de extracție se efectuează înainte de acidulare. Amestecul format din lichidul de fermentare și solvent este apoi amestecat cu o soluție de H_2SO_4 (4-6%) utilizând amestecătoare *in-line*, caracterizate prin eficiență ridicată.

Pentru a preveni degradarea penicilinelor, extracția se desfășoară la temperaturi scăzute (0-3ºC) în extractoare care asigură un timp scurt de contact între faze, cum sunt extractoarele Podbielniak și Luwesta. După separarea fazelor, pentru stabilizarea produsului, urmele de acid din faza organică sunt neutralizate prin adăugarea unei soluții apoase de fosfat de potasiu, carbonat sau acetat de sodiu sau potasiu, până la un pH 6. În această etapă, penicilina este reextrasă și stabilizată sub formă de sare în soluție apoasă.

Purificarea poate include o nouă extracție la un pH de 2,0-2,5, urmată de neutralizare cu fosfat de potasiu de 2%, până la un pH 6. Solventul epuizat este recirculat în procesul de extracție, împreună cu solventul recuperat din rafinat prin distilare. Separarea și purificarea penicilinelor naturale, obținute ca rezultat al procesului de fermentare, decurge în mai multe etape și se face ca în exemplul prezentat în figura A.2.19.

Inițial, în extractor soluția nativă (soluția obținută după filtrarea biomasei) se acidulează cu acid sulfuric de 4,0-6,0%, până la valoarea pH 2,0-2,5 și se extrage cu acetat de butil, care se dozează cu ajutorul dozatorului în raportul volumic între soluția apoasă și acetatul de butil de 3:1. Extracția se face într-un extractor de tip *Luwesta* sau *Podbielniak*, timp de 2-3 minute, pentru a evita descompunerea penicilinelor. În etapa a 2-a are loc neutralizarea soluției de penicilină cu soluție apoasă de hidrogenofosfat de potasiu (4,0%), până la un pH 7,0-7,2. La etapa a treia, soluția apoasă bazică se acidulează din nou cu acid sulfuric (4,0-5,0%), până la pH-ul 2,0-2,5 și din nou se extrage cu acetat de butil; raportul între soluția apoasă și acetatul de butil este de 3:1, care după 2-3 minute se neutralizaeză cu soluție apoasă de hidrogenofosfat de potasiu (4,0%), până la un pH 7,0-7,2. Pentru a reduce costurile ridicate în procesul de extracție se recomandă reciclarea sau recircularea materialelor auxiliare. Ca rezultat al procesului de extracție se obține o soluție cu concentrația penicilinei de 134-150 mg/mL. În aceste condiţii, extracţia reactivă apare ca o soluţie fiabilă de separare a penicilinelor şi a antibioticelor *β-lactamice* în general.

La extracţia cu *Amberlite LA-2 (A_{org})*, gradul de extracţie a penicilinelor G şi V este de 97-98% chiar şi la valori ale pH-ului 5 în faza apoasă (Fig. A.2.20). La acest pH, timpul de semiinactivare a penicilinei G este de 92 ore, pericolul degradării chimice fiind practic îndepărtat. La extracţia reactivă, la interfaţă, se stabileşte următorul echilibru între penicilina din faza apoasă şi amina din faza organică (ec. (2.24)):

$$P - COO^-_{[aq]} + H^+_{[aq]} + A_{org} \leftrightarrow P - COOH \cdot A_{org} \qquad (2.24)$$

Din cauza structurii voluminoase pe care o au, atât penicilinele, cât şi extractantul, în complexul rezultat din ec. (2.24) ele se vor găsi în raport molar de 1:1. Extracţia reactivă a penicilinelor cu amine este influenţată de valoarea pH-ului fazei apoase iniţiale, concentraţia iniţială a extractantului, concentraţia iniţială a antibioticului, timpul de contact, raportul volumic [aq]:[org]. Gradul de extracţie depinde de structura antibioticului extras, în special de solubilitatea acestuia (Tab. A.2.5).

Reextracţia se realizează în soluţii apoase de carbonat sau fosfat de sodiu sau potasiu. La reextracţia cu carbonat de sodiu, de ex., are loc următorul proces:

$$2P - COOH \cdot A_{org} + Na_2CO_{3_{[aq]}} \leftrightarrow P - COO^- Na^+_{[aq]} + A_{org} + CO_2 + H_2O \quad (2.25)$$

În general, reextracţia decurge cu randamente mari şi fără degradarea antibioticelor la pH neutru. La reextracţia penicilinei G, la valori pH de 7,2 – 7,5, pierderile totale de antibiotic, atât în etapa de extracţie reactivă cu *Amberlite LA-2*, cât şi în etapa de reextracţie, nu depăşesc 0,3%. Un agent de extracţie mai performant este DITDA (di-izo-tridecilamina) în butanol. Gradul de extracţie a penicilinei G este de 95% (la pH = 5), iar gradul de reextracţie (la pH de 8,5) este aproape 100%. În plus, *DITDA* este de 20 de ori mai ieftin decât *Amberlite LA-2*. Întrucât aceşti extractanţi aminici sunt toxici pentru celule, ei nu pot fi utilizaţi pentru extracţia *in situ*.

La extracţia reactivă a antibioticelor cu săruri cuaternare de amoniu, la interfaţă are loc o reacţie de schimb ionic:

$$NR_4^+ Cl^-_{org} + P - COO^-_{[aq]} \leftrightarrow P - COO^- NR^+_{4[org]} + Cl^-_{[aq]} \quad (2.26)$$

Reextracţia se poate realiza cu o soluţie apoasă de acid clorhidric:

$$P - COO^- NR^+_{4[org]} + HCl_{[aq]} \leftrightarrow NR_4^+ Cl^-_{org} + P - COO^-_{[aq]} + H^+_{[aq]} \quad (2.27)$$

Sărurile cuaternare de amoniu sunt extractanţi mai eficienţi pentru antibiotice decât aminele secundare sau terţiare. La extracţia unor compuşi cu structură *tiazolidin-β-lactamică* (acid clavulanic, penicilină V, amoxicilină, acid fenoxiacetic), eficienţa extracţiei creşte în ordinea extractanţilor: *Amberlite LA-2 clorhidrat < Alamine 336 clorhidrat << Aliquat 336* şi în ordinea solvenţilor: *1-butanol < tributilfosfat < hexan < dietileter < diclormetan < acetat de butil*.

Procesul de cristalizare a penicilinelor și purificarea cristalelor

Ulterior, pentru obținerea cristalelor de penicilină, soluția obținută în etapa anterioară se răcește la temperatura (-10)-(-12)ºC, în vasul de înghețare. Soluția înghețată este supusă procesului de filtrare a apei sub presiune, prin filtrul *Druck*, utilizat în mod obișnuit pentru a separa solidele de lichide. Această metodă

ameliorează procesul de filtrare prin aplicarea presiunii pentru a prepulsa fluidul prin mediul filtrant. În etapa următoare soluția de penicilină în acetatul de butil se tratează cu soluție alcoolică de acetat de sodiu sau potasiu, pentru a precipita penicilina sub formă de penicilină sodică. Penicilina precipitată se supune procesului de filtrare, pe filtrul *Nuce*, pentru separarea cristalelor formate. În etapa finală cristalele de penicilină se supun procesului de spălare cu soluție de cloroform–butanol și apoi se refiltrează pe filtrul *Nuce*. Soluțiile de cloroform și butanol sunt recuperate și refolosite în alte procese. Cristalele pure se supun procesului de uscare la temperatura de 35-40ºC și la presiunea de 100-200 bari.

Activitatea penicilinelor

Activitatea penicilinelor se exprimă în unităţi internaţionale (U.I.) şi este influenţată de structura moleculei (Tab. A.2.6). O unitate de penicilină G sodică corespunde activităţii a 0,5988 μg din standardul internaţional, ceea ce înseamnă că 1 mg din această penicilină conţine 1670 U.I. Activitatea antimicrobiană se instalează relativ rapid, cu mare intensitate, după 30-60 de minute. Penicilina este un antibiotic cu toxicitate redusă; organismul poate suporta administrarea unei cantităţi foarte mari, până la 50 milioane U.I./zi. În unele cazuri pot apărea tulburări fie din cauza intoleranţei locale (de obicei temporare), fie din cauza fenomenelor alergice cauzate de impurităţile proteice. Aceste inconveniențe pot fi evitate. Penicilinele pot fi degradate la acțiunea alcoolilor, oxidanţilor, soluțiilor acide sau bazice, diferitor metale.

Benzilpenicilina sub formă de sare de Na sau K se administrează intramuscular, deoarece aceste săruri disponibilizează un nivel înalt al antibioticului în sânge. Dat fiind faptul că penicilina se elimină rapid şi masiv prin rinichi, pentru a se menţine concentraţia biodisponibilă în jur de 0,03 U.I./mL este necesară fie administrarea la anumite intervale de timp, fie ameliorarea proprietăților acesteia. Prin condiționare se obțin diferite forme de peniciline naturale cu acţiune prelungită și care prezintă un risc redus de intoleranță în cazul persoanelor sensibile la aceste antibiotice.

De exemplu, ameliorarea penicilinei G cu obținerea *benzatin penicilinei G*, denumiri comerciale: *Moldamin, Tardocillin, Bicillin*.

Benzatin penicilina G este sarea penicilinei G cu *N,N*'-dibenziletilendiamina. Această formă se solubilizează foarte greu în organism și se administrează o dată la 5-6 zile, inclusiv oral, deoarece nu este dezactivată de sucul gastric. *Benzatin penicilina G* se obține la interacțiunea penicilinei G cu *acetatul de benzatină* în prezența soluției de citrat de sodiu și a unei substanțe tensioactive (STA), conform reacției prezentate în figura A.2.21.

Cristalele de benzatin penicilina G se filtrează, se usucă, iar apoi se „micronizează” cu un jet de aer sub presiune până la dimensiunea 5-50 microni, deoarece cristalele prea mari nu trec prin seringă, iar cele prea mici formează o suspensie vâscoasă.

Un alt exemplu de ameliorare a penicilinei G este obținerea procain penicilinei G, denumiri comerciale: *Efitard, Bipenicillin* etc.

Procain penicilina G are un timp de acțiune de 12-24 ore. Pentru a asigura o acțiune rapidă și de lungă durată, procainpenicilina G se condiționează cu o anumită cantitate de penicilină sodică. Procain penicilina oferă o biodisponibilitate diferită, prin concentraţie plasmatică mai scăzută şi timp de retenţie mai îndelungat, ceea ce o face adecvată formulării pentru administrare sistemică.

Procain penicilina G se obține la interacțiunea penicilinei G cu clorhidratul de procaină în prezența soluției tampon citrat, care stabilizează penicilina, și a unei substanțe tensioactive (STA), conform reacției prezentate în figura A.2.22. Precipitatul de procain penicilina G se filtrează și se usucă în vid.

Obținerea *clemizol penicilinei G*, denumirile comerciale: *Anapenil, Megacilina, Belocilina*. Clemizol penicilina G are o acțiune de lungă durată și un efect sinergetic, deoarece clemizolul conferă penicilinei G proprietăți antifungice. Clemizolul are și proprietăți antihistaminice, deci crește toleranța penicilinei G pentru persoanele sensibile la penicilină. Pentru un efect imediat se condiționează în amestec cu penicilină G sodică. Clemizol penicilina se obține prin combinarea penicilinei G cu 1-(*p*-clorobenzil)-2-(pirolidin-1-ilmetil)benzimidazol, conform reacției prezentate în figura A.2.23.

Spectrul de acţiune a penicilinelor

- Sunt active față de bacteriile G(+), precum: *streptococi, pneumococi, stafilococi, gonococi, meningococci*;
- Mai sunt sensibile: *Bacillus anthracis, Clostridium sp., Corynebacterium diphteriae, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis, M. leprae, Neisseria sp.* şi spirochete, precum *Treponema pallidum, Leptospira*;
- Bacterii G(-), precum: *Pasteurella sp.* și unele tulpini de *Haemophilus influenzae*;
- Sunt active faţă de protozoare;
- Bacteriile G(-) relevante clinic, precum și unii enterococi sunt în general rezistente: *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, specii de *Salmonella, Shigella, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Citrobacter*), *Pseudomonas sp., Acinetobacter sp*. etc.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați antibioticele și explicați importanța lor în medicina modernă.
2. Explicați mecanismul de acțiune a penicilinelor asupra bacteriilor.
3. Scrieți ecuațiile de biosinteză a penicilinelor G și V.
4. Evaluați influența parametrilor de mediu (pH, temperatură, oxigen dizolvat) asupra randamentului biosintezei penicilinelor naturale.
5. Explicați mecanismele de rezistență a bacteriilor la peniciline și propuneți soluții biotehnologice inovative pentru combaterea acestora.
6. Analizați raționamentul acidulării soluției native în procesul de extracție a penicilinei și corelați-l cu proprietățile fizico-chimice ale compusului.
7. Proiectați o schemă tehnologică de obținere a penicilinelor naturale, incluzând etapele de fermentare, extracție și purificare.
8. Justificați importanța menținerii condițiilor optime de fermentare în procesele de producție biotehnologică a penicilinelor.
9. Comparați și evaluați metodele de separare și purificare a penicilinelor naturale în funcție de eficiență, cost și protejarea substanței active.
10. Identificați principalele echipamente utilizate în procesul de biosinteză, extracție, filtrare și purificare a penicilinelor, explicând principiul de funcționare și aplicabilitatea acestora.
11. Propuneți metode de condiționare a penicilinelor naturale în scopul ameliorării proprietăților antibacteriene.

BIBLIOGRAFIE

1. FARCAS, A. *Biotehnologii farmaceutice*. Cluj-Napoca: Presa Universitară Clujeană, 2021. 288 p. ISBN 978-606-37-1276-0.
2. IRIMIE, F., PAIZS, C., TOŞA, M. *Biotransformări în sinteza organică. Aspecte fundamentale*. Cluj-Napoca: Napoca Star, 2006. 247 p.
3. TAO, J., LIN, G.Q., LIESE, A. *Biocatalysis for the pharmaceutical industry*. John Wiley, Sons Asia, 2009. ISBN 9780470823149.
4. WITTMANN, C., LIAO, J.C. *Industrial biotechnology: products and processes*. Wiley-VCH, 2017. 640 p. ISBN 978-3-527-34181-8.
5. BRUGGINK, A., ROY, P.D., BRUGGINK, A. *β*-Lactam Antibiotics. In: *Antibiotics – Therapeutic Spectrum and Limitations*, 2001, pp. 89–122. ISBN 978-94-010-0850-1. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95388-7.00001-2.
6. HAQUE, M.A., NATH, N.D., JOHNSTON, T.V., HARUNA, S., AHN, J., OVISSIPOUR, R., KU, S. Harnessing biotechnology for penicillin production: Opportunities and environmental considerations. In: *Science of the Total Environment*, 2024, 946, 174236. ISSN 0048-9697. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174236.

7. NAWFA, R., PURNOMO, A.S., PUTRO, H.S. Synthesis of Antibiotic Penicillin-G Enzymatically by *Penicillium chrysogenum*. In: *Asian Journal of Chemistry*, 2019, 31(10), pp. 2367–2369. https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21766.
8. LUENGO, J., ALEMANY, M., SALTO, F. et al. Direct Enzymatic Synthesis of Penicillin G Using Cyclases of *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*. In: *Nature Biotechnology*, 1986, 4, pp. 44–47. https://doi.org/10.1038/nbt0186-44.
9. NAWFA, R., PURNOMO, S., PUTRO, H.S. Synthesis of Antibiotic Penicillin-G Enzymatically by *Penicillium chrysogenum*. In: *Asian Journal of Chemistry*, 2019, 31(10), pp. 2367–2369. https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21766.
10. HILLENGA, D.J., VERSANTVOORT, H., VAN DER MOLEN, S., DRIESSEN, A., KONINGS, W.N. Penicillium chrysogenum Takes up the Penicillin G Precursor Phenylacetic Acid by Passive Diffusion. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61(7), pp. 2589–2595. https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2589-2595.1995.
11. SAWANT, A., KOTESWARA, R. Biosynthetic process and strain improvement approaches for industrial penicillin production. In: *Biotechnology Letters*, 2022, 44, pp. 179-192. https://doi.org/10.1007/s10529-022-03222-5.
12. CASTLE, S.S. *Penicillin G*. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 2007, pp. 1–6. https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.62385-2.
13. SAHOO, B.M., BANIK, B.K. Therapeutic Potentials of *β*-Lactam. In: *Synthetic Approaches to Nonaromatic Nitrogen Heterocycles*, 2021, pp. 59–88. https://doi.org/10.1002/9781119708841.ch4.
14. BEN SALEM, A., SAUTREY, G., FONTANAY, S., DUVAL, R.E., REGNOUF-DE-VAINS, J.B. Molecular drug-organiser: Synthesis, characterization and biological evaluation of penicillin V and/or nalidixic acid calixarene-based podands. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistr*y, 2011, 19(24), pp. 7534–7540. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.031.
15. BALL, A.P., GRAY, J.A., MURDOCH, J.M. The Natural Penicillins – Benzylpenicillin (Penicillin G) and Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V). In: *Antibacterial Drugs Today*. Springer, Dordrecht, 1978. https://doi.org/10.1007/978-94-011-8004-7_3.
16. MUREI, A., AYINDE, W.B., GITARI, M.W. et al. Functionalization and antimicrobial evaluation of ampicillin, penicillin and vancomycin with Pyrenacantha grandiflora Baill and silver nanoparticles. In: *Sci. Rep.*, 2020, 10, 11596. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68290-x.

3. BIOTEHNOLOGIA PENICILINELOR DE SEMISINTEZĂ

3.1. Peniciline de semisinteză: structura și mecanismele de acțiune
3.2. Biotehnologia acidului 6-aminopenicilanic (6-APA)
3.3. Biotehnologia penicilinelor de semisinteză: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Abilități

Studentul:

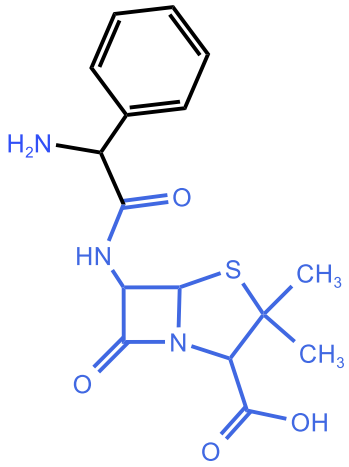
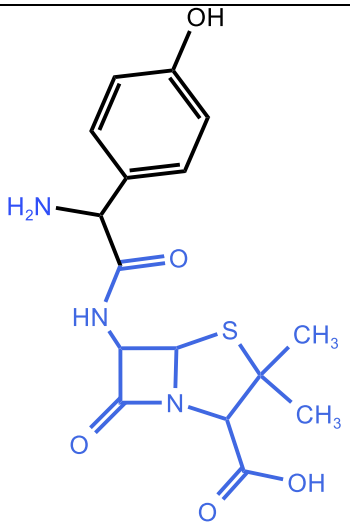
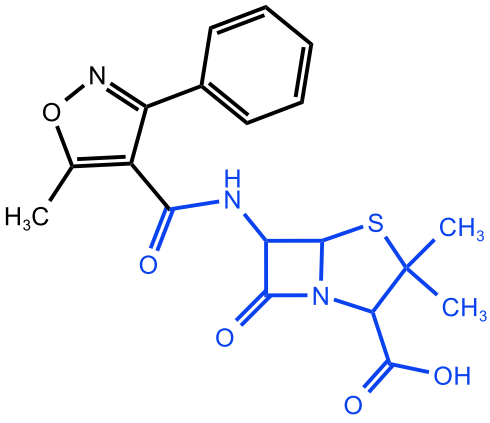
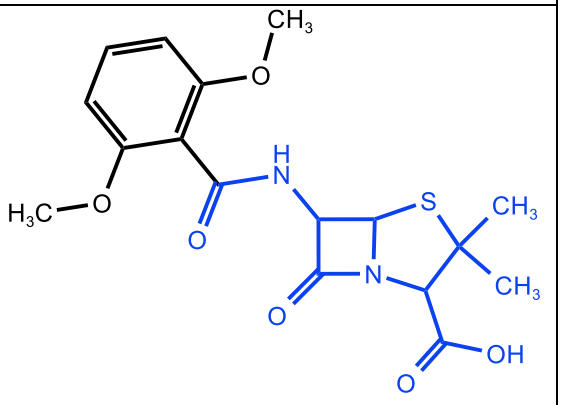
- clasifică penicilinele de semisinteză în funcție de tipul agentului de acilare;
- argumentează avantajul penicilinelor de semisinteză în raport cu al celor naturale;
- relatează despre mecanismul general de biosinteză a penicilinelor de semisinteză;
- scrie ecuațiile de biosinteză a 6-APA și a penicilinelor semisintetice;
- elaborează scheme tehnologice de producere industrială a 6-APA și a penicilinelor de semisinteză;
- aplică metode fizice, chimice și fizico-chimice pentru izolarea și purificarea 6-APA și a penicilinelor de semisinteză;
- relatează despre tipurile de utilaje și echipamente utilizate în biotehnologia penicilinelor semisintetice.

3.1. Peniciline de semisinteză: structura și mecanismele de acțiune

Deoarece majoritatea penicilinelor de biosinteză sunt ușor inactivate de penicilinază, au labilitate termică mare şi nu acționează asupra bacteriilor G(-), s-a pus problema obținerii unor derivați ce nu prezintă aceste dezavantaje. Penicilinele ideale ar trebui să prezinte: spectru antibacterian larg; stabilitate în mediu acid; stabilitate la penicilinază; toxicitate redusă.

Dacă procesul de biosinteză se desfășoară fără modificarea catenei laterale, sunt produse penicilinele naturale. Obținerea antibioticelor de semisinteză se bazează pe principiul utilizării moleculei native, de la care se obțin forme derivate, prin metode de sinteză chimică. Moleculele rezultate sunt asemănătoare celor naturale, dar modificarea moleculară are repercusiuni asupra valorii terapeutice. Cele mai importante peniciline de semisinteză sunt *ampicilina, amoxacilina, oxacilina* şi *meticilina,* ale căror formule de structură sunt prezentate în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Formulele de structură a principalilor reprezentați ai penicilinelor semisintetice

Ampicilina	Amoxicilina
	
Oxacilina	**Meticilina**
	

Spectrul de acțiune și reprezentanți ai penicilinelor semisintetice

Penicilinele semisintetice sunt o clasă de antibiotice derivate din penicilinele naturale (cum ar fi penicilina G sau penicilina V) prin modificarea chimică a structurii lor pentru a le spori spectrul de acțiune, stabilitatea și proprietățile farmacocinetice. Spectrul de acțiune al penicilinelor semisintetice variază în funcție de modificările specifice ale moleculei de penicilină.

1. ***Aminopenicilinele.*** Reprezentanți ai acestei clase sunt: *amoxicilină, ampiciliă, epicilină, bacampicilină, ciclacilină, talampicilină, pivampicilină, hetacilină* etc.

Antibioticele semisintetice din acest grup, având în calitate de reprezentanți principali *ampicilina* şi *amoxicilina*, au un spectru larg de acțiune comparativ cu penicilinele naturale. Spectrul de acțiune cuprinde bacterii G(+) şi bacterii G(-) (unele tulpini de *Haemophilus influenzae, Escherihia coli, Salmonella, Shigella, Proteus mirabilis*). *Pivampicilina, bacampicilina şi talampicilina* sunt esteri ai ampicilinei care prin hidroliză eliberează ampicilina în organism.

Spectrul de acțiune:

Aminopenicilinele sunt eficiente împotriva multor bacterii G(+), inclusiv *Streptococcus spp., Enterococcus spp.* și *Staphylococcus spp.* care nu produc penicilinază. La fel au o activitate sporită împotriva unor bacterii G(-), cum ar fi *Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Salmonella spp.* și *Shigella spp*. Sunt eficiente și împotriva unor bacterii anaerobe și a anumitor *spirochete*.

2. ***Peniciline izoxazolilpeniciline*** (*antistafilococice*, peniciline rezistente la penicilinaza). Reprezentanți ai acestei clase sunt: *meticilină, cloxacilină, flucloxacilină, oxacilină, dicloxacilină, nafcilină* etc.

Au același spectru de acțiune ca penicilinele naturale, cu unica deosebire că acționează şi asupra stafilococului penicilinazo-pozitiv. În molecula penicilinelor antistafilococice sunt prezente catene laterale voluminoase care fac ca preparatele să fie rezistente la β-lactamaza stafilococică. În ultimii ani s-au dezvoltat tulpini de stafilococ (mai ales *Staphilococcus epidermidis*) rezistente la meticilină. Rezistența se explică prin incapacitatea antibioticului de a ajunge la locul de acțiune sau prin lipsa receptorilor specifici la nivelul membranei citoplasmatice bacteriene.

3. ***Peniciline cu spectru extins*** (peniciline antiseudomonale). Reprezentanți ai acestei clase sunt: *ticarcilină, piperacilină, azlocilină, carbenicilină, carfecilină, carindacilină, ticarcilină* etc.

Similar benzilpenicilinei, sunt active față de majoritatea bacteriilor G(+). La concentrații relativ mari sunt active şi față de tulpinile unor bacterii G(-), inhibă majoritatea tulpinilor de *Pseudomonas* şi *bacilul piocianic*.

Spectrul de acțiune:

Aceste antibiotice sunt eficiente împotriva bacteriilor G(+), asemănătoare cu aminopenicilinele, dar cu un spectru mai larg împotriva bacteriilor G(-), precum: *Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp., Proteus spp.* și *Klebsiella spp.*

4. ***Combinații de inhibitori de β-lactamaze***. Unele antibiotice se utilizează adesea în combinație cu inhibitori ai *β-lactamazelor* (de exemplu, *ticarcilină-clavulanat, piperacilină-tazobactam*). Reprezentanți ai acestei clase sunt: *amoxicilină-clavulanat, ampicilină-sulbactam, piperacilină-tazobactam etc.*

Spectrul de acțiune:

Aceste antibiotice au activitate sporită împotriva bacteriilor G(+) producătoare de *β-lactamaze*. La fel au un spectru larg de acțiune împotriva bacteriilor G(-), inclusiv cele producătoare de *β-lactamaze*. Totodată, au o activitate ameliorată împotriva bacteriilor anaerobe.

Înțelegerea spectrului specific de acțiune al fiecărei clase ajută la selectarea antibioticului potrivit pentru tratarea infecțiilor.

Farmacocinetica. Majoritatea penicilinelor se absorb rapid şi complet la administrarea parenterală. Administrarea intramusculară a dozelor mari poate provoca o acțiune iritantă locală, fiind preferabilă uneori calea intravenoasă de administrare. Absorbția penicilinelor la administrarea orală este diferită, fiind influențată de stabilitatea la acidul clorhidric şi de capacitatea de legare de proteinele alimentare. Pentru a reduce gradul de legare de proteinele alimentare acestea se administrează înainte de masă sau cel puțin peste o oră după mese.

Penicilinele se distribuie larg în ţesuturile şi lichidele organismului, inclusiv lichidul pleural, pericardic, intraarticular, intraabdominal, plămâni, oase, vezica biliară, rinichi. Penicilinele penetrează bariera placentară, trec în laptele matern.

Majoritatea penicilinelor (cu excepţia *nafcilinei, oxacilinei, amoxicilinei*) se metabolizează în proporție de până la 30% în ficat.

Eliminarea penicilinelor se face preponderent pe cale renală (prin filtrație glomerulară şi secreție tubulară). Unele peniciline se elimină în concentraţii mari cu bila (*nafcilina, ampicilina, mezlocilina, benzilpenicilina, piperacilina, pivmecilinamul*). *Nafcilina* se elimină în proporție de 80% cu bila şi doar 20% cu urina. Insuficiența renală puţin modifică concentrația plasmatică a *nafcilinei*. Penicilinele se elimină de asemenea și cu saliva, iar în laptele matern ating concentrații de 3-15% din cea plasmatică.

Cele mai importante modificări chimice ale moleculei native sunt:

- dezacilarea penicilinelor naturale în scopul obţinerii acidului 6-aminopenicilanic (6-APA);
- acilarea grupării 6'-NH_2 din 6-APA şi obţinerea penicilinelor semisintetice;
- esterificarea grupei 3-carboxil a penicilinei.

În cele mai frecvente cazuri penicilinele de semisinteză se obțin prin acilarea a 6-APA obținut la hidroliza biochimică sau chimică a penicilinelor naturale. Agenții de acilare sunt diferiți de cei ai penicilinei naturale. În cazul în care biosinteza penicilinei G și hidroliza enzimatică a acesteia are loc în cadrul aceluiași proces tehnologic, procesul de biosinteză a penicilinelor semisintetice se numește *integrat* (Fig. 3.1).

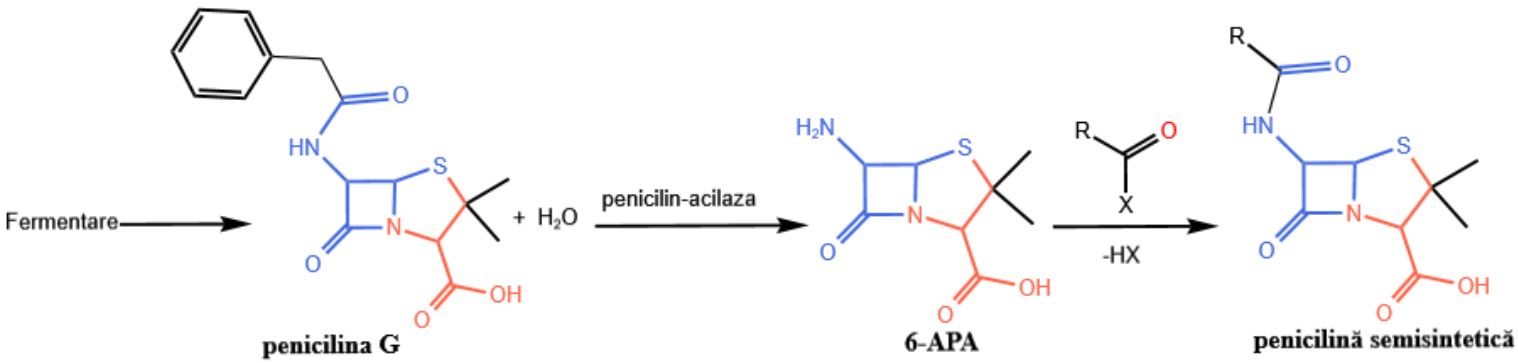


Figura 3.1. Schema generală de obținere a penicilinelor semisintetice printr-un proces integrat

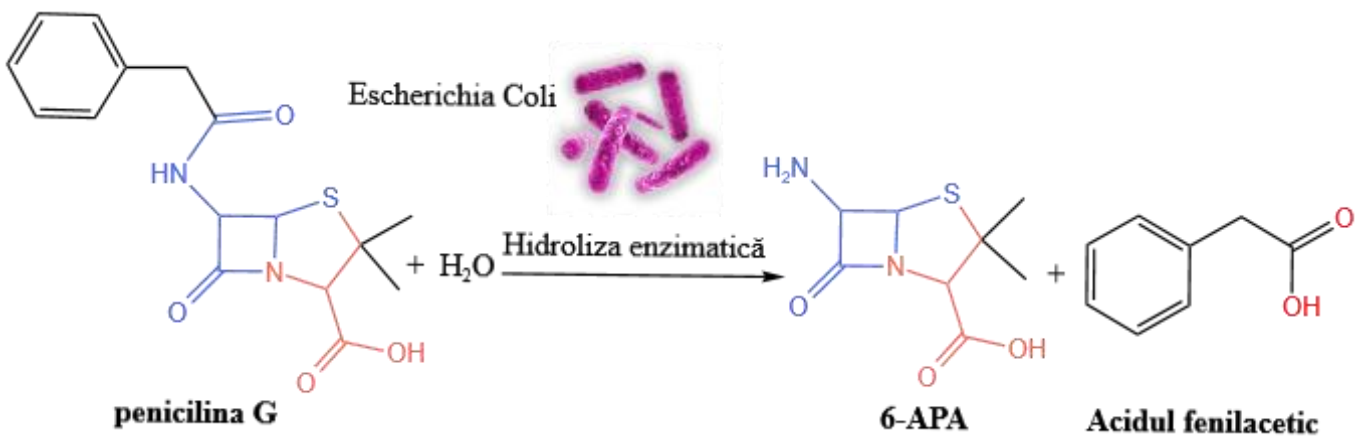


Figura 3.2. Obținerea 6-APA prin hidroliza enzimatică a penicilinei G, în prezența *Escherichia Coli*

Penicilinele de semisinteză sunt mai active decât cele naturale, cu un spectru mai larg de acțiune, acidorezistente, *penicilin-acilazo* rezistente (la care agenții patogeni să nu dezvolte rezistență sau instalarea rezistenței să fie mai lentă) și toxicitate redusă (ușor tolerate, reacții adverse minore).

3.2. Biotehnologia acidului 6-aminopenicilanic (6-APA)

Hidroliza enzimatică a penicilinei G la acidul 6-APA poate fi efectuată:
a) cu ajutorul culturilor de *Escherichia coli* sau *Nocardia*;
b) cu ajutorul enzimei penicilin-acilaza imobilizată.
Hidroliza enzimatică cu utilizarea *Escherichia coli* presupune 3 etape:

1. Obținerea culturii *Escherichia coli* și separarea ei de mediul de cultură.
2. Hidroliza *penicilinei G* cu obținerea și separarea 6-APA.
3. Concentrarea soluției și cristalizarea 6-APA.

Activitatea penicilin-acilazei a fost evidenţiată la o varietate de bacterii, actinomicete, micromicete şi drojdii. Industrial sunt utilizate tulpini producătoare de *E. coli* şi *Bacillus megaterium*, iar enzima este imobilizată. Producția *6-APA* constituie una dintre primele aplicații comerciale de succes ale enzimelor imobilizate. Deoarece costul 6-APA are un impact direct asupra costului penicilinei semisintetice, se urmărește îmbunătăţirea tehnologiilor de producţie a 6-APA, prin:

- echilibrarea reacției şi limitarea acumulării produșilor finali;
- limitarea inhibiției de către produșii secundari (acidul fenilacetic);
- formarea de săruri prin ajustarea pH-ului;
- îmbunătățirea tehnicilor de separare şi purificare, dificilă din cauza similarității produșilor de bioconversie.

Reducerea numărului de operații tehnologice, scăderea cantitativă a deșeurilor şi îmbunătățirea randamentului de obținere a *6-APA* se pot efectua prin realizarea fermentării în bireactoare eficiente, continue, automatizate şi prin îmbunătățirea performanțelor extracției. În acest sens se utilizează tehnici de separare cu ajutorul acetatului de butil la pH scăzut, precum şi al filtrelor de cărbune activ în purificare. Ampicilina și amoxicilina sunt molecule cu caracter amfoter, deoarece conțin, analog aminoacizilor, o funcțiune amino și o funcțiune carboxil. Aceste îmbunătățiri conduc la o eficiență a procesului de 90% şi la un cost aproximativ de 20 $/kg de penicilină, comparativ cu metoda convențională a cărei eficiență este de 70%, iar costul penicilinei de aproximativ 350 $/kg.

Producerea acidului 6-APA folosind Escherichia coli

Hidroliza enzimatică a penicilinei G la acidul 6-APA cu ajutorul culturii de *Escherichia coli* decurge după mecanismul prezentat în figura 3.2.

Pentru obținerea *6-APA* prin hidroliza enzimatică a penicilinei G, în prezența *Escherichia coli,* la etapa inițială are loc procesul de obținere a biomasei de *E. coli*, care decurge în 3 etape: *inocularea, creșterea* și *înmulțirea biomasei* în fermentatorul intermediar și obținerea masei microbiene mature în fermentatorul de regim. Masa microbiană obținută se separă prin centrifugare și se suspendă în soluția apoasă de penicilina G. Schema tehnologică de producere a acidului *6-APA* din penicilina G este prezentată în figura 3.3.

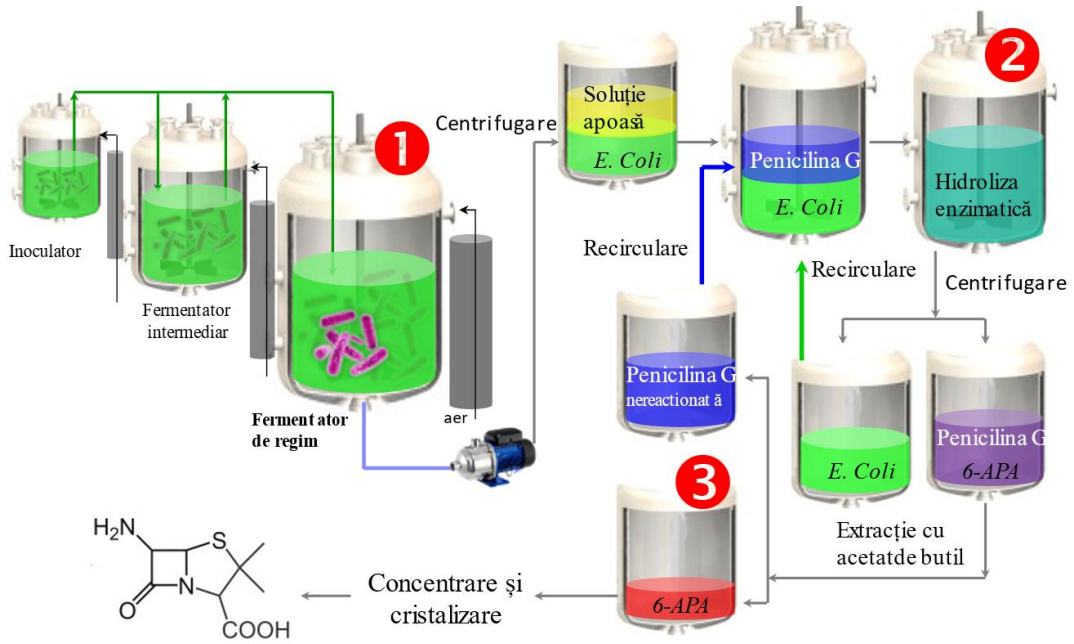


Figura 3.3. Schema tehnologică de producere a acidului *6-APA* din penicilina G

Tabelul 3.2. Parametrii optimi pentru creșterea și înmulțirea culturii bacteriene de *E. coli*

Parametrii	**pH**	**Gradul de aerare, L/min**	**Viteza de agitare, rpm**	**Concentrația 6-APA, mg/mL**	**Timpul, ore**	**Temperatura,ºC**
Fermentator pentru inocul	8	1,0	210	3,05	18-20	30±1
F. intermediar	8	1,0	140	3,10	18-20	30±1
F. de regim	8	1,0-1,2	110	4,10	20	30±1

În a doua etapă are loc hidroliza enzimatică a penicilinei G, cu obținerea acidului 6-APA, care se desfășoară timp de 4 ore, la temperatura de 30-35ºC. Ulterior, masa microbiană se separă prin centrifugare și se recirculă în bioproces.

Iar din soluția apoasă se extrage penicilina G, nereacționată, cu ajutorul acetatului de butil, la pH 2,0-2,5 (procesul de extracție este descris anterior, la obținerea penicilinelor naturale) și la fel se recirculă în bioproces.

În etapa a treia soluția apoasă cu 6-APA, obținută după extracția penicilinei G nereacționate, se concentrează în vid la 40ºC și 35 torr (1 torr = 133 Pa), se acidulează cu HCl concentrat, iar cristalele de 6-APA se filtrează și se păstrează la 5ºC în scopul utilizării.

Producerea acidului 6-APA folosind enzime imobilizate

Actualmente, pentru hidroliza penicilinei G se folosesc enzime precum pencilinamidaza imobilizată prin legături covalente pe dextran, polimetacrilat și triacetat de celuloză. Penicilinamidaza poate fi inclusă în gel poliacrilamidic, apoi folosită în procesul de hidroliză enzimatică a penicilinei G, la 6-APA, conform reacției prezentate în figura 3.4.

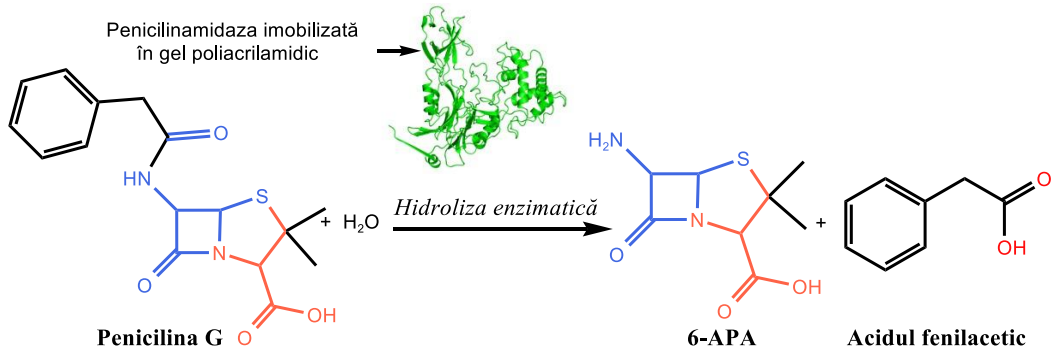


Figura 3.4. Obținerea *6-APA* prin hidroliza enzimatică a penicilinei G, în prezența penicilinamidazei imobilizate în gel poliacrilamidic

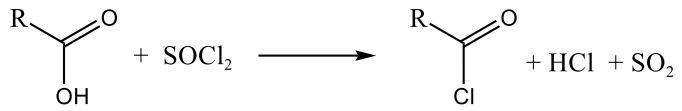
Prin acest procedeu, hidroliza enzimatică a penicilinei G la 6-APA decurge cu randamente de 82-98%, iar puritatea acesteia este de 95-98%.

3.3. Biotehnologia penicilinelor de semisinteză: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

La nivel mondial sunt cunoscute două tehnologii principale de obținere a penicilinelor semisintetice: tehnologia separată (inițială) și tehnologia integrată (actuală). Schema tehnologică de obținere a penicilinelor semisintetice prin tehnologia inițială este prezentată în figura 3.5.

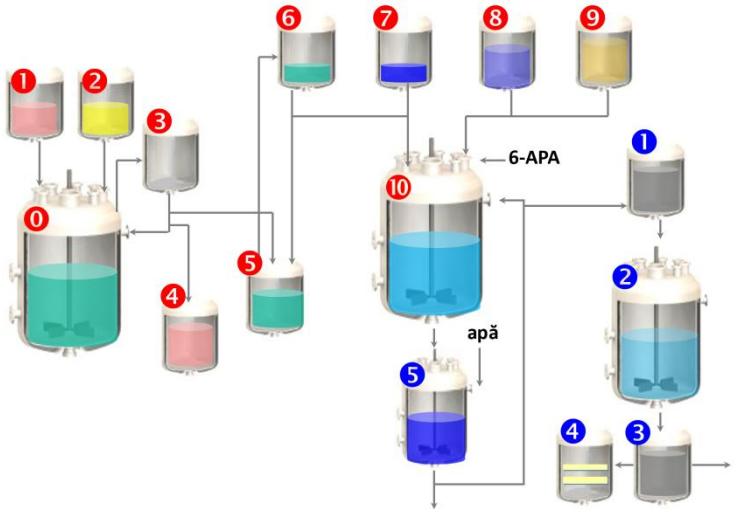
Inițial se obține clorura acidă în reactorul **(0)** (Fig. 3.5). Pentru aceasta, în reactorul **(0)** se dozează clorura de tionil ($SOCl_2$), cu ajutorul dozatorului **(1)**, și solventul, cu ajutorul dozatorului **(2)**, și se încălzește până la fierbere. Dacă clorurarea se efectuează în solvent organic, procesul durează 2 ore 30 min - 3 ore,

iar dacă $SOCl_2$ este folosit și în calitate de solvent, atunci procesul durează mai puțin, de la 1 oră 10 min până la 1 oră 30 min. Procesul decurge conform reacției:



(3.1)

După terminarea reacției solventul și $SOCl_2$ se distilează. Clorura de tionil se separă, la presiune normală, prin condensatorul **(3)**, apoi se trece și se păstrează în rezervorul **(4)**.



0 - reactor de clorurare:
1 - dozator de *SOCl₂*;
2 - dozator de solvent;
3 - condensator;
4 - rezervor cu *SOCl₂*;
5 - rezervor clorură acidă;
6 - dozator clorură acidă;
7- dozator de trietilamină;
8 - dozator de apă;
9 - dozator de acetat de butil;
10 - reactor de condensare:
1 - turn de uscare;
2 - aparat de precipitare;
3 - filtru;
4 - uscător;
5 - decantor.

Figura 3.5. Etapele tehnologice de obținere a penicilinelor semisintetice prin tehnologia inițială

Clorura acidulată se distilează la presiune redusă, se dizolvă în acetonă sau diclorometan și se depozitează în rezervorul **(5)**. Procesul de condensare are loc în reactorul de condensare **(10)**, în care se introduce solventul din dozatorul **(9)** și acidul *6-APA* și se agită până la omogenizare. Ulterior, cu ajutorul dozatorului **(7)** se adaugă trietilamină în scopul protejării grupei carboxil din acidul *6-APA* și $NaHCO_3$, pentru legarea acidului HCl format în reacție. Ulterior, masa obținută se răcește până la -15ºC, după care se adaugă, în porțiuni mici, soluția de clorură acidă dizolvată în acetonă, timp de 1 oră 30 min. Reacția de condensare propriu-zisă decurge timp de 30-40 min la temperatura de 0-20ºC. După terminarea reacției de condensare, masa obținută se răcește și se acidulează până la pH-ul 2,0-2,5, pentru separarea penicilinei acide care se extrage cu acetatul de butil. Stratul organic se readuce în reactorul **(10)**, se spală cu apă care apoi se separă.

Faza organică se usucă pe sulfat de sodiu anhidru, în turnul de uscare **(1)**, după care se tratează cu acetat de sodiu sau potasiu pentru separarea penicilinei sub formă de sare în aparatul de precipitare **(2)**. Cristalele se filtrează cu ajutorul filtrului **(3)** și se usucă în uscătorul cu strat fix **(4)** sub vid slab și la 50-60ºC.

Dezavantajele acestui proces:

- conversia chimică a penicilinei G în peniciline semisintetice se soldează cu multe deșeuri, 10-100 kg per kg de penicilină semisintetică;
- procesul presupune utilizarea solvenților halogenați toxici (*diclorometan*) și consum de energie pentru a menține temperatura joasă la acilarea *6-APA* cu clorurile acide (-15ºC).

Tehnologia integrată (actuală) de producere a amoxicilinei

Amoxicilina este o penicilină semisintetică, care aparține familiei de antibiotice *β-lactamice*, o clasă de produse farmaceutice utilizate la scară largă în tratarea infecțiilor respiratorii și ale tractului urinar și este inclusă în „Lista medicamentelor esențiale" a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS).

Tehnologia integrată pentru producția de amoxicilină implică o combinație perfectă de procese de fermentare, sinteză chimică și purificare. Fiecare etapă este controlatată cu atenție pentru a asigura producția de amoxicilină de înaltă calitate, în corespundere cu standardele farmaceutice. Progresele în biotehnologie și ingineria bioproceselor continuă să optimizeze această tehnologie, făcând amoxicilina disponibilă la scară largă și la prețuri accesibile.

Biosinteza integrată a amoxicilinei include producerea enzimatică a penicilinei G, un precursor care este supus hidrolizei enzimatice cu obținerea acidului 6-APA. Acest compus este ulterior supus procesului de condensare enzimatică cu esterul metilic (HPGM) al 4-hidroxifenilglicinei sau cu amida acestuia, conform reacțiilor prezentate în figura 3.6.

Tehnologia de obținere a amoxicilinei prin procesul integrat implică trei etape principale: 1) producerea penicilinei G prin procesul de fermentare cu *Penicillium chrysogenum* (descris anterior); 2) hidroliza enzimatică a penicilinei G cu obținerea acidului 6-APA; 3) acilarea 6-APA cu HPGM și obținerea amoxicilinei, care decurg în același proces tehnologic, conform schemei tehnologice prezentate în figura A.3.1.

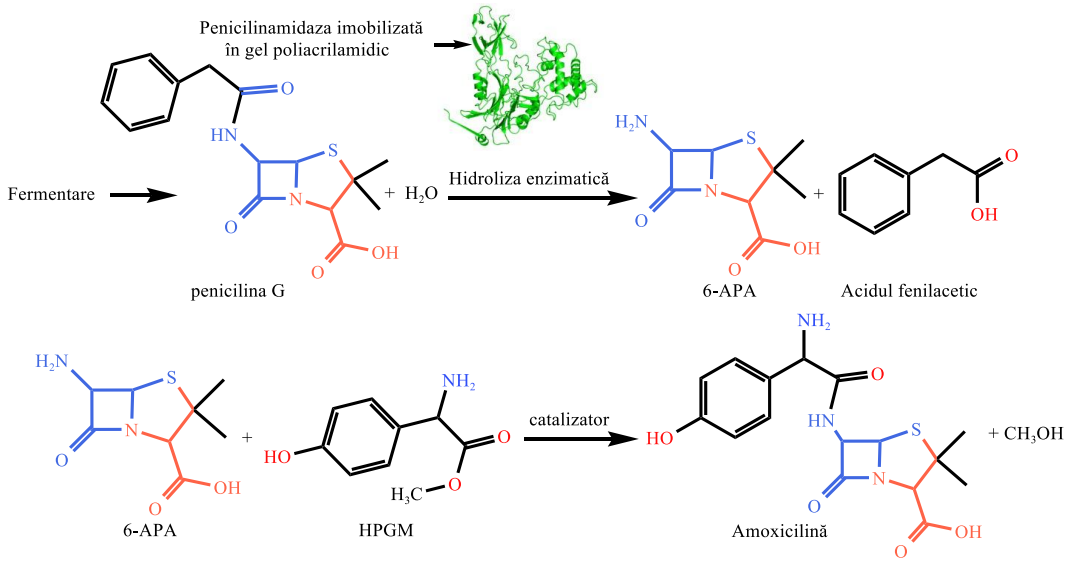


Figura 3.6. Biosinteza amoxicilinei în procesul tehnologic integrat

Procesul integrat de producere semisintetică a amoxicilinei începe cu producerea penicilinei G prin procesul de fermentare cu ajutorul *Penicillium chrysogenum* (etapele au fost descrise anterior). Ulterior are loc filtrarea biomasei și separarea soluției native. Soluția nativă ce conține penicilina G după acidulare este supusă procesului de extracție cu acetatul de butil. Extracția în mediu acid mărește randamentul de extracție. Ulterior, purificarea soluției native se efectuează prin tratare cu cărbune activ, pe suprafața căruia se adsoarbe o parte semnificativă din impuritățile prezente în soluție. Cărbunele activ cu impurități adsorbite se separă prin filtrare. Soluția purificată se tratează cu acetat de K sau Na, pentru cristalizarea penicilinei G. Cristalele obținute se separă prin filtrare, se spală cu amestec de cloroform și butanol, din nou se filtrează și se usucă cu aer fierbinte.

În etapa următoare are loc hidroliza enzimatică a penicilinei G la 6-APA, care decurge conform reacției prezentate în figura 3.4, în prezența *penicilin acilazei* și conform procedeului descris mai sus. Amestecul ce conține 6-APA se concentrează sub vid și se acidulează cu HCl concentrat, în scopul obținerii cristalelor. Cristalele 6-APA se filtrează și se spală cu solvent și se usucă cu aer fierbinte.

În ultima etapă are loc acilarea chimică sau enzimatică a 6-APA cu componente de acilare și formarea penicilinelor semisintetice. Acilarea 6-APA are loc cu esterul metilic al 4-hidroxifenilglicinei (HPGM) sau cu amida acestuia în prezența unui catalizator chimic sau a unei enzime. În calitate de catalizatori chimici de obicei se folosesc diciclohexilcarbodiimidă (DCC) sau *N*-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă (EDC). Acești catalizatori facilitează formarea

legăturii amidice dintre 6-APA și HPGM, rezultând astfel amoxicilina, conform reacției prezentate în figura 3.6.

Reacția este adesea efectuată într-un amestec de solvenți apos-organici pentru a menține solubilitatea atât a reactanților, cât și a produselor de reacție. De obicei, în calitate de solvenți se folosesc acetona, acetonitrilul sau un amestec de apă și acești solvenți. Pentru a optimiza viteza reacției și randamentul procesului, temperatura trebuie menținută în intervalul 20-30ºC, iar pH-ul acestei reacții de acilare se menține riguros în intervalul 6-7 prin folosirea soluțiilor tampon.

Amestecul 6-APA și HPGM este agitat și menținut la temperatura și pH-ul optim. Catalizatorul activează gruparea carboxil a HPGM față de gruparea amină a 6-APA și astfel facilitează formarea legăturii amidice.

După terminarea reacției, amestecul este procesat pentru a îndepărta catalizatorul și orice produs secundar. Ulterior, amestecul de reacție este răcit pentru a induce cristalizarea amoxicilinei. Alegerea solventului și a vitezei de răcire sunt esențiale pentru a obține cristale de înaltă puritate. Pentru cristalizarea amoxicilinei, acetatul de etil este considerat unul dintre cei mai buni solvenți datorită profilului său optim de solubilitate, capacității de a produce cristale de înaltă puritate, ușurinței de îndepărtare și stabilității chimice. Urmând un proces de cristalizare controlat cu acetat de etil, producătorii pot realiza o purificare eficientă a amoxicilinei. Astfel, soluția de amoxicilină brută este amestecată cu acetat de etil (ester etilic al acidului acetic) la temperatura de 50-60ºC, pentru a forma o soluție saturată. Soluția obținută se răcește lent până la temperatura camerei sau la o temperatură inferioară acesteia. Răcirea controlată este crucială pentru formarea treptată a cristalelor de amoxicilină. Pe măsură ce soluția se răcește, amoxicilina va începe să se nucleeze (este începutul formării unei noi faze termodinamice, în cazul dat – solidificarea) și să se formeze cristale. Răcirea lentă are ca rezultat formarea cristalelor mai mari și mai pure. Ulterior, cristalele solide de amoxicilină se separă de solvent prin filtrare. Pentru o separare mai eficientă este recomandată filtrarea în vid. Apoi cristalele de amoxicilină se spală cu o cantitate mică de acetat de etil rece, pentru a îndepărta orice impurități reziduale. Cristalele spălate se usucă sub vid sau într-un desicator pentru a îndepărta urmele de solvent. Amoxicilina pură este ambalată și depozitată pentru utilizarea ulterioră.

După cum s-a menționat anterior, acilarea 6-APA cu HPGM pentru obținerea amoxicilinei poate decurge și în prezența unui biocatalizator. Utilizarea unei enzime în calitate de catalizator oferă mai multe avantaje, inclusiv condiții de reacție blânde, specificitate ridicată și mai puține produse secundare; procesul este eficient și prietenos mediului ambiant. În calitate de biocatalizator, în acest proces

de obicei se folosește enzima *penicilin acilaza* (cunoscută și sub denumirea de *penicilin amidază* sau *penicilin G acilază*).

Pentru acilarea enzimatică a 6-APA cu HPGM, se adaugă o soluție tampon, pentru menținerea pH-ului în intervalul 7,0-7,5, care este optim pentru activitatea enzimatică, iar la soluția obținută se adaugă penicilin acilaza. Această enzimă catalizează formarea legăturii amidice dintre 6-APA și HPGM, ca rezultat se obține *Amoxicilina*. Reacția decurge la o temperatură moderată, de obicei în jur de 25-30ºC, temperatura optimă pentru activitatea enzimatică. Odată ce reacția este completă, enzima este îndepărtată prin filtrare sau centrifugare. Cristalizarea și purificarea *amoxicilinei* se face ca în cazul anterior.

Avantajele acilării enzimatice sunt:

- procesul enzimatic funcționează în condiții blânde (pH neutru, temperatură moderată), astfel se reduce riscul de degradare a compușilor sensibili;
- specificitatea ridicată a penicilin acilazei asigură acilarea selectivă, rezultând mai puține produse secundare și randamente mai mari în *amoxicilină*;
- procesul enzimatic este mai prietenos mediului înconjurător în comparație cu cataliza chimică, deoarece generează mai puține deșeuri toxice și exclude necesitatea utilizării unor reactivi toxici;
- consum de energie mai redus datorită condițiilor de reacție blânde.

Prin controlul riguros al condițiilor de reacție și al etapelor ulterioare de cristalizare și purificare se obține *amoxicilină* de puritate înaltă.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Analizați comparativ structura chimică și mecanismele de acțiune a penicilinelor naturale și semisintetice.
2. Argumentați avantajele utilizării penicilinelor semisintetice comparativ cu cele naturale, integrând criterii de eficiență terapeutică, stabilitate și spectru de acțiune.
3. Scrieți și interpretați reacțiile de biosinteză a acidului 6-aminopenicilanic (6-APA) și a principalelor peniciline semisintetice, evidențiind rolul fiecărui precursor biochimic.
4. Elaborați o schemă biotehnologică detaliată de producere a 6-APA, indicând principalele etape de proces, condițiile tehnologice și echipamentele necesare.
5. Proiectați o schemă tehnologică comparativă a metodelor tradiționale și integrate de obținere a penicilinelor semisintetice, cu accent pe impactul tehnologic, ecologic și economic.

6. Argumentați avantajele tehnologice, economice și ecologice ale utilizării biotehnologiei integrate în producerea penicilinelor semisintetice, incluzând aspecte legate de sustenabilitate și reducerea consumului de solvenți.
7. Descrieți și evaluați metodele fizice, chimice și fizico-chimice utilizate pentru izolarea și purificarea 6-APA, evidențiind aplicabilitatea fiecărei metode în context industrial.
8. Analizați metodele moderne de izolare și purificare a penicilinelor semisintetice, justificând alegerea celor mai eficiente tehnici în funcție de caracteristicile produsului și cerințele de reglementare.
9. Discutați parametrii optimi (pH, temperatură, timp de reacție, concentrații) în procesul biotehnologic de obținere a 6-APA și amoxicilinei și impactul acestora asupra randamentului și calității produsului final.

BIBLIOGRAFIE

1. CUTHBERTSON, A.B., RODMAN, A.D., DIAB, S., GEROGIORGIS, D.I. Dynamic Modelling and Optimisation of the Batch Enzymatic Synthesis of Amoxicillin. In: *Processes*, 2019, 7(6), 318. https://doi.org/10.3390/pr7060318.
2. WU, Q., CHEN, C.X., DU, L.L., LIN, X.F. Enzymatic Synthesis of Amoxicillin via a One-pot Enzymatic Hydrolysis and Condensation Cascade Process in the Presence of Organic Co-solvents. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 160(7), pp. 2026–2035. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8847-x.
3. SPIESS, A., KASCHE, V. Enzymatic Synthesis of Amoxicillin. Van Broekhoven, A., Shapiro, F., Anné, J. (eds) Novel Frontiers in the Production of Compounds for Biomedical Use. In: *Focus on Biotechnology*. Springer, Dordrecht 2001, 1. https://doi.org/10.1007/0-306-46885-9_11.
4. GONÇALVES, L.R.B., SOUSA, R., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J.M., GIORDANO, R.L.C., GIORDANO, R.C. Enzymatic synthesis of amoxicillin: Avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 80(6), pp. 622–631. https://doi.org/10.1002/bit.10417.
5. GONÇALVES, L.R.B., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M., GIORDANO, R.L.C. The role of 6-aminopenicillanic acid on the kinetics of amoxicillin enzymatic synthesis catalyzed by penicillin G acylase immobilized onto glyoxyl-agarose. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(4), pp. 464–471. https://doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00120-5.
6. SHARMA, A., THAKUR, S., GUPTA, T.K., KHURANA, P., THATAI, S. Analyzing of 6-APA for Synthesis of Amoxicillin. In: Rattan, S., Gupta, B., Jeyaseelan, C., Gupta, A. (eds) Emerging Trends in Synthesis and Catalysis in Chemistry. In: *Emerging Trends in Synthesis and Catalysis in Chemistry*, 2024, 51, pp. 147-153. https://doi.org/10.1007/978-981-97-5169-3_11.

7. ALEMZADEH, I. , BORGHEI, S., ROOSTAAZAD, R. Enzymatic Synthesis of Amoxicillin with Immobilized Penicillin G Acylase. In: *Scientia Iranica*, 2010, 17(1), pp. 106-113. ISSN 1026-3098.
8. OZCENGIZ, G., DEMAIN, A.L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. In: *Biotechnology Advances*, 2013, 31(2), pp. 287–311. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.12.001.
9. VOLPATO, G., RODRIGUES, R. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. In: *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(32), pp. 3855–3873. https://doi.org/10.2174/092986710793205435.
10. BRUGGINK, A., ROY, P.D. Industrial Synthesis of Semisynthetic Antibiotics. In: *Bruggink, A. (eds) Synthesis of β-Lactam Antibiotics.* Springer, Dordrecht, 2001. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0850-1_1.
11. HAMILTON-MILLER, J.M.T. Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins. In: *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 31(3), pp. 189–192. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.11.010.
12. HAMED, R.B., GOMEZ-CASTELLANOS, J.R., HENRY, L., DUCHO, C., MCDONOUGH, M.A., SCHOFIELD, C.J. The enzymes of *β*-lactam biosynthesis. In: *Nat. Prod. Rep*., 2013, 30(1), pp. 21–107. https://doi.org/10.1039/c2np20065a.
13. BRUGGINK, A., ROY, P.D. Industrial Synthesis of Semisynthetic Antibiotics. In: *Synthesis of β-Lactam Antibiotics*, 2001, pp. 12–54. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0850-1_1.

4. BIOTEHNOLOGIA CEFALOSPORINELOR

1. Cefalosporine: clasificarea, structura chimică și mecanisme de acțiune
2. Biosinteza cefalosporinelor naturale
3. Biotehnologia cefalosporinelor naturale: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare
4. Biosinteza cefalosporinelor semisintetice. Obținerea și spectrul de acțiune

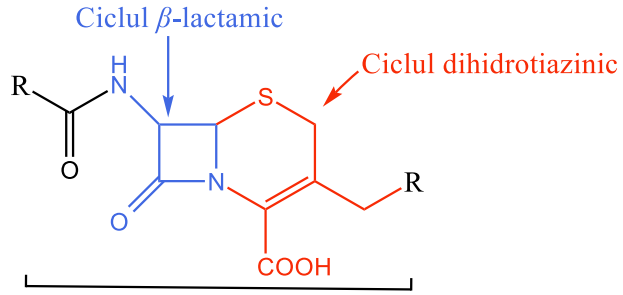
Abilități

Studentul:

- clasifică cefalosporinele naturale și cele de semisinteză;
- explică mecanismul de acțiune a cefalosporinelor asupra pereților celulari bacterieni, corelând cu spectrul lor antibacterian;
- explică mecanismele de rezistență dezvoltate de bacterii împotriva cefalosporinelor și impactul acestora asupra eficienței terapeutice;
- estimează activitatea biologică a cefalosporinelor naturale în comparație cu cele de semisinteză;
- scrie ecuațiile reacțiilor de biosinteză a cefalosporinelor naturale și a celor de semisinteză;
- propune și descrie etapele și parametrii tehnici ai unui proces biotehnologic de producere a cefalosporinelor;
- aplică metode fizice (filtrare, centrifugare), chimice (precipitare, extracție) și fizico-chimice (dializă, cromatografie) pentru izolarea, purificarea și condiționarea cefalosporinelor;
- integrează reglementările de calitate (GMP, GLP) și de siguranță în analiza proceselor de producție a cefalosporinelor;
- aplică principiile inovării tehnologice în propunerea de soluții sustenabile pentru procesele de biosinteză și formulare a cefalosporinelor.

4.1. Cefalosporine: clasificarea, structura chimică și mecanisme de acțiune

Cefalosporinele (sau cefemele) sunt antibiotice care fac parte din familia antibioticelor *β-lactamice*, care au structura chimică asemănătoare cu cea a peniclinelor. Nucleul de bază este acidul 7-aminocefalosporanic (7-ACA) ce constă dintr-un ciclu *β*-lactamic condensat cu un ciclu dihidrotiazinic (Fig. 4.1).



Acid 7-aminocefalosporanic (7-ACA)

Figura 4.1. Formula generală de structură a *cefalosporinelor*

Cefalosporinele (CF) au fost descoperite de biologul *Giuseppe Brotzu* la Institutul din Cagliari, Sardinia. În anul 1945, Brotzu a izolat o ciupercă microscopică numită *Cephalosporium acremonium* al cărei filtrat de cultură avea proprietăți antistafilococice. Acest microorganism a fost trimis la Oxford în 1948, unde după mai multe cercetări, în 1953, a fost izolată și purificată CF și determinată structura acesteia de către *Abraham* și *Newton* în 1961. Cefalosporina C a reprezentat modelul structural care a stat la baza prospectării cefalosporinelor de semisinteză. Astfel, în 1964 a fost obținută *cefalotina*, prima CF semisintetică. Cefalosporinele sunt foarte utilizate în terapia medicală, având o mare importanță în tratarea multor infecții grave. Actualmente, mai mult de 50 CF semisintetice sunt de uz medical. Din comercializarea acestora se obțin 9 miliarde de dolari americani anual.

Termenul „cefalosporine” (CF) se referă la peste 50 de antibiotice semisintetice derivate de la cefalosporina C (CFC). CFC nu manifestă proprietăți antibacteriene puternice, prin urmare nu este de interes medical. CF diferă după tipul radicalilor R din pozițiile C_7 și/sau C_3 (Fig. 4.2).

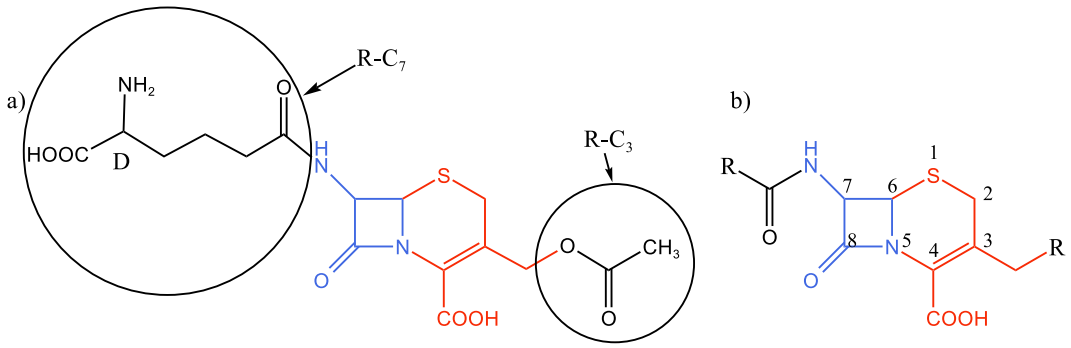


Figura 4.2. Formula de structură a *cefalosporinei C* (a) și formula generală de structură a cefalosporinelor semisintetice (b)

Mecanismul de acțiune a cefalosporinelor

Cefalosporinele au acţiune bactericidă. Analog penicilinelor acționează asupra unor proteine receptoare specifice, prin blocarea formării legăturilor transversale ale polimerului peptidoglicanic din structura peretelui celulelor bacteriene activând, astfel, autoliza acestuia. Acest mecanism include:

- *Inhibarea sintezei peretelui celular*

Legarea de proteinele care leagă penicilinele (**PLP**): Cefalosporinele își exercită efectul antibacterian prin legarea de PLP, care sunt enzime implicate în sinteza peretelui celular bacterian. PBP-urile sunt esențiale pentru legarea încrucișată a lanțurilor de peptidoglicani care oferă rigiditate și rezistență peretelui celular bacterian.

- *Inhibarea reticulării peptidoglicanilor*

Prin legarea la PLP, cefalosporinele inhibă etapa finală de transpeptidare a sintezei peptidoglicanilor. Acest fapt blochează formarea legăturilor intercatenare ale stratului peptidoglicanic, formându-se un perete celular non-funcțional.

- *Liza și moartea celulară*

Inhibarea sintezei peptidoglicanilor declanșează activarea enzimelor autolitice în celula bacteriană. Aceste enzime degradează peptidoglicanul existent, slăbind și mai mult peretele celular. Integritatea peretelui celular compromis duce la instabilitate osmotică, determinând umflarea celulei bacteriene și, în cele din urmă, explodarea (liza celulară) din cauza diferenței presiunii osmotice din interiorul și exteriorul celulei.

Clasificarea cefalosporinelor

Cefalosporinele sunt clasificate în cinci generații în funcție de anumite criterii biologice și clinice, precum spectrul lor de acțiune și stabilitatea față de *β*-lactamazele produse de bacterii.

Prima generație: eficiente în primul rând împotriva bacteriilor G(+) și a unor bacterii G(-).

A doua generație: activitate îmbunătățită împotriva bacteriilor G(-) și stabilitate îmbunătățită a *β*-lactamazei.

A treia generație: spectru larg de activitate, în special împotriva bacteriilor G(-), cu o rezistență mai bună la *β*-lactamaze.

A patra generație: spectru extins de activitate cu rezistență crescută la *β*-lactamaze.

A cincea generație: active împotriva *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) și activitate largă G(+) și G(-).

Cefalosporinele sunt utilizate la scară largă în practica clinică datorită eficacității, spectrului larg de acțiune și toxicității scăzute. Ele sunt administrate pentru tratarea infecțiilor tractului respirator, urinar, ale pielii și a septicemiei.

Majoritatea cefalosporinelor sunt ineficiente faţă de stafilococii rezistenţi la meticilină şi faţă de enterococi.

Generaţia 1 include cefalosporinele clasice, cum ar fi cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, ceftrizina, cefapirina, cefadroxil, cefradina ş.a. Spectrul de acţiune cuprinde o bună parte din cocii G(+), inclusiv pneumococul, streptococul (hemolitic, piogen, viridans), stafilococul auriu, tulpinile penicilinazo-pozitive, cocii G(-) – meningococul, gonococul. Dintre bacilii G(+) sunt sensibili *Cl. perfringens* şi bacilul difteric. Eficacitatea faţă de bacilii G(-) este în general mică. Relativ sensibili sunt *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis.*

Cefalosporinele din generaţia a 2[a]

Este o grupă heterogenă de preparate cu particularităţi individuale de activitate farmacocinetică şi toxicitate. Dintre acestea fac parte: cefamadolul, cefaclorul, cefuroxima și cefoxitina.

Aceste antibiotice au un efect mai slab față de bacteriile G(+), însă un efect mai înalt față de enterobacterii și o rezistență mai înaltă față de *β*-lactamaze, în special față de cele produse de bacteriile G(-). În general, sunt active faţă de aceleaşi microorganisme ca preparatele din generaţia 1, dar acţionează asupra unui număr mai mare de bacterii G(-). La cefalosporinele de generaţia a II-a sunt sensibile *Enterobacter, Klebsiella*, inclusiv tulpinile rezistente la cefalotină, tulpinile indol pozitive de *Proteus*. Cefamandolul, cefuroxima, cefonicidul, cefaclorul sunt active faţă de *H. influenzae, B. fragilis*, unele tulpini *Serratia,* dar inactive faţă de *Serratia, B. Fragilis, Haemophilus influenzae*, enterococi şi *Pseudomonas aeruginosa*.

Cefalosporinele din generaţia a 3[a]

Din această generație fac parte: cefatoxima, ceftriaxona, cefixima și cefoperazona. Sunt rezistente la *β-lactaze*. Spectrul de acţiune a acestor preparate este extins pentru microorganismele G(-). Preparatele din această generaţie de cefalosporine au o activitate înaltă faţă de *Haemophilus influenzae, Enterobacter* (inclusiv tulpinile polirezistente), *Klebsiella pneumoniae, Branhamella catarrhalis, Proteus vulgaris, Citobacter, Serratia, Providencia*.

Activitatea asupra *Bacilului piocianic* şi *Bacteroides fragilis* este moderată (cu excepţia ceftizoximei, care prezintă o activitate înaltă faţă de *B. fragilis*). Activitatea asupra microorganismelor anaerobe este similară cefalosporinelor din

generaţia I. Ceftazidima şi cefoperazona sunt active faţă de *Pseudomonas aeruginosa*, însă alte preparate au acţiune moderată doar asupra unor tulpini.

Cefalosporinele din generaţia a 4[a]

Din această generație fac parte: cefepima și cefpiroma.

Cefepima este principala cefalosporină din generaţia a 4[a]. Are un spectru antibacterian larg şi bacteriile, de regulă, în special producătoare de *β-lactamaze*, nu dezvoltă rezistență la acest antibiotic. Spre deosebire de cefalosporinele din generația a 3[a], antibioticul pătrunde mai repede prin membrana unor bacterii G(-), datorită sarcinii pozitive a moleculei, care ușurează trecerea prin canalele membranei. Are afinitate superioară faţă de proteinele membranare receptoare.

Spectrul antibacterian include bacili G(+) şi G(-). Enterobacteriaceele sunt foarte sensibile la acţiunea preparatului, atât cele care nu produc *β-lactamaze* (*E. coli, Proteus mirabilis*), cât şi cele care secretă *β-lactamaze* (*Enterobacter, Citrobacter, Serratia marcescens, Morganella morganii, Proteus*). Antibioticul are o activitate mare faţă de *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoae*, este activ faţă de stafilococul auriu, sensibil la meticilină şi faţă de streptococi (în afara enterococului). Antibioticul de asemenea este activ faţă de *Pseudomonas* şi alte bacterii G(-) care au dezvoltat rezistență la cefalosporinele din generaţia a 3[a]. Majoritatea enterococilor şi *Listeria monocitogenes* sunt rezistente. Activitatea faţă de *Bacteroides fragilis* şi alţi anaerobi este mică sau nulă.

Cefpiroma este o cefalosporină de generaţia a 4[a] cu un spectru antibacterian similar cefotaximei. Este mai activă în comparație cu cefotaxima faţă de streptococi, enterococi, bacteriacee, *Pseudomonas aeruginosa*. Este rezistentă la acţiunea multor *β-lactamaze*.

Cefalosporinele din generaţia a 5[a]

Din această generație fac parte: ceftarolina, ceftobiprolul (zeftera), fosamilul (zinforo), ceftolozanul, cefditorenul.

Această generație de cefalosporine are efecte mai puternice asupra bacteriilor G(+) decât cele patru generații anterioare, în special asupra *Staphylococcus aureus* rezistentă la meticilină, la vancomicină, pneumonie *Streptococcus* rezistentă la penicilină și la unele bacterii anaerobe. Efectul asupra bacteriilor G(-) este similar cefalosporinelor din generația a 4[a].

Ceftarolina, sub formă de promedicament (fosamil), este activă faţă de bacterii cu rezistenţă multiplă (*S. aureus, H. influensae*, streptococi, enterobacterii). Utilizată în tratarea infecţiilor dermice şi ale ţesuturilor moi, pneumoniilor extraspitaliceşti şi în tratamentul pneumoniilor nosocomiale, infecţiilor cauzate de *S. aureus* vancomicin-rezistent, infecţiilor sistemului nervos central.

Ceftolozanul este similar cefalosporinelor din generaţia a 3[a], dar are o activitate mai importantă faţă de *P. aeruginosa*, rezistentă la ceftazidim. Combinația ceftolozan+tazobactam este activă faţă de microorganismele ce produc *β-lactamaze* cu spectru larg, cu excepţia metalo-*β-lactamazelor*.

4.2. Biosinteza cefalosporinelor naturale

Dintre CF naturale interes industrial prezintă CFC, care are activitate antibacteriană foarte slabă, dar este pe larg folosită la obținerea acidului 7-aminocefalosporanic (7-ACA) – principalul precursor în biosinteza CF semisintetice. Procesul de fermentare are loc sub acțiunea *Acremonium chrysogenum*. Prin intermediul ingineriei genetice se obțin culturi care produc CFC în cantități mari. Mecanismul de biosinteză a CFC are loc prin mai multe etape și este prezentat în figura A.4.1.

În prima etapă de biosinteză a CFC sunt implicați trei aminoacizi de bază acidul *L*-*α*-aminoadipic (*α*-AAA), *L*-cisteina (*L*-Cys) și *L*-valina (*L*-Val), care sunt activați inițial de ATP pentru a forma intermediari aminoacil-AMP. Această activare este necesară pentru formarea legăturii peptidice. Ulterior aminoacizii activaţi sunt adăugaţi secvenţial la un domeniu de tiolare din cadrul enzimei ACV (5-amino-5-carboxipentanoil)-*L*-cisteinil-*D*-valin sintaza), formând un lanţ peptidic în creştere. Inițial reacționează acidul *L*-*α*-aminoadipic, apoi *L*-cisteina și în final *L*-valina.

În prima etapă acizii *α*-AAA, *L*-Cys și *L*-Val condensează cu formarea tripeptidei 5-(*L*-*α*-aminoadipil)-*L*-cisteinil-*D*-valină. Această reacție este catalizată de enzima 5-amino-5-carboxipentanoil)-*L*-cisteinil-*D*-valin sintaza (ACV).

În a doua etapă ACV ciclizează, sulfura de cisteinil formează o legătură cu *α*-aminoadipil carbonilul, rezultând inelul *β-lactamic*. Această reacție și reacția următoare sunt catalizate de izopenicilin *N* sintaza. Oxigenul activat facilitează reacția de ciclizare, având funcția de cofactor.

În a treia etapă restul de valină formează o legătură cu azotul cisteinil, rezultând inelul tiazolidinic. Produsul final al reacțiilor 2 și 3 (Fig. A.4.1) este izopenicilina N, compus care conține și inelul *β*-lactamic, și inelul tiazolidinic.

În a patra etapă are loc conversia izopenicilinei N la penicilina N printr-o reacție de epimerizare, modificând stereochimia lanțului lateral aminoadipoil. Această etapă este catalizată de izopenicilina N epimeraza.

În a cincea etapă penicilina N suferă o extindere a inelului tiazolidinic cu formarea deacetoxicefalosporinei C (DAOC). Această reacție este catalizată de enzima expandaza. DAOC este hidroxilată în continuare la deacetilcefalosporină C (DAC), reacția este catalizată de hidroxilaza.

În cele din urmă, în ultima etapă, DAC este acetilată la grupa 7-amino cu formarea cefalosporinei C. Această etapă este catalizată de DAC acetiltransferaza.

Inițial sursa de carbon se consumă pentru creșterea și înmulțirea microorganismelor, iar ulterior pentru producerea CFC.

În etapele de producere a CFC este necesar un echilibru între glucoza metabolizată rapid și hidrații de carbon care se vor metaboliza în timp. Concentrația glucozei trebuie menținută constantă, la o valoare mai mică de 5g/L. La valori înalte glucoza interferează cu alte procese metabolice, inclusiv blochează enzima expandaza care catalizează etapa a 5-a de biosinteză: transformarea penicilinei N în deacetoxicefalosporina C. În calitate de sursă de carbon metabolizată în timp servește uleiul de soia în concentrație de până la 1%. În faza de producere a CFC, pH-ul se menține în intervalul 6-7 prin adăugare de amoniac. Temperatura bioreacției constituie 24-28ºC.

Procesul de biosinteză este aerob. Dacă concentrația O_2 scade, atunci se blochează activitatea expandazei și, ca rezultat, se acumulează penicilina N. Reducerea presiunii O_2 (pO_2) de la 40% la 35% diminuează producerea CFC de la 7,2 g/L la 1,1 g/L, iar concentrația penicilinei N crește de la 2,6 g/L la 7,7 g/L.

O altă problemă în biosinteza CFC este acumularea deacetilcefalosporinei C, antibiotic inutil, prezența căruia presupune costuri suplimentare la purificare. Această problemă este rezolvată prin stimularea sau expresia genei responsabile de acilare, etapa a 7-a.

4.3. Biotehnologia cefalosporinelor naturale: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Selectarea microorganismelor și determinarea compoziției mediului nutritiv

Mediul nutritiv conține extract de porumb – sursă de azot și fosfor, ulei de soia, făină din semințe de bumbac, făină de arahide – sursă de proteine. Compoziția mediului nutritiv variază în funcție de cultura microorganismelor folosite în proces.

Unele microorganisme au nevoie de metionină pentru a produce CFC (mediul 1), altele de sulfați (mediul 2) (Tab. A.4.1). În calitate de sursă de carbon este folosită glucoza, hidrații de carbon obținuți prin hidroliza amidonului sau uleiul de soia (care se metabolizează în timp).

În cazul microorganismelor dependente de Met, acest aminoacid induce activitatea a patru enzime implicate în biosinteza CFC: ACV sintetaza, izopenicilin N sintaza, izopenicilin N epimeraza și DAOC sintaza (expandaza). De aceea este foarte importantă menținerea conținutului optim de metionină pe parcursul întregului proces de producere a CFC.

Cefalosporinele naturale au o activitate antimicrobiană foarte mică și nu prezintă interes farmaceutic. Dintre toate cefalosporinele naturale, interes industrial prezintă CFC, care la fel are activitate antimicrobiană mică, dar este pe larg folosită în calitate de precursor, în producerea 7-ACA sau CF semisintetice în proces integrat. Schema tehnologică de producere a CFC este prezentată în figura A.4.2.

Inițial, cultura de microorganisme (*Acremonium chysogenum,* modificate genetic pentru producerea CFC în cantități cât mai mari) este inoculată într-un recipient (30 mL) cu mediu de agar (hidrat de carbon cu putere de gelifiere foarte mare) timp de 72 de ore, la temperatura de 25-28ºC. Apoi inoculul se trece într-un recipient mai mare cu volumul de 1,0-1,5 L, timp de 70-90 de ore la temperatura de 28ºC. Ulterior, cultura de microorganisme se inoculează în fermentatorul inoculator cu capacitatea de 1-2 m^3, unde microorganismele cresc și se înmulțesc, timp de 85-96 de ore la temperatura de 28ºC. Mediul de cultură, recipientele, precum și aerul sunt în prealabil sterilizate, pentru a evita infectarea microorganismelor, decesul acestora și obținerea produselor nedorite. Procesele de sterilizare sunt detaliat descrise în Compartimentul II. În următoarea etapă microorganismele sunt transferate în fermentatorul intermediar cu capacitatea de 20 m^3, timp de 45-50 de ore, la temperatura de 28ºC. În final, microorganismele sunt transferate în fermentatorul de regim cu capacitatea de 100 m^3, unde are loc procesul de producere a CFC, care durează 144-150 de ore, la temperatura de 25-29ºC. Procesul de fermentare în fermentatorul de regim durează în total 6-7 zile, timp în care se monitorizează temperatura, pH-ul, pO_2, concentrația hidraților de carbon, a amoniacului, fosfaților, sulfului, precum și concentrația CFC.

Următoarea etapă în procesul de producere a CFC este purificarea acesteia. Durata purificării constituie în jur de 20 de ore. După fermentare, biomasa se separă prin filtrare. În următoarea etapă are loc purificarea cromatografică pe două coloane (mecanismul este prezentat în figura A.4.3.). Prima coloană este umplută cu *Diaion™ HP20* (fază staționară, adsorbant sintetic cu matrice de polistiren/divinilbenzen), operată la pH 5,5-6,0. Pe această coloană se separă substanțele hidrofobe colorate, reținerea CFC este minimă, mai puțin de 3%. De regulă, se separă 360 g CFC per litru fază staționară. În a 2-a coloană care conține *Sepabeads SP700* (fază staționară, adsorbant sintetic cu o suprafață de adsorbție de 1200 m^2/g), la pH=6, se separă CFC de deacetoxicefalosprina C (DAOC) și deactilcefalosporina C (DAC). După ajustarea pH-ului la 2,8–3,0, percolatul din captator este încărcat în coloană. Eluția CFC separată de DAC și DAOC se realizează printr-o schimbare a pH-ului la 6. Randamentul este de 52 g CFC per litru de rășină. Ulterior, prin 2 coloane de schimbători de ioni, cationică și anionică, CFC se izolează sub formă de săruri de potasiu sau de sodiu. Purificarea cu

schimbători de ioni se face pentru a îndepărta culoarea rămasă. Coloana „decolorant” este umplută cu un schimbător de anioni, de ex., *Diaion* DAC11, echilibrat sub formă de acetat. Percolatul CFC din adsorbant este trecut prin coloană. Rășina eliberează progresiv CFC înainte ca impuritățile colorate să pătrundă. Este avantajos un sistem cu trei coloane de ioniți. În prima coloană CFC este înlocuită cu impuritățile colorate. CFC eliberată înlocuiește acetatul în a doua coloană, în timp ce a treia coloană este regenerată la forma acetică. În mod obișnuit, se aplică 90 g CFC per litru de rășină distribuite în trei coloane. Un schimbător de cationi, precum *Diaion* WK40, poate fi instalat pentru a elimina potențiala contaminare cu metale care ar putea interfera cu conversia enzimatică a CFC în 7-ACA. De obicei, se pot aplica aproximativ 180 g CFC (la pH 6) per litru de rășină. Ulterior CFC se purifică prin osmoză inversă, filtrarea prin membrane semipermeabile, conform schemei din figura A.4.4.

Filtrarea prin osmoză inversă decurge sub presiune, prin membrane semipermeabile. Astfel, ionii și moleculele mici (inclusiv impuritățile) trec în soluție, în timp ce moleculele de CFC, fiind mai mari, se rețin pe membrană.

În etapa următoare CFC este cristalizată, uscată și depozitată în vederea manipulărilor chimice ulterioare sau este utilizată direct în soluție în sinteza acidului 7-ACA prin hidroliză enzimatică.

Cristalizarea CFC

Pentru a iniția procesul de cristalizare soluția este răcită treptat. Uneori se adaugă cristale mici de CFC pentru a induce formarea cristalelor mai mari. Pentru a micșora solubilitatea CFC în soluție, se adaugă acetonă sau etanol. Soluția este lăsată să stea fără agitare pentru o anumită perioadă, favorizând astfel creșterea cristalelor de dimensiunea necesară. După formarea cristalelor, acestea sunt separate de soluție folosind tehnici de filtrare, precum filtrarea în vid sau centrifugarea. Cristalele obținute sunt spălate cu solvent rece pentru a îndepărta orice impurități aderente. De obicei, solventul de spălare este același ca solventul de cristalizare, dar răcit pentru a preveni dizolvarea cristalelor.

Uscarea CFC

Cristalele spălate sunt uscate pentru a îndepărta solventul rezidual. Acest lucru poate fi realizat folosind metoda de uscare în vid. Ulterior se realizează înghețarea cristalelor și apoi sublimarea gheții sub presiune scăzută. Ca alternativă, cristalele se usucă în uscător, cu un flux de aer, la temperatura de 35-40ºC.

Puritatea și calitatea CFC cristalizate sunt verificate utilizând tehnici analitice, cum ar fi cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), spectrometria de masă (SM) și spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară

(RMN). Dacă este necesar, se continuă purificarea CFC prin recristalizare până se atinge nivelul de puritate necesar. Cristalele purificate sunt ambalate și depozitate până la utilizarea ulterioară. Productivitatea CFC ajunge până la 24-28 g/L.

4.4. Biosinteza cefalosporinelor semisintetice. Obținerea și spectrul de acțiune

Acilarea 7-ACA la atomul C_7 poate fi efectuată chimic sau enzimatic, iar sinteza cefalosporinelor substituite la atomul C_3 se efectuează doar chimic.

În UE acidul 7-ACA se obține exclusiv prin fermentare, obținerea CFC și hidroliza enzimatică a acesteia. Cefalosporinele semisintetice pot fi obținute prin diverse metode – atât chimice, cât și biochimice. Mecanismul general de obținere a 7-ACA este prezentat în figura A.4.5.

Producerea CF semisintetice implică câteva etape principale:

- producerea fermentativă a CFC;
- izolarea și purificarea CFC;
- hidroliza chimică sau enzimatică a CFC până la 7-ACA sau 7-ADCA (acidul 7-aminodezacetoxicefalosporanic);
- acilarea chimică sau enzimatică a 7-ACA / 7-ADCA în poziția C_3 și/sau C_7;
- separarea, purificarea și controlul calității CF semisintetice obținute.

Metode de obținere a precursorilor utilizați în producerea CF semisintetice

După cum s-a menționat anterior, principalul precursor în obținerea CF semisintetice este 7-ACA, care poate fi obținut prin conversia chimică (Fig. A.4.6) sau enzimatică (Fig. A.4.7) a CFC.

Transformarea chimică a CFC în 7-ACA are loc în mai multe etape (Fig. A.4.6). Inițial, grupele carboxil ale CFC sunt blocate prin reacția cu clorura de trimetilsilil, astfel încat acestea să nu interacționeze în transformările chimice ulterioare. Tratarea acestui intermediar cu clorura de fosfor (V) transformă legatura peptidică într-o funcțiune cloroiminică. Ulterior, prin interacțiune cu alcoolul propilic, are loc substituirea atomului de clor printr-un fragment propoxid cu formarea iminoeterului corespunzator. În etapa finală, prin hidroliza bazică acesta se transformă în 7-ACA.

Acest proces este dificil, energivor (are loc la temperaturi joase) și extrem de poluant (utilizarea solvenților organici, producerea deșeurilor chimice toxice și a apei poluate cu fosfați).

Anual sunt produse aproximativ 3000 de tone de 7-ACA din CFC, dintre care o parte importantă este produsă prin hidroliza chimică (China, Japonia, Coreea), iar restul prin metoda enzimatică, obligatorie în UE. Procesarea chimică a CFC reprezintă calea tradițională către intermediarul 7-ACA. În timp ce

randamentele și calitatea produsului pe cale chimică sunt excelente, un dezavantaj major este necesitatea în solvenți organici și producerea de deșeuri chimice toxice.

Producerea a 1 kg de 7-ACA din 2,4 kg CFC prin această metodă generează 9 kg de deșeuri: 2,4 kg Zn sau Na, 0,8 kg clorură de trimetilsilil ($(CH_3)_3SiCl$), 0,8 kg dimetilanilină ($C_6H_5N(CH_3)_2$, 2,7 kg diclormetan (Cl_2CH_2), 1,2 kg clorură de fosfor (V) (PCl_5), 1,5 kg alcool propilic (C_3H_8O) și 2,0 kg soluție hidroxid de amoniu (NH_4OH), propil glutamat etc.

Conversia enzimatică a CFC la 7-ACA

Deși există mai multe metode de hidroliză enzimatică, la nivel industrial este utilizată doar una. Conform acestei metode, conversia CFC la 7-ACA decurge în două etape cu un randament similar celui din producția chimică.

Inițial CFC suferă o dezaminare oxidativă în prezența enzimei *D*-aminoacid oxidaza (DAO) cu formarea KA-7-ACA (acidul cetoadipoil-7-aminocefalosporanic). În următoarea etapă peroxidul format induce o decarboxilare oxidativă spontană la GL-7-ACA (acidul glutaril-7-aminocefalosporanic). Pentru a asigura o conversie cantitativă la GL-7-ACA, după adăugarea DAO se mai adaugă cantități mici de peroxid de hidrogen. În etapa finală GL-7-ACA este hidrolizat la 7-ACA în prezența de GAC (glutaril acilaza). Industrial fiecare etapă se efectuează în reactoare separate. Procesul industrial de hidroliză enzimatică durează 6 ore.

Deșeurile rezultate prin metoda enzimatică au fost reduse esențial, până la 1%. Prin urmare, în comparație cu procesul chimic, această metodă enzimatică este mai durabilă din punct de vedere ecologic și mai atractivă din punct de vedere economic. Enzimele folosite în calitate de biocatalizatori pot fi reciclate de la 100 până 600 de cicluri de reacție. De asemenea, condițiile de reacție sunt blânde, în special temperatura și pH-ul. Cu toate acestea, obținerea acestor enzime necesită procese de fermentare bacteriană în bioreactoare separate. Ceea ce conduce la creșterea costurilor de producție pentru 7-ACA și, respectiv, a ingredientelor farmaceutice active (cefalosporine).

Există două grupe principale de cefalosporine. Primul grup derivă din penicilină (G sau V), mecanismul este prezentat în figura A.4.8. Majoritatea produselor care au activitate orală intrinsecă sunt obținute din penicilină, în special cele din prima generație. Precursorul principal utilizat în producerea CF semisintetice, din penicilinele naturale, este 7-ADCA.

Al doilea grup de CF semisintetice sunt obținute din cefalosporina C. În acest caz, în calitate de precursor este 7-ACA, iar CF semisintetice sunt obținute prin diverse metode chimice sau enzimatice, prin acilarea chimică sau enzimatică a 7-ACA, în poziția C_7 și/sau C_3; reacția generală este prezentată în figura A.4.9.

După cum s-a menționat anterior, 7-ACA poate fi obținut și pe cale chimică, una dintre metodele cunoscute este cea cu utilizarea tiazolidinei, în calitate de precursor. În cazul dat are loc conversia CFC în 7-ACA, reacție în care se formează ca intermediar tiazolidina. Aceasta implică scindarea selectivă a lanțului lateral, ciclurile *β-lactamic* și tiazolidinic fiind conservate. Acilarea ulterioară a 7-ACA în pozițiile C_3 și C_7 decurge similar cazurilor anterioare. Reacția este prezentată în figura A.4.10.

Conversia 7-ACA, în special inserarea unui nou lanț lateral la poziția C_7, frecvent se efectuează într-un proces enzimatic, ușor catalizat de penicilina G amidaza (PGA). Inserarea lanțurilor laterale la poziția C_3, adesea tioli, poate fi realizată exclusiv pe cale chimică. Înlaturarea catenei laterale 7-amino adipoil și inserarea unui alt fragment în pozitia C_7 pot fi efectuate prin sinteza chimică. Ambele metode sunt într-o competiție puternică. În timp ce anumite piețe, în mod tradițional din Orientul Îndepărtat (China, Japonia și Coreea), favorizează căile chimice și sunt parțial dispuse să plătească un preț superior pentru aceasta, producătorii europeni sunt mai predispuși să folosească procesele enzimatice. Acest lucru poate fi determinat parțial de preocupările și reglementările de mediu care cresc semnificativ costurile de producție.

Schema generală de obținere a CF semisintetice este prezentată în figura A.4.2. Procesul general cuprinde următoarele etape principale:

- obținerea CFC în proces de fermentare, cu utilizarea fungilor *Acremonium chrysogenum*;
- purificarea soluției native de CFC;
- hidroliza enzimatică a CFC cu obținerea 7-ACA;
- precipitarea și izolarea 7-ACA de puritate corespunzătoare (aproximativ 98%) pentru utilizare ulterioară la obținerea CF semisintetice;
- acilarea chimică sau/și enzimatică a 7-ACA, în pozițiile C_7 și/sau C_3.

Primele trei etape au fost descrise detaliat anterior. Penultima etapă, producerea CF semisintetice, poate fi efectuată fie prin metode chimice, fie prin acilarea enzimatică în prezența enzimei PGA (peniciln G-amidaza), preferată în Europa. După acilarea enzimatică în poziția C_7, funcționalizarea în poziția C_3 se efectuează exclusiv chimic.

Sinteza chimică tradițională necesită ca gruparea carboxilică a nucleului *β-lactamic* să fie protejată prin trimetilsililare, deoarece pentru activare sunt utilizate cloruri acide. De exemplu, clorura de *D*-fenilglicil se formează în solvenți organici halogenați din *D*-fenilglicină și PCl_5, care se formează *in situ* din PCl_3 și Cl_2. Deși randamentele sunt cantitative, solvenții și reactivii auxiliari utilizați generează până la 40 kg de deșeuri nebiodegradabile la obținerea a 1 kg de cefalexină.

În special, problemele legate de poluarea mediului ambiant și costurile asociate acestei probleme au dus la dezvoltarea unor metode alternative enzimatice viabile din punct de vedere economic și ecologic pentru derivatizarea 7-ACA în poziția C_7. Aceste conversii foarte selective sunt efectuate în general în mediu apos și la temperatura camerei.

PGA, utilizată în hidroliza cefalosporinei C, reprezintă, de asemenea, un instrument valoros în sinteza cefalosporinelor semisintetice. Totuși, la pH acid – necesar pentru menținerea formei sale disociate – activitatea PGA este redusă. Activitatea sa poate fi îmbunătățită în prezența unor solvenți hidrosolubili, care oferă condiții mai favorabile reacției.

După cum s-a menționat anterior, sinteza unei cefalosporine biologic active necesită în majoritatea cazurilor derivatizarea ambelor poziții C_3 și C_7. În cazul când se folosește acilarea prin sinteza chimică clasică, inițial 7-ACA se acilează în poziția C_3, iar apoi în poziția C_7. În schimb, în sinteza biocatalitică combinată cu cea chimică are loc derivatizarea 7-ACA mai întâi în poziția C_7, apoi în poziția C_3.

Sinteza unor CF semisintetice

În lume sunt cunoscute numeroase metode de transformare chimică a acidului 7-ACA, două dintre ele sunt cele mai utilizate, și anume: funcționalizarea în poziția C_7 și/sau C_3. Acilarea se poate efectua cu cloruri acide sau cu acizi în prezența DCC (diciclohexilcarbodiimidei). Ecuația reacției generale de substituție este prezentată în figura A.4.11.

Obținerea și spectrul de acțiune a unor CF din generația 1

CF din această clasă reprezintă o alternativă de tratament al infecțiilor provocate de *staphylococci* în cazul pacienților care nu tolerează penicilinele. Cefratrizina, cefalexina, cefradroxilul și cefradina se administrează de regulă pe cale orală.

În industrie cefalexina, cefradroxilul și cefradina se obțin prin mai multe etape din penicilinele naturale. Exemple de CF de generația 1 sunt prezentate în figura 4.3.

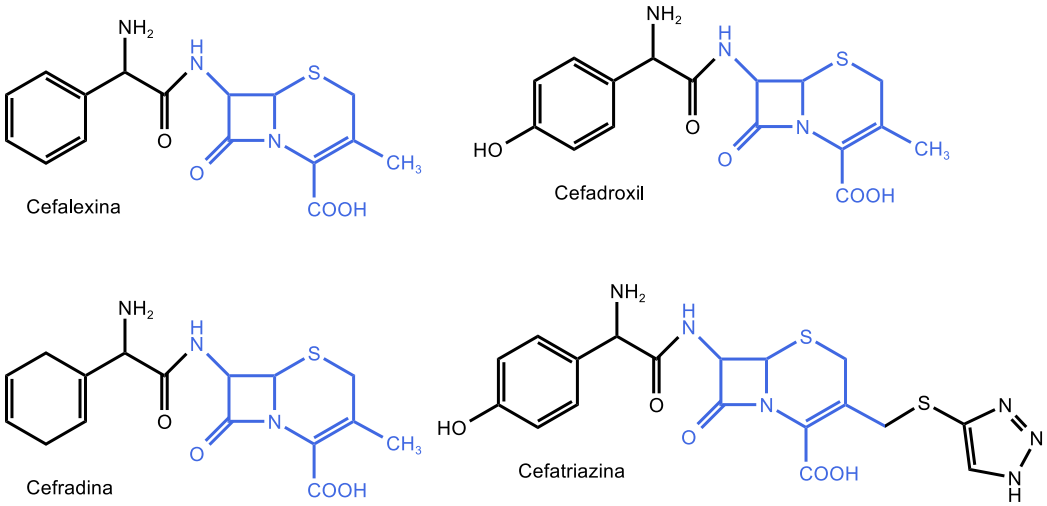


Figura 4.3. Formulele de structură a unor CF din generația 1

Cefalotina, CF din generația 1, se obține prin interacțiunea cloranhidridei acidului 2-(tien-2-il)acetic cu 7-ACA în prezența hidrogenocarbonatului de sodiu. Se administrează sub formă de sare. Ecuația reacției este prezentată în figura 4.4.

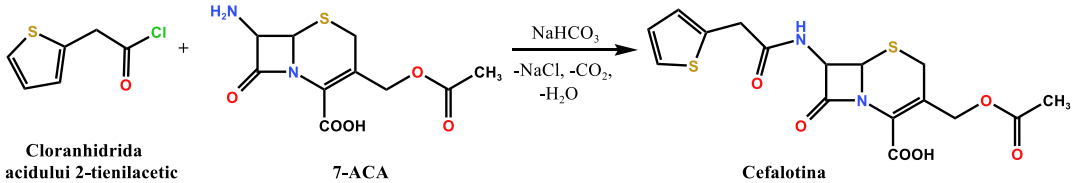


Figura 4.4. Reacția de obținere a cefalotinei

Obținerea cefalotinei include funcționalizarea chimică directă a 7-ACA în poziția C_7, cu cloranhidrida acidului 2-(tien-2-il)acetic. Astfel, cloranhidrida acidului 2-tienilacetic, în prezența hidrogenocarbonatului de sodiu, interacționează cu gruparea amină a 7-ACA, formând cefalotina. Formarea HCl pe durata procesului poate conduce la degradarea cefalotinei, de aceea reacția de acilare se realizează în prezența $NaHCO_3$, care îl neutralizează până la sare, CO_2 și H_2O.

Cefalotina este activă față de bacteriile G(+) (*staphylococci, streptococci, pneumococci, diphtheria bacilli*) și G(-) (*meningococci, gonococci, salmonella*). Este activă și față de culturile de *Staphylococci* producătoare de *β-lactamaze*. Cefalotina nu este activă față de *enterococci*: bacterii G(+) care provoacă infecții urinare, intestinale, septicemie sau sepsis. *Pseudomonas aeruginosa, Mycobecteria tuberculosis, Listeria spp.* sunt rezistente la cefalotină.

Cefalotina este utilizată pentru tratarea infecțiilor căilor respiratorii inferioare, urinare, dermice, ale țesuturilor moi, oaselor și articulațiilor, sepsisului, precum și în prevenirea infecțiilor în timpul intervențiilor chirurgicale etc.

Cefazolina, CF din generația 1, se obține în două etape.

Inițial are loc reacția dintre 7-ACA și cloranhidrida acidului tetrazolil acetic în prezența trietilaminei (pentru neutralizarea HCl). Alternativ această etapă poate fi efectuată în prezența enzimei penicilin G-amidaza (PGA).

În etapa următoare intermediarul obținut în prima etapă interacționează cu 2-mercapto-5-metil-tiadiazolul, ca rezultat are loc substituirea grupei acetil prin mercaptotiadiazol și formarea cefazolinei (Fig. 4.5).

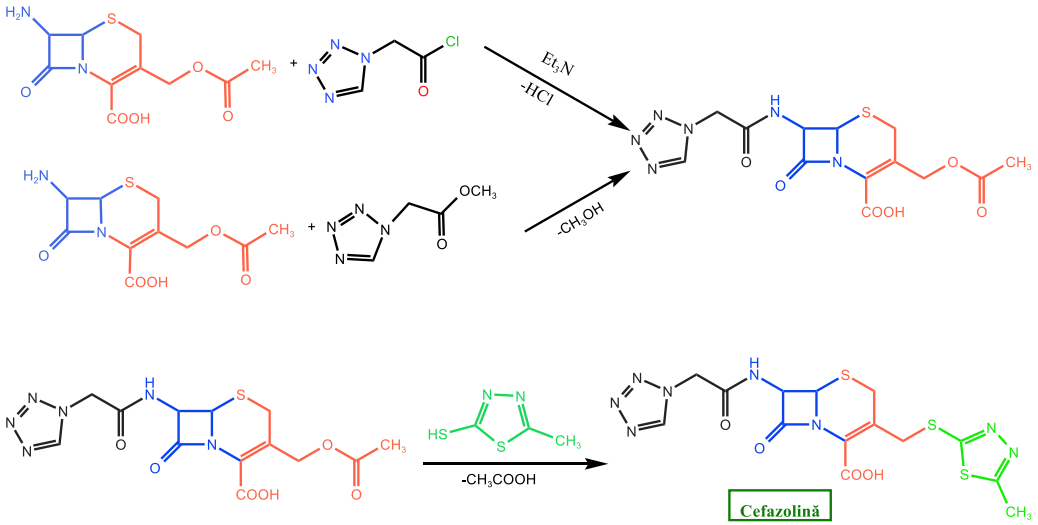


Figura 4.5. Sinteza cefazolinei din 7-ACA (acilare chimică și/sau biochimică)

Cefazolina are același spectru de acțiune ca cefalotina și este utilizată în tratarea aceloraşi infecții. La cefazolină sunt rezistente următoarele bacterii: *Enterobacter, Klebsiella, Providencia, B. fragilis*.

Analogi comerciali: cefacidal, cefazol, cefamezin, cefazil, zolin etc.

Cefapirina, CF din generația 1, se obține prin acilarea acidului 7-ACA cu cloranhidrida acidului 4-piridiltioacetic în prezența trietilaminei (Et_3N), figura 4.6.

Acidul 4-piridiltioacetic se obține prin reacția 4-cloropiridinei cu acidul mercaptoacetic în prezența unei baze. Acidul 4-piridilacetic se transformă în cloranhidridă prin reacția cu clorura de fosfor (V). Spectrul de acțiune a cefaprinei este practic identic cu cel al cefalotinei.

Analogi comerciali: bristocef, cefatrexyl, cefadil etc.

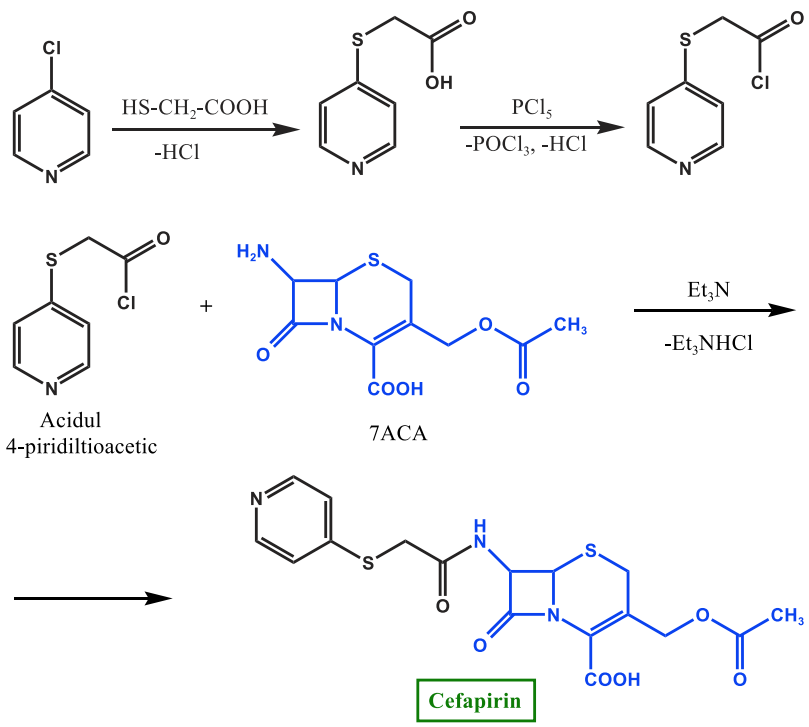


Figura 4.6. Sinteza cefapirinei din 7-ACA (acilare chimică)

Cefalexina, CF din generația 1, poate fi considerată un analog al ampicilinei. Sinteza cefalexinei implică protejarea grupei amino din fenilglicină cu cloroformiat de benzil (CFBz) și activarea grupei carboxil cu cloroformiat de izobutil (CFIb). La fiecare etapă se folosește trietilamina ca acceptor care leagă acidul clorhidric. Acest intermediar, prin interacțiune cu 7-ACA, urmată de două hidrogenări selective, formează cefalexina. În prima etapă are loc deblocarea grupei amino, iar în a doua – reducerea grupei acetil (Fig. 4.7).

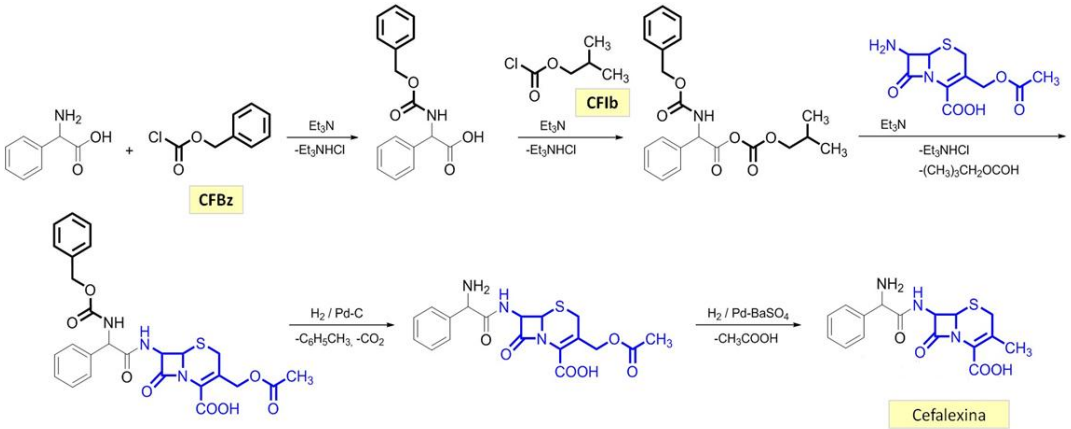


Figura 4.7. Sinteza cefalexinei din 7-ACA (acilare chimică)

Cefalexina are un spectru larg de acțiune fiind activă față de bacteriile G(+) (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae*) și G(-) (*Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, E. coli, Klebsiella pneumoniae*). Totodată, este rezistentă față de *β-lactamazele* produse de *Staphylococci*. Este activă doar față de unele enterobacterii, fiind degradată de *β-lactamazele* celorlalte enterobacterii.

Enterococcus faecalis G(+), *Pseudomonas aeruginosa* G(-), *Bacteroides fragilis* (G-), *Mycobacteria tuberculosis* sunt rezistente la cefalexină.

Cefalexina este utilizată pentru tratarea infecțiilor respiratorii, atât la nivelul căilor respiratorii superioare, cât și al celor inferioare, infecțiilor tractului urinar, pielii, țesturilor moi.

Analogi comerciali: ceporexin, oracef, ceflex, cefazal.

Cefadroxilul, CF din generația 1, este analogul cefradinei, diferă prin prezența grupei hidroxil din poziția para a inelului fenilic al fenilglicinei. Sinteza cefadroxilului este similară cefradinei, fiind prezentată în figura 4.8.

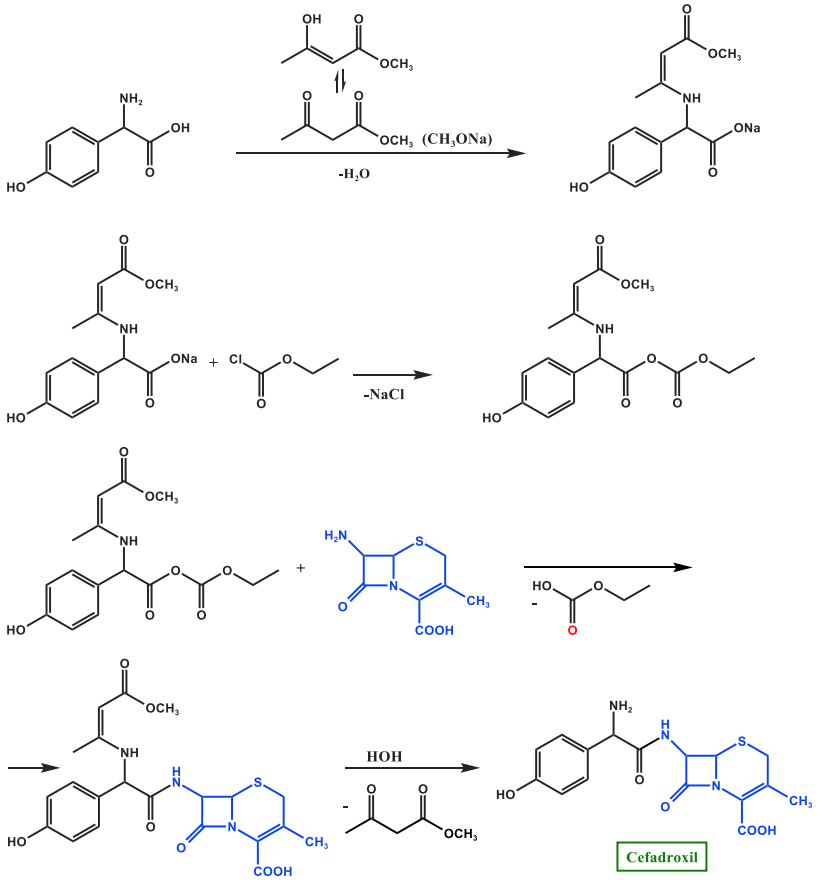


Figura 4.8. Sinteza cefadroxilului din 7-ADCA (acilare chimică)

Cefadroxilul are un spectru larg de acțiune. Este activ atât față de bacteriile G(+), cât și față de cele G(-).

Analogi comerciali: bidocef, cefadril, duracef, ultracef etc.

Cefradina, CF din generația 1, se obține prin mai multe etape din fenilglicină. Prin reducerea cu litiu în prezență de amoniac, fenilglicina formează 1,4-ciclohexadienilglicină. Protejarea grupei amino se face cu acetoacetat de metil, iar grupa carboxil se activează cu cloroformiat de etil. Intermediarul interacționează cu 7-ADCA. Inițial se formează cefradina cu grupa amino protejată, care ulterior hidrolizează la cefradina propriu-zisă. Reacțiile de sinteză a cefradinei sunt prezentate în figura 4.9.

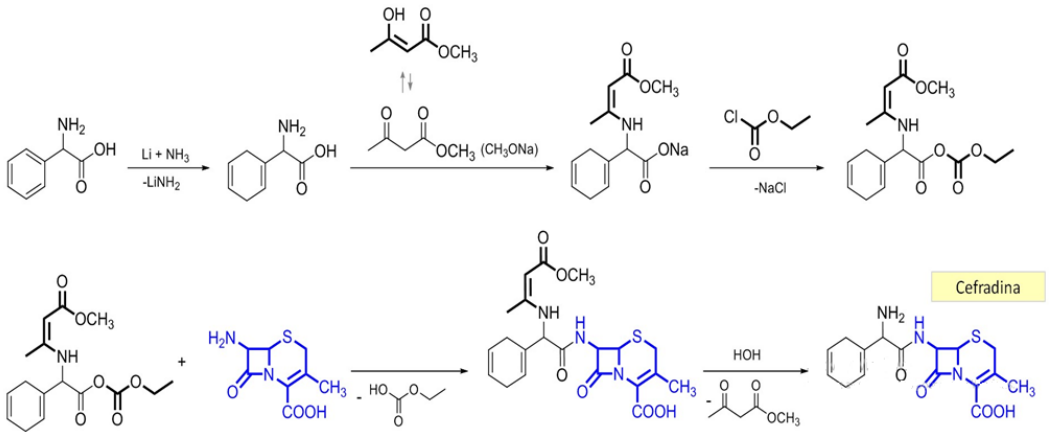


Figura 4.9. Sinteza cefradinei din 7-ADCA (acilare chimică)

Spectrul de acțiune a cefradinei este identic cu cel al cefalexinei.

Analogi comerciali: velosef, sefril, cefro etc

Obținerea și spectrul de acțiune a unor CF din generația a 2[a]

Din generația a 2[a] de cefalosporine fac parte: cefuroxima, cefamadolulul, cefonicidul, ceforanida, cefoxitina, cefotetan, cefaclor.

Aceste cefalosporine sunt mai active față de bacteriile G(+) decât cele din prima generație. Chiar dacă sunt rezistente la acțiunea *β-lactamazelor*, aceste cefalosporine nu prezintă o activitate sporită față de *P. aeruginosa*.

Din bacteriile G(-) față de care aceste cefalosporine sunt active se numără: *E. colli*, unele specii *Klebsiella, Proteus* și *Neisseria gonorrhoea*.

Principalii reprezentanți ai generației a 2[a], folosiți pe larg în tratarea infecțiilor bacteriene, sunt cefuroxima și cefamadolul, formulele de structură a acestora fiind prezentate în figura 4.10.

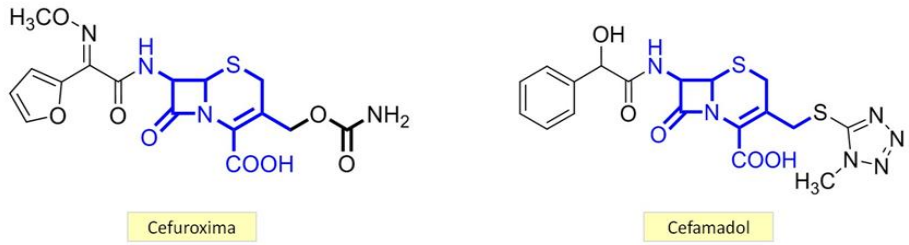


Figura 4.10. Formulele de structură a cefuroximei și a cefamadolului

Cefuroxima, CF din generația a 2[a], se obține prin reacția cloranhidridei cu acidul 7-amino-3-aminocarboniloximetil-3-cefem-4-carboxilic. Acest acid diferă de 7-ACA și 7-ADCA și se izolează din *Streptomyces lactamdurans*. Ecuația reacției de sinteză a cefuroximei este prezentată în figura 4.11.

Cloranhidrida acidului *sin*-2-metoxiamino-2-(2-furil)acetic se obține prin mai multe etape din 2-acetilfuran. Inițial are loc oxidarea 2-acetilfuranului la acidul 2-furilglioxalic, care prin interacțiune cu metoxiamina formează acidul *sin*-2-metoxiamino-2-(2-furil)acetic, care la tratare cu clorura de fosfor (V) se transformă în cloranhidridă.

Cefuroxima are proprietăți bactericide și este rezistentă la acțiunea *β-lactamazelor*. Are o activitate înaltă în raport cu bacteriile G(-): *Hemophilial bacilli*, *intestinal bacilli*, *Salmonella, Shigella, Enterobacteria* și *Gonococci*. La fel este activă față de bacteriile G(+), precum *Staphylococci* și *Streptococci*. Cefuroxima este inactivă față de multe tipuri de *Pseudomonas*, majoritatea *Enterococcilor*, multe tulpini de *Enterobacter cloacae*.

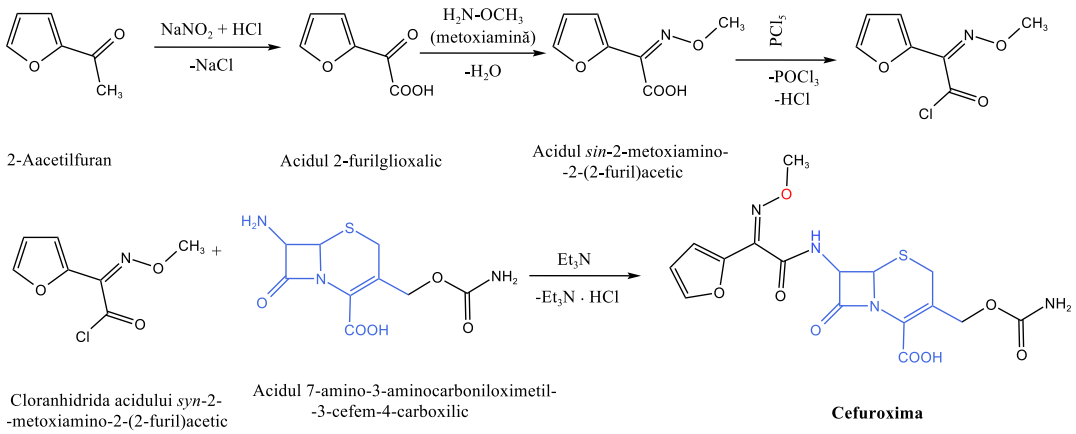


Figura 4.11. Sinteza cefuroximei din acidul 7-amino-3-aminocarboniloximetil-3-cefem-4-carboxilic (acilare chimică)

Cefuroxima este utilizată în tratarea infecțiilor abdominale și ginecologice, sepsisului, meningitelor, endocarditelor, infecțiilor sistemului urinar și respirator, infecțiilor osoase, articulațiilor, pielii și țesuturilor moi.

Analogi comerciali: ceftin, zinacef, curoxim, kefox etc.

Cefamadolul, CF din generația a 2[a], este obținut din acidul 7-ACA. Grupa amino din 7-ACA se protejează prin formilare în prezența anhidridei acetice. Intermediarul formilat prin interacțiune cu 1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-tiolul formează un produs de substituție în poziția C_3. După eliberarea grupei amino se efectuează reacția cu 5-fenil-1,3-dioxolan-2,4-dionă (anhidrida obținută din acidul mandelic (2-fenil-2-hidroxiacetic) și fosgen ($COCl_2$)) (Fig. 4.12).

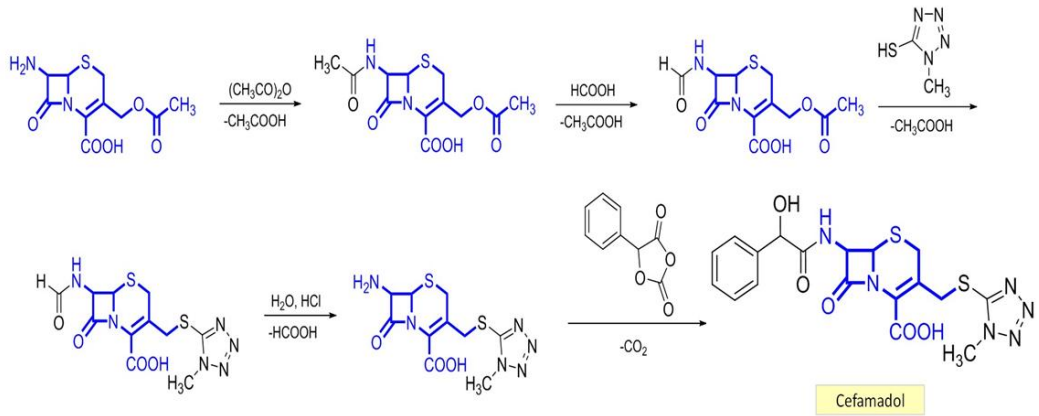


Figura 4.12. Sinteza cefamadolului din 7-ACA (acilare chimică)

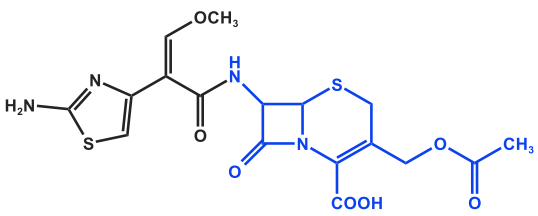
Cefamadolul are aceleași proprietăți ca și cefuroxima.

Analogi comerciali: mandoxef, kefadol, kefandol etc.

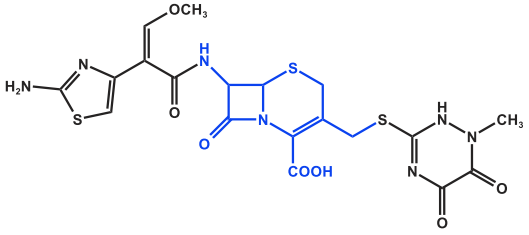
Obținerea și spectrul de acțiune a unor CF din generația a 3[a]

Principalii reprezentanți ai generației a 3[a] de cefalosporine sunt cefotaxima, ceftazidima și ceftriaxona (Fig. 4.13). Aceste cefalosporine sunt rezistente la acțiunea *β-lactamazelor* și au un spectru mai larg față de bacteriile G(+).

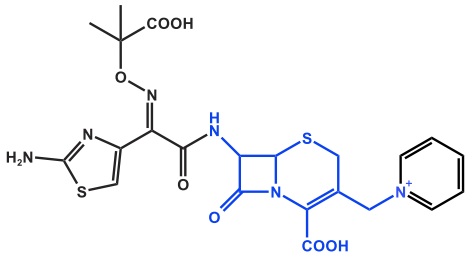
Reprezentanții acestei grupe sunt mai activi față de *E. coli* și unele tulpini *Proteus enterobacter*, dar au acțiune moderată față de *staphylococci*. Sunt utilizate în tratarea meningitelor și gonoreei cauzate de bacteriile G(-) rezistente.



Cefotaxima



Ceftriaxona



Ceftazidima

Figura 4.13. Formulele de structură a unor CF din generația a 3[a]

Cefotaxima, CF din generația a 3[a], este sintetizată prin acilarea 7-ACA cu acidul 2-(2-amino-4-tiazolil)-2-metoxiiminoacetic, în care gruparea amino este protejată cu o grupare tritil. După îndepărtarea protecției tritil din produsul rezultat, cu acid formic diluat, se formează cefotaxima (Fig. 4.14).

Esterul etilic al acidului 2-(2-amino-4-tiazolil)-2-metoxiiminoacetic, necesar pentru această sinteză, este sintetizat din acetilacetatul de etil. La nitrozarea acetilacetatului de etil cu nitrit de sodiu în prezența acidului clorhidric se formează esterul izonitroacetoacetic. Ulterior are loc metilarea grupării hidroxil, a produsului obținut, cu sulfatul de dimetil în prezența carbonatului de potasiu, rezultând 2-(metoxiimino)acetoacetat de etil. În etapa următoare are loc bromurarea produsului rezultat, în prezența clorurii de metilen și a acidului *p*-toluensulfonic, rezultând esterul 4-bromo-2-metoxiiminoacetoacetic. Produsul rezultat interacționeză cu tioureea și se obține esterul etilic al acidului 2-(2-amino-4-tiazolil)-2-metoxiiminoacetic. Reacționând cu trifenilclormetanul în prezența trietilaminei (care leagă HCl rezultat în reacție) rezultă o protecție tritil a grupării amino, formând esterul etilic al acidului 2-(2-tritilamino-4-tiazolil)-2-metoxiiminoacetic, care este hidrolizat la acid cu hidroxid de sodiu. Acidul 2-(2-amino-4-tiazolil)-2-metoxiiminoacetic rezultat este utilizat pentru acilarea 7-ACA în prezența DDC, formându-se cefotaxima tritilată. Prin îndepărtarea protecției tritil, cu ajutorul acidului formic diluat, din produsul sintetizat se formează cefotaxima.

Cefotaxima are un spectru larg de acțiune antibacterială. Are o activitate înaltă față de bacteriile G(-) (*E. coli, Citrobacter, Proteus mirabilis*), inclusiv față de unele tulpini de *Pseudomonas, H. influenzae* rezistente la acțiunea altor antibiotice.

Cefotaxima este mai puțin activă față de *Streptococci, Pneumococci, Meningococci* și *Gonococci*. Este rezistentă la majoritatea *β-lactamazelor* produse de bacteriile G(+) și G(-).

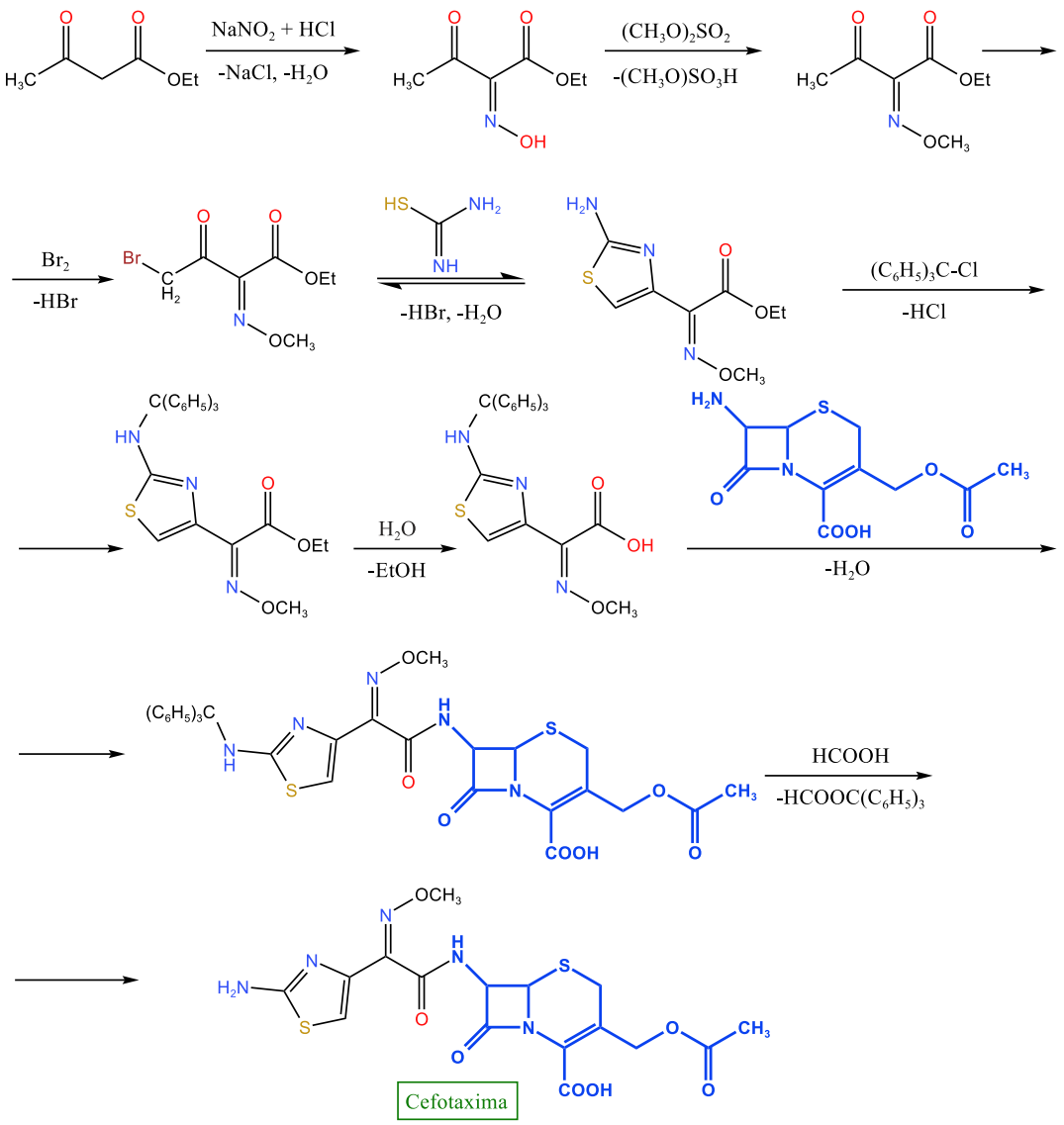


Figura 4.14. Sinteza cefotaximei din 7-ACA (acilare chimică)

Cefotaxima este utilizată în tratarea infecțiilor abdominale, sepsisului, infecțiilor căilor respiratorii inferioare, tractului urinar, infecțiilor osoase, articulațiilor, pielii, țesuturilor moi etc.

Analogi comerciali: claforan, zarivis etc.

Obținerea și spectrul de acțiune a unor CF din generația a 4[a]

Generația a 4[a] de cefalosporine are un spectru larg de acțiune. Aceste cefalosporine sunt active față de bacteriile G(+) și G(-), aerobe și anaerobe. Spre deosebire de generația a 3[a], acestea sunt mai active față de *P. aeruginosa* și

S. aures, inclusiv față de unele tulpini rezistente la meticilină. Principalii reprezentanți ai generației a 4[a] sunt cefpiroma și cefepima (Fig. 4.15).

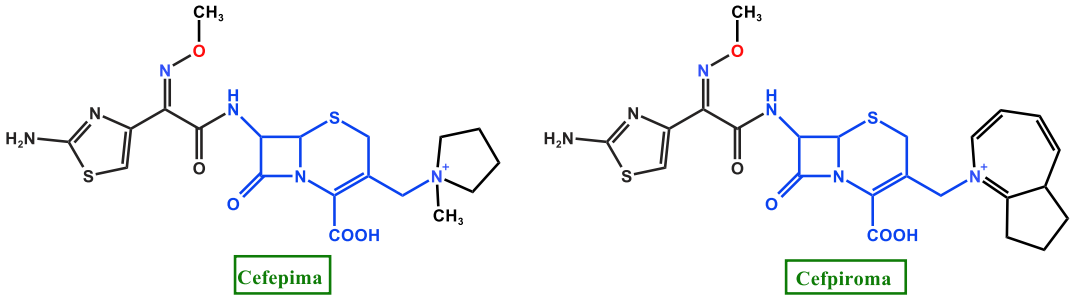


Figura 4.15. Formulele de structură a unor CF din generația a 4[a]

Cefpiroma, CF din generația a 4[a], este sintetizată în două etape. Ecuațiile reacțiilor de sinteză sunt prezentate în figura 4.16.

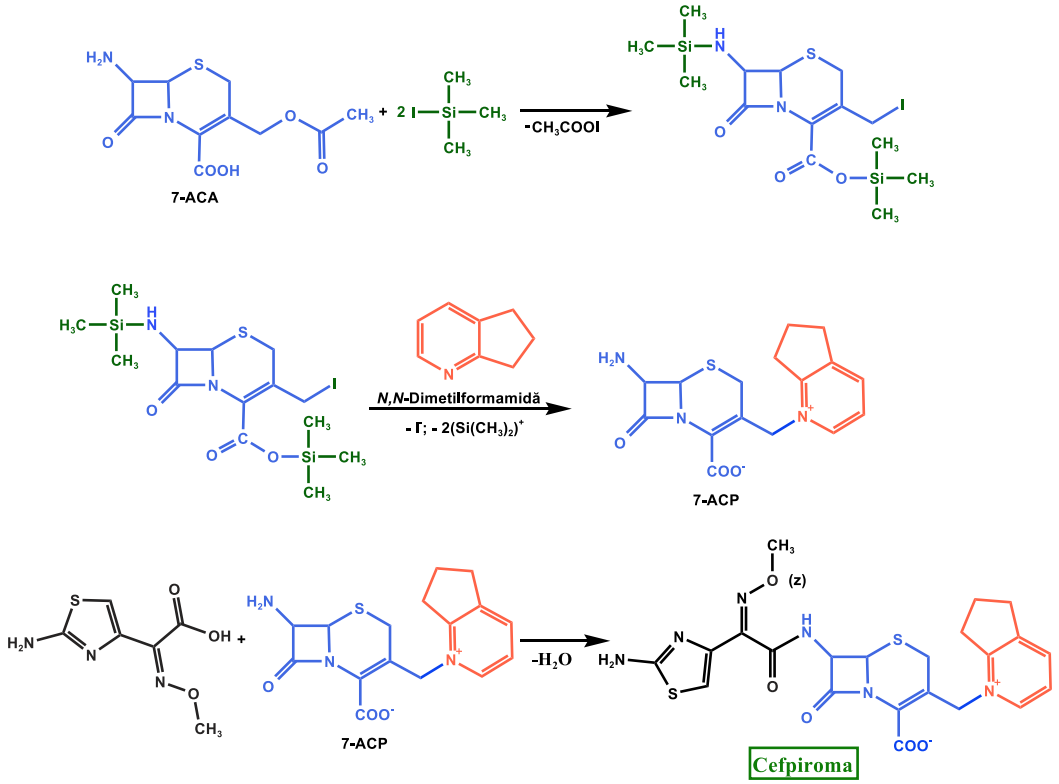


Figura 4.16. Sinteza cefpiromei din 7-ACA (acilare chimică)

În prima etapă 7-ACA interacționează cu 2-(ciclopent-1-en-1-il)piridina și formează 7-ACP (acidul 3-(etil-ciclopentenilpiridin)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabiciclo-2-en-2-carboxilic). Inițial are loc protejarea grupelor 7-amino și 2-carboxil. În acest scop poate fi folosită iodura de trimetilsilil. Ulterior, în reacție se adaugă 2-(ciclopent-1-en-1-il)piridina, în *N,N*-dimetilformamidă (în calitate de

solvent). În etapa a doua 7-ACP interacționează cu acidul 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetic cu formarea cefpiromei.

Cefpiroma are un spectru larg de acțiune similar cefotaximei, însă este mai activă față de *staphylococci, enterococci* și unele enterobacterii.

Analogi comerciali: cefrom, cedixen.

Reprezentanți și spectrul de acțiune a unor CF din generația a 5[a]

Principalii reprezentanți ai generației a 5[a] de cefalosporine sunt ceftarolina și ceftobiprolul (Fig. 4.17). Acestea au efecte mai pronunțate asupra bacteriilor G(+) decât cele patru generații anterioare, în special asupra *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pneumoniae*. Efectul asupra bacteriilor G(-) este similar cu al cefalosporinelor din a 4[a] generație.

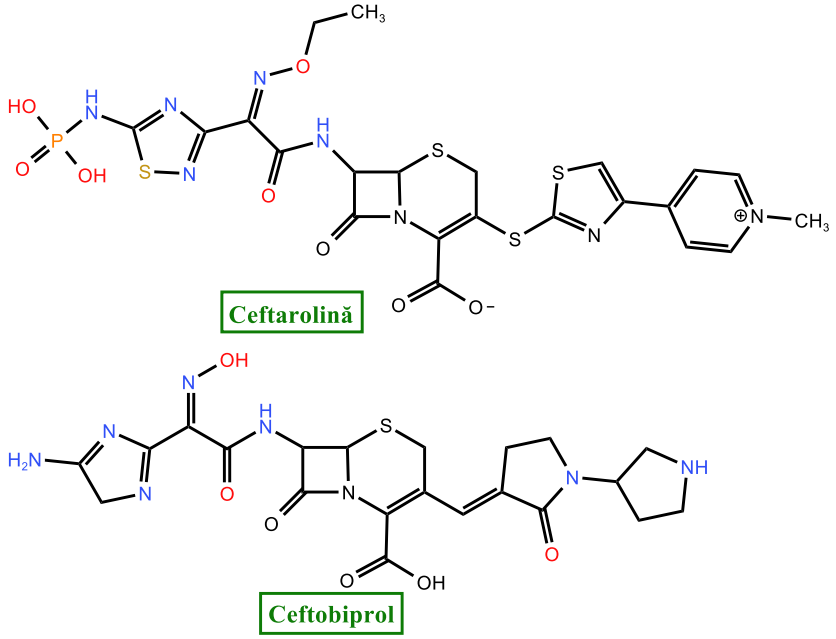


Figura 4.17. Formulele de structură a unor CF din generația a 5[a]

Ceftarolina, CF din generația a 5[a], este un nou antibiotic cu spectru larg, utilizat pentru tratamentul *S. pneumoniae* rezistent la penicilină și cefalosporină, *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină și *S. aureus* rezistent la vancomicină. De asemenea, prezintă activitate împotriva mai multor bacterii G(-), dar este inactivă față de bacteriile producătoare de *β-lactamaze*. Ceftarolina este folosită pentru tratarea pneumoniei. Acest medicament prezintă activitate prin formarea unei asocieri cu proteinele care leagă penicilina. De asemenea, posedă afinitate înaltă față de *S. aureus* rezistente la meticilină. În sânge, ceftarolina fosamil (promedicament) este rapid transformată în ceftarolină (o formă activă) cu ajutorul enzimelor fosfataza.

Ceftobiprolul, CF din generația a 5[a], vândut printre altele sub numele de marcă *Zevtera*, este un antibacterian utilizat pentru tratamentul pneumoniei contractate fie în spital, fie în comunitate. Similar altor cefalosporine, ceftobiprolul își exercită activitatea antibacteriană prin legarea de proteine și inhibarea activității transpeptidazei acestora, esențială pentru sinteza pereților celulelor bacteriene. Ceftobiprolul are afinitate mare asupra tulpinilor de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină, față de *Streptococcus pneumoniae* (rezistent la penicilină) și *Enterococcus faecalis*.

Ceftobiprolul este, de asemenea, activ împotriva agenților patogeni G(-), inclusiv *Citrobacter spp., E. coli, Enterobacter spp., Klebsiella spp., S. marcescens* și *P. aeruginosa*. Enterobacteriile sunt susceptibile la ceftobiprol. Ceftobiprolul inhibă, de asemenea, *H. influenzae* și *M. catarrhalis*, inclusiv cele producătoare de *β-lactamaze*. Inhibă activitatea *P. mirabilis, Providencia spp., M. morganii, Vibrionaceae spp*. și *N. gonorrhoeae*.

De asemenea, este activ împotriva bacteriilor G(+) anaerobe, inclusiv *Propionibacterium acnes, Peptostreptococcus anaerobius, Clostridium inocuum, Finegoldia magna* etc.

Ca și majoritatea cefalosporinelor, ceftobiprolul este inactiv față de speciile din grupul *Bacteroides fragilis, Prevotella bivia* sau tulpinile de *Prevotella melaninogenica.*

Analogi comerciali: zeftera, stelara.

Mecanisme de rezistență la cefalosporine

Cefalosporinele sunt adesea grupul preferat de antibiotice datorită spectrului lor larg antibacterian și efectelor secundare minore în raport cu alte antibiotice. Sunt medicamente extrem de eficiente și indispensabile utilizate împotriva numeroaselor boli infecțioase la oameni și animale. Cu toate acestea, utilizarea excesivă și utilizarea incorectă a cefalosporinelor pentru profilaxie, tratament sau producția de alimente au contribuit în mod semnificativ la apariția multor agenți patogeni rezistenți la medicamente.

Există trei mecanisme primare care provoacă rezistență la antibiotice împotriva cefalosporinelor:

1) Bacteriile produc enzime care inactivează antibioticul (de ex., *β-lactamazele*). Acesta este cel mai comun și esențial mecanism de rezistență a bacteriilor G(-). *β-Lactamazele* sunt enzime bacteriene care pot scinda inelul *β*-lactamic prin hidroliză.
2) Rezistența apare și din modificările PBP, proteina țintă a cefalosporinelor. Bacteriile își modifică PBP-urile fie prin generarea de variante mutante cu

afinitate semnificativ mai scăzută pentru agenții *β-lactamici,* fie prin dezvoltarea unui nou PBP care nu se leagă de structura *β-lactamică*.

3) Pentru bacteriile G(-) rezistența poate apărea din cauza permeabilității scăzute a membranei antibioticelor. Modificările structurale sau cantitative ale porinei, proteină abacteriană a membranei exterioare care transportă molecule hidrofile, pot inhiba pătrunderea cefalosporinelor. Aceste modificări ale porinei rezultă în principal din mutații punctuale sau din expresia genică. În plus, pompa de eflux contribuie la rezistența la antibiotice prin inhibarea difuziei medicamentului. Sistemul de eflux alimentat de energie elimină antibioticele din spațiul periplasmatic al bacteriilor G(-).

Antibioticele semisintetice *β-lactamice,* inclusiv cefalosporinele, sunt medicamente comercializate intens la nivel modial. Aceasta este o clasă de antibiotice preferată de clinicieni datorită spectrului lor larg de acțiune, activității antimicrobiene înalte, toxicității scăzute și stabilității față de hidroliză.

În programele farmacologice ale diferitelor companii continuă dezvoltarea și obținerea unor noi cefalosporine semisintetice. Actualmente continuă eficientizarea proceselor tehnologice de obținere a CF semisintetice și un mare accent se pune pe biologia moleculară, cu scopul ameliorării genetice a tulpinilor de microorganisme folosite în biosinteza CFC, hidroliza enzimatică a acesteia la 7-ACA și acilarea enzimatică a 7-ACA. Utilizarea metodelor biotehnologice nepoluante față de mediul ambiant în obținerea CF semisintetice a început în Europa și continuă să se extindă în toată lumea.

Întreări pentru autoevaluare

1. Clasificați cefalosporinele în funcție de generații și analizați diferențele structurale și funcționale dintre acestea.
2. Explicați mecanismul de acțiune a cefalosporinelor asupra bacteriilor și identificați particularitățile față de alte antibiotice *β*-lactamice.
3. Analizați mecanismele de rezistență a bacteriilor față de cefalosporine și corelați-le cu utilizarea excesivă sau incorectă a acestor antibiotice.
4. Propuneți schema de reacții în biosinteza cefalosporinelor naturale, comentând asupra enzimelor implicate și a condițiilor de biosinteză.
5. Prezentați o compoziție optimizată a mediului nutritiv și identificați materiile prime adecvate pentru obținerea cefalosporinelor de semisinteză.
6. Propuneți un flux tehnologic general în producerea cefalosporinelor semisintetice.
7. Descrieți și analizați etapele tehnologice implicate în producerea cefalosporinelor prin tehnologie integrată. Comparați cu metodele clasice.

8. Identificați metode moderne de izolare și purificare a CFC. Analizați eficiența acestora în raport cu cerințele de calitate.
9. Propuneți metode eficiente de izolare și purificare a cefalosporinelor semisintetice, ținând cont de standardele farmaceutice internaționale.
10. Analizați factorii critici ce influențează randamentul și puritatea cefalosporinelor și propuneți strategii de optimizare a procesului.

BIBLIOGRAFIE

1. LIN, X., KÜCK, U. Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106(24), pp. 8007-8020. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12272-8.
2. LIN, X., LAMBERTZ, J., DAHLMANN, T.A., NOWACZYK, M.M., KÖNIG, B., KÜCK, U. A straightforward approach to synthesize 7-aminocephalosporanic acid in vivo in the cephalosporin c producer acremonium chrysogenum. In: *J. fungi*, 2022, 8(5). https://doi.org/10.3390/jof8050450.
3. SINCLAIR, M. Cephalosporin biosynthesis. In: *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**, 814. https://doi.org/10.1038/78385.
4. LIN, X., KÜCK, U. Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, **106**, pp. 8007–8020. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12272-8.
5. CRUZ, A.J.G., PAN, T., GIORDANO, R.C., ARAUJO, M.L.G. C., HOKKA, C.O. Cephalosporin C production by immobilized *Cephalosporium acremonium* cells in a repeated batch tower bioreactor. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 85(1), pp. 96–102. https://doi.org/10.1002/bit.10877.
6. TAN, Q., QIU, J., LUO, X., ZHANG, Y., LIU, Y., CHEN, Y., LIAO, W. Progress in One-pot Bioconversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 19(1), pp. 30–42. https://doi.org/10.2174/1389201019666180509093956.
7. MILLER, L.M., HERMAN, R., GYULEV, I., KRAUSS, T.F., THOMAS, G.H., DUHME-KLAIR, A.K. Synthesis and biochemical evaluation of cephalosporin analogues equipped with chemical tethers. In: *RSC Advances*, 2020, 10(60), pp. 36485–36494. https://doi.org/10.1039/d0ra04893c.
8. SCHMITT, E.K., HOFF, B., KÜCK, U. Regulation of *Cephalosporin* Biosynthesis. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004, 88, pp. 1–43. https://doi.org/10.1007/b99256.
9. HU, Y., ZHU, B. Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer. In: *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2016, 1(3), pp. 43–149. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.09.
10. TAN, Q., QIU, J., LUO, X., ZHANG, Y., LIU, Y., CHEN, Y., LIAO, W. Progress in One-pot Bioconversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 19(1), pp. 30–42. https://doi.org/10.2174/1389201019666180509093956.
11. LIU, L., CHEN, Z., LIU, W., KE, X., TIAN, X., CHU, J. Cephalosporin C biosynthesis and fermentation in *Acremonium chrysogenum*. In: *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 2022 106, pp. 6413-6426. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12181-w.
12. ZAFIRA, I. Z., NANDONG, J. Optimal feeding strategy of Cephalosporin C fermentation. In: IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, 2019, 495, 012107. https://doi.org/10.1088/1757-899x/495/1/012107.
13. RHEE, D.K., LEE, S.B., RHEE, J.S., RYU, D.D. Y., HOSPODKA, J. Enzymatic biosynthesis of cephalexin. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 1980, 22(6), pp. 1237–1247. https://doi.org/10.1002/bit.260220610.
14. FAN, Y., LI, Y., LIU, Q. Efficient Enzymatic Synthesis of Cephalexin in Suspension Aqueous Solution System. In: *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021, 68(1), pp. 136-147. https://doi.org/10.1002/bab.1903.
15. BAHAMONDES, C., WILSON, L., AGUIRRE, C., ILLANES, A. Comparative study of the enzymatic synthesis of cephalexin at high substrate concentration in aqueous and organic media using statistical model. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(4), pp. 711–721. https://doi.org/10.1007/s12257-011-0674-6.
16. VIDAILLAC, C., RYBAK, M.J. Ceftobiprole: First Cephalosporin with Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Pharmacotherapy*, 2009, 29(5), pp. 511–525. https://doi.org/1010.1592/phco.29.5.511.
17. HUGHES, D.L. Patent Review of Manufacturing Routes to Fifth-Generation Cephalosporin Drugs. Part 2, Ceftaroline Fosamil and Ceftobiprole Medocaril. In: *Organic Process Research & Development*, 2017, 21(6), pp. 800–815. https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00143.
18. VARDANYAN, R.S., HRUBY, V.J. Antibiotics. In: *Synthesis of Essential Drugs*, 2006, pp. 425–498. https://doi.org/10.1016/b978-044452166-8/50032-7.
19. DUAN, X., LU, Y., HAN, J., CHEN, L., ZHENG, P. One-Pot Synthesis of Cefpirome Sulfate from GCLE. In: *Synthetic Communications*, 2011, 41(5), pp. 629–636. https://doi.org/10.1080/00397911003629499.
20. STAN, C., DRĂGAN, M., DIACONU, E., ȘTEFĂNACHE, A. Possibilities to acylate 7-aminocephalosporanic acid to obtain some cephalosporins. In: *Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași,* 2014, 118(1), pp. 244-249. ISSN: 0300-8738.
21. BACINSCHI, N., GUŢU, I. Strategii de obţinere a antibioticelor noi. In: *Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină*, 2018, nr. 4(78), pp. 68-78. ISSN 1729-8687.
22. GAURAV, K., KUNDU, K., KUNDU, S. Microbial Production of 7-Aminocepahlosporanic Acid and New Generation Cephalosporins (Cephalothin) by Different Processing Strategies. In: *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2007, 35(4), pp. 345–358. https://doi.org/10.1080/10731190701460218.
23. YE, L., ZHANG, J., XIAO, W., LIU, S. Efficacy and mechanism of actions of natural antimicrobial drugs. In: *Pharmacology & Therapeutics*, 2020, 107671. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.10767.
24. GUPTA, A., PANDEY, A.K. Antibacterial lead compounds and their targets for drug development. In: *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, 2020, pp. 275–292. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817890-4.00018-4.

5. BIOTEHNOLOGIA AMINOACID- ȘI PEPTIDO-ANTIBIOTICELOR

5.1. Aminoacid- și peptido-antibiotice: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică
5.2. Biosinteza aminoacid-antibioticelor pe exemplul *D*-cicloserinei. Procesul biotehnologic de producere a *D*-cicloserinei
5.3. Caracteristicile generale și structurale ale peptido-antibioticelor
5.4. Biosinteza și biotehnologia gramicidinelor, polimixinelor și bacitracinelor: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Abilități

Studentul:

- clasifică aminoacid- și peptido-antibioticele;
- explică mecanismul de acțiune și mecanismele de rezistență la aminoacid- și peptido-antibiotice;
- elaborează diagramele fluxului de fabricație a *D*-cicloserinei, polimixinei B, bacitracinei A și a gramicidinei S;
- argumentează toxicitatea aminoacid- și peptido-antibioticelor;
- elaborează schema generală de biosinteză a unor aminoacid- și peptido-antibiotice;
- descrie etapele și parametrii tehnici ai proceselor biotehnologice de producere a *D*-cicloserinei, polimixinei B, bacitracinei A și gramicidinei S;
- aplică metode fizice, chimice și fizico-chimice pentru izolarea și purificarea aminoacid- și peptido-antibioticelor.

5.1. Aminoacid- și peptido-antibiotice: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică

Clasificarea aminoacid- și peptido-antibioticelor

Aminoacid și peptido-antibioticele sunt un grup divers de agenți antimicrobieni, care pot fi clasificate în funcție de structură, mecanismul de acțiune sau aminoacizii specifici pe care îi conțin.

1. Aminoacid-antibioticele

Aceste antibiotice sunt derivate din aminoacizi specifici sau conțin fragmente din aminoacizi.

Exemple: *cicloserina* – este un derivat al serinei care inhibă formarea peretelui celular prin blocarea alanin racemazei și a *D*-alanin ligazei; *azaserina* –

un compus diazoic, derivat al serinei, cu proprietăți antibiotice și antineoplazice, care inhibă glutamin-amidotransferazele, enzime esențiale în biosinteza purinelor și în metabolismul glutaminei.

2. Peptido-antibioticele

Peptido-antibioticele sunt compuse din secvențe de aminoacizi care formează peptide liniare sau ciclice.

a) *Peptido-antibioticele liniare au o secvență liniară de aminoacizi*.

Exemple: *gramicidina* – formează canale ionice în membranele bacteriene, perturbând echilibrul ionic și induc moartea celulelor; *polimixina B* – se atașează de componenta lipidică a lipopolizaharidelor din membrana exterioară a bacteriilor G(-), crescând permeabilitatea membranei și rezultând moartea celulelor.

b) *Peptido-antibioticele ciclice au o structură ciclică formată dintr-un schelet peptidic.*

Exemple: *vancomicina* – blochează sinteza peretelui celular prin legarea la terminația *D*-alanil-*D*-alanină a precursorilor peretelui celular; *daptomicina* – afectează potențialul membranei bacteriene prin inserția în membrana celulară în prezența calciului, provocând depolarizare rapidă și distrugerea celulei.

c) *Glicopeptido-antibioticele sunt antibiotice peptidice care conțin fragmente de hidrați de carbon*.

Exemple: *teicoplanina* – la fel ca vancomicina, blochează sinteza peretelui celular prin legarea la precursorii peptidoglicanilor.

d) *Antibiotice lipopeptidice, aceste peptide au un fragment lipidic care favorizează interacțiunea acestora cu membranele bacteriene*.

Exemple: *daptomicina* – o lipopeptidă ciclică care perturbă membranele celulare bacteriene.

3. Peptide antimicrobiene bogate în prolină (PAMPro)

Aceste peptide sunt caracterizate printr-o abundență de reziduuri de prolină și au adesea mecanisme de acțiune unice.

Exemple: *Bac7* – inhibă sinteza proteinelor bacteriene prin legarea la ribozom; *oncocina* – de asemenea vizează ribozomii bacterieni, împiedicând translația AND-ului.

4. Peptide amfipatice

Aceste peptide conțin atât regiuni hidrofile, cât și hidrofobe, ceea ce le permite să interacționeze cu membranele microbiene și să le perturbe funcția biologică.

Exemple: *magainină* – se găsește în pielea broaștelor și perturbă membranele bacteriene; *cecropine* – se găsesc în insecte și, de asemenea, perturbă membranele bacteriene.

5. Peptido-antibiotice non-ribozomale

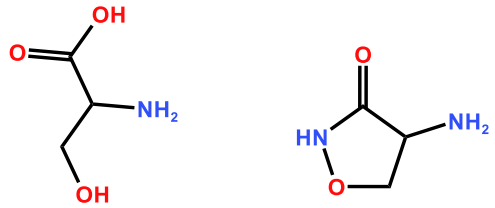
Acestea sunt sintetizate de sintetaze peptidice non-ribozomale (SPNR) și conțin adesea fragmente de aminoacizi.

Exemple: *surfactina* – o lipopeptidă ciclică cu proprietăți tensioactive puternice, produsă de specii de *Bacillus*; *tirocidina* – o decapeptidă ciclică produsă de *Bacillus brevis*, care formează pori în membranele bacteriene.

Aceste antibiotice utilizează diferite mecanisme pentru a viza și distruge bacteriile, făcându-le medicamente esențiale în combaterea infecțiilor.

5.2. Biosinteza aminoacid-antibioticelor pe exemplul *D*-cicloserinei. Procesul biotehnologic de producere a *D*-cicloserinei

***D*-cicloserina**, cunoscută și sub numele de *D*-4-amino-3-izoxazolidinona, este un antibiotic ciclic utilizat în principal în tratamentul tuberculozei, care derivă din aminoacidul *D*-Serina (Fig. 5.1). Acesta este produs de *Streptomyces orchidaceus,* însă poate fi obținut și prin sinteză chimică. Biosinteza *D*-cicloserinei implică mai multe etape enzimatice pornind de la precursorii metabolici de bază.



D-serina **D-cicloserina**

Figura 5.1. Formulele de structură a aminoacizilor *D*-serina și *D*-cicloserina

Este utilizată în tratarea turberculozei, fiind comercializată sub denumirea de Seromycin. Fiind similară *D*-alaninei, *D*-cicloserina blochează în *Mycobacterium tuberculosis* enzima *alanin-racemaza* care catalizează conversia *L*-alaninei în *D*-alanină, component vital în formarea peptidoglicanului (Fig. A.5.1). În același timp, *D*-cicloserina blochează și enzima care catalizează formarea legăturii peptidice în *D-Ala-D-Ala*, în cazul când acești aminoacizi sunt prezenți. *D*-cicloserina se administrează în combinație cu rifampicina, un alt antibiotic.

D-Cicloserina este produsă de anumite tulpini ale bacteriilor *Streptomyces* (de exemplu, *Streptomyces orchidaceus* și *Streptomyces garyphalus*). Calea de biosinteză implică conversia *L*-serinei în *D*-cicloserină printr-o serie de reacții enzimatice (Fig. A.5.2).

După cum este prezentat în figura A.5.2, *D*-cicloserina se obține din *L*-serină în patru etape. În prima etapă are loc conversia *L*-serinei în O-acetil-*L*-serină.

Această reacție este catalizată de enzima *Serin acetiltransferaza*. În etapa a doua O-acetil-*L*-serina este transformată în O-acetilhidroxilamină. Această etapă implică enzima serin transacetilaza. În etapa a treia are loc ciclizarea spontană a O-acetilhidroxilaminei, formându-se *L*-cicloserina. În etapa finală *L*-cicloserina sub acțiunea *D*-serin deaminazei este transformată în *D*-cicloserină.

Această cale de biosinteză evidențiază complexitatea și specificitatea reacțiilor catalizate de enzime în producerea *D*-cicloserinei, un antibiotic valoros, folosit în tratamentul tuberculozei.

Procesul biotehnologic de producere a D-cicloserinei

Se pregătește mediul nutritiv pentru inocularea microorganismelor *Streptomyces orchidaceus*. Mediul conține în mod obișnuit surse de carbon, surse de azot, săruri și alți nutrienți necesari pentru creșterea bacteriilor și producerea metaboliților secundari (*D*-cicloserina) (Tab. A.5.1).

Mediul nutritiv pentru inoculare are compoziția prezentată în tabelul A.5.1, se pregătește din materiale de puritate înaltă, sterilizate în prealabil și se inoculează în bioreactorul de inoculare (**1**) (Fig. A.5.3), la temperatura de 30ºC, timp de 24 de ore. Mediul nutritiv pentru procesul de fermentare se pregătește în fermentatorul (**2**), cu compoziția prezentată în tabelul A.5.1. Conținutul acestuia se sterilizează cu abur timp de 15 minute la 121ºC. Ulterior se adaugă 0,48% uree sterilă și împreună cu cultura de *Streptomyces orchidaceus* (din Inoculator) se inoculează în fermentatorul (**2**). Procesul de fermentare are loc la temperatura de 30ºC, pH 6,5 – 7,5, timp de 86 de ore. Deoarece bacteriile sunt aerobe, în timpul procesului de fermentare mediul este aerat cu 22 m^3 de aer steril per minut și agitat continuu pentru a dispersa aerul adăugat în tot volumul mediului de fermentare. După 86 de ore mediul conține aproximativ 2,6 g/L de cicloserină.

La finalul procesului de fermentare, soluția nativă se pompează cu ajutorul pompei (**3**) și se separă de biomasă prin filtrul cu *tambur rotativ* (**4**). Soluția nativă filtrată se colectează în rezervorul (**5**). Ulterior se pompează în rezervorul (**6**), unde se adaugă 1% cărbune activ (CA), pentru înlăturarea impurităților colorante. Soluția decolorată se filtrează prin filtrul (**7**) și se colectează în rezervorul (**8**). Pentru precipitarea *D*-cicloserinei, soluția decolorată se pompează în rezervorul (**11**), echipat cu agitator cu palete. Se ajustează pH-ul amestecului la valoarea 3,0, cu acid azotic, dozat din vasul (**9**), iar apoi se adaugă $AgNO_3$ din dozatorul (**10**). Amestecul obținut este agitat bine timp de 30 de minute. Acest amestec este ulterior trecut prin filtrul (**12**) şi filtratul este colectat în vasul de precipitare (**14**), unde pentru precipitarea sării de argint a cicloserinei se ajustează pH-ul la valoarea 6,8, cu ajutorul soluției de NaOH, din dozatorul (**13**). Cicloserina, sub formă de

sare de argint precipitată, este apoi uscată în uscătorul (**15**). Cristalele obținute se colectează în rezervorul (**16**), se adaugă apă deionizată, din dozatorul (**18**) rezultând o suspensie. La această suspensie se adăugă HCl, din dozatorul (**17**) pentru a precipita AgCl; astfel, *D*-cicloserina trece în soluţia apoasă, în formă solubilă. Pentru îndepărtarea AgCl, suspensia este filtrată (**19**). Precipitatul (AgCl) este colectat în vasul (**20**), iar soluția ce conține *D*-cicloserină este colectată în rezervorul (**21**). Pentru a îndepărta resturile de argint, prin soluția filtrată se barbotează H_2S, din dozatorul (**22**). Precipitatul de Ag_2S separat prin filtrul (**23**) este colectat în vasul (**24**). Soluția de *D*-cicloserină se colectează în rezervorul (**26**) și se precipită cu alcool izopropilic rece, din dozatorul (**25**). Cristalele de *D*-cicloserină sunt uscate în uscătorul (**28**), la temperatura de 40ºC. Cristalele uscate și purificate sunt stocate pentru utilizarea ulterioară.

5.3. Caracteristicile generale și structurale ale peptido-antibioticelor

Peptido-antibioticele sunt formate din 10-50 aminoacizi. Predomină aminoacizii hidrofobi și cei cu proprietăți bazice (Lys, Arg, His). Aceste particularități structurale determină o afinitate înaltă față de membranele citoplasmatice.

Peptido-antibioticele pot fi clasificate după mecanismul de biosinteză: obținute cu participarea ribozomilor și cele obținute fără participarea ribozomilor (Tab. A.5.2).

Biosinteza peptido-antibioticelor cu participarea ribozomilor începe cu formarea liniară a peptidelor, care ulterior suferă schimbări posttranslaționale: epimerizări (schimbarea configurației atomilor de carbon asimetrici din *L* în *D*) sau formarea legăturilor tioeterice, R-S-R.

Caracteristica generală a peptido-antibioticelor obținute prin biosinteza non-ribozomală:

- conțin aminoacizi *D*;
- aminoacizii pot fi *N*-metilați sau *N*-formilați, pot fi glicozilați, acilați, halogenați, hidroxilați;
- pot conține aminoacizi ciclici, se formează heterocicluri de tip oxazolinic sau tiazolinic.

Gramicidinele reprezintă un amestec din șase pentadecapeptide liniare produse de speciile *Bacillus brevis,* bacterie aerobă G(+). Gramicidinele prezintă o activitate antibacteriană semnificativă față de toate bacteriile G(+). Aceste peptide au primul și ultimul aminoacid *N*-modificat și diferă după tipul aminoacidului din poziția 11 (Trp, Phe sau Tyr) (Fig. A.5.4).

Cea mai frecvent întâlnită este ***gramicidina A*** care conține în poziția 11 aminoacidul Trp (triptofan) (Fig. A.5.4). Primul aminoacid, Val, este *N*-formilat și ultimul aminoacid, (Trp), este amidat, cu etanolamină. Majoritatea aminoacizilor au configurația *D*.

Gramicidinele se folosesc pentru aplicare dermică locală, tratarea plăgilor, arsurilor, tratarea infecțiilor orale și nazale.

Structura gramicidinelor formată din aminoacizi alifatici și aromatici este hidrofobă și neutră. Chiralitatea particulară a acestor peptide îl face pe primul aminoacid mai puțin susceptibil la degradarea proteolitică, ceea ce constituie un avantaj în terapiile convenționale cu peptide. Datorită stereochimiei, toate lanțurile laterale hidrofobe ale primului aminoacid sunt poziționate pe o parte a helixului în interiorul hidrofob al membranei cu dublu strat lipidic.

Gramicidina *D* reprezintă un amestec de gramicidină A, B și C (Fig. A.5.5), în proporție de 80, 6 și 14% corespunzător, fiecare formată din 15 aminoacizi. Toate trei pentadecapeptide sunt produse de biosinteză ale *Bacillus brevis*.

Moleculele de gramicidină A, B și C formează în spațiu un dublu helix sau helix. Moleculele de dublu helix pot fi formate de aceeași moleculă de gramicidină (A-A) sau de molecule diferite (A-B).

Dublu helix-ul poate fi antiparalel (două peptide antiparalele), paralel sau un helix-dimer, două molecule helicoidale conectate (Fig. A.5.6). Aceste arhitecturi moleculare sunt stabilizate prin legături de hidrogen.

Molecula de tip helix-dimer poate penetra biomembranele (membrana celulelor și organitelor celulare) și astfel funcționează ca un canal ionic (ionofor), canale prin care pot trece, conform difuziei, ionii de K^+, Na^+ și molecule organice de dimensiuni mici.

Trecerea necontrolată a ionilor perturbează permeabilitatea biomembranelor și dereglează mecanismele celulare, inducând astfel apoptoza celulară. Gramicidinele au o afinitate înaltă față de bacteriile G(+).

După încorporare în biomembrane, gramicidinele pertubează permeabilitatea acestora și astfel:

- favorizează eliminarea extracelulară a ionilor de K^+ și a aminoacizilor;
- perturbă potențialul membranar;
- inhibă procesul de respirație celulară (nu are loc sinteza ATP-ului);
- inhibă sinteza AND-ului, ARN-ului și a proteinelor ce determină apoptoza celulară.

Gramicidina D este activă față de *P. aeruginosa, Streptococcus pneumoniae, Streptpcoccus agalactiae* etc., fiind utilizată local sub formă de cremă, în concentrație netoxică pentru celulele umane. Bacteriile sunt distruse la

concentrații inferioare celor la care sunt sensibile celulele umane. Se administrează în amestec cu alte polipetide-antibiotice, frecvent Polimixina B. În unele formulări se utilizează și cu anestezice locale, precum lidocaina.

5.4. Biosinteza și biotehnologia gramicidinelor, polimixinelor și bacitracinelor: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Biotehnologia gramicidinei S

Gramicidina S este un antibiotic eficient împotriva unor bacterii G(+) și G(-), precum și împotriva unor fungi.

Este un derivat al gramicidinei, produs de bacteria G(+) *Brevibacillus brevis*. Gramicidina S, spre deosebire de celelalte gramicidine, discutate anterior, este o ciclodecapeptidă, construită din două pentapeptide identice unite cap coadă, formal notată ca *ciclo(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-)*$_2$; formula de structură este prezentată în figura 5.2. Adică formează o structură ciclică compusă din cinci aminoacizi diferiți, fiecare folosit de două ori în cadrul structurii. La fel utilizează doi aminoacizi neobișnuiți în compoziția peptidelor: ornitina, precum și stereoizomerul atipic al fenilalaninei. Este sintetizat de gramicidin S sintetaza.

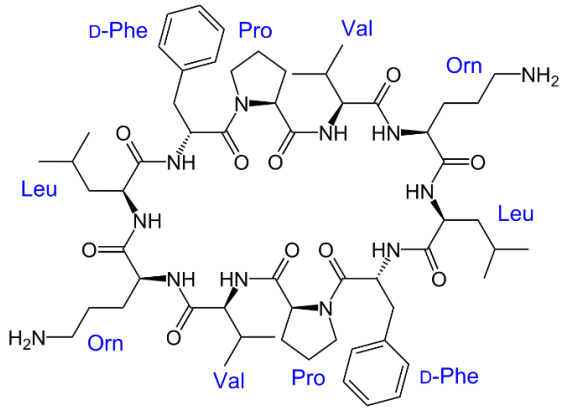


Figura 5.2. Formula de structură a *gramicidinei S*

Gramicidina S este produsă prin metoda fermentării. Metoda constă în cinci etape: tratarea tulpinii productive de *Bacillus brevis*, pregătirea mediului inoculator, cultivarea inoculului în bioreactorul inoculator, asigurarea biosintezei gramicidinei S în fermentator, separarea și purificarea produsului.

Principalii parametri ai procesului de inoculare sunt următorii: bacteriile *Bacillus brevis* se inoculează într-un mediu de agar-agar sterilizat în prealabil. Compoziția mediului pentru procesul de inoculare include citrat de sodiu, clorură de amoniu, dihidrogenofosfat de potasiu, acid *D*- și *L*-lactic într-un raport de 1:1, pulbere de cazeină și agent antispumant Struktol J 647. Parametrii optimi pentru procesul de inoculare sunt un pH cuprins între 5,5 și 7,5 și un mediu steril. Procesul

de inoculare durează aproximativ 48 de ore. După creșterea și înmulțirea bacteriilor, inoculul este transferat în fermentator, unde are loc procesul de fermentare și producerea gramicidinei S.

Ca surse de nutrienți se adaugă glicerol, soluții de sulfat de amoniu și amidon din porumb. Procesul de fermentare durează între 48 și 120 de ore. Deoarece microorganismele sunt aerobe, în timpul procesului de fermentare are loc aerarea cu aer steril și agitarea la 220 rpm.

După terminarea procesului de fermentare, biomasa rezultată este separată prin ultrafiltrare. Deoarece gramicidina S este un metabolit extracelular, aceasta se regăsește în faza lichidă a mediului de cultură, iar produsul poate fi izolat fără necesitatea unei etape de extracție din biomasă. Mediul de cultură este supus unei filtrări succesive pentru îndepărtarea impurităților și concentrarea produsului activ.

Purificarea gramicidinei S se realizează prin extracție cu etanol, ajustând pH-ul la 3,0-4,0 cu acid clorhidric diluat (HCl:etanol 1:1). Extracția se efectuează în mod repetat, îndepărtând extractele prin purjare cu azot. După separarea etanolului, soluția rezultată este uscată sub vid la aproximativ 47ºC. În continuare, produsul este supus unei etape de decolorare cu cărbune activ, urmată de filtrare pe un filtru presă și clătire cu etanol pentru a reduce pierderile de produs prin adsorbția pe cărbune.

Extractul obținut este transferat într-un cristalizator, unde este diluat cu apă deionizată, iar apoi se adaugă soluție concentrată de clorură de sodiu și se încălzește la o temperatură cuprinsă între 55 și 65ºC. După limpezire, soluția este răcită treptat până la 5ºC. Cristalele formate sunt separate prin centrifugare și uscate sub vid la o temperatură de cel mult 65ºC. Ulterior, produsul este măcinat, cernut prin site cu ochiuri de 400 și 200 mm și ambalat în pungi de polietilenă plasate în recipiente de aluminiu.

Polimixinele reprezintă un amestec de polipeptide produse de bacteriile din sol, *Bacillus polymyxa* și *B. circulans*. Sunt cunoscute cinci polimixine – A, B, C, D și E, care diferă după numărul aminoacizilor din moleculă. Caracteristic pentru aceste molecule este prezența a 4-5 fragmente ale aminoacidului *α,γ-diaminobutiric*, ale treoninei, un acid gras ramificat în poziția C_9. Toate polimixinele, cu excepția polimixinei C, conțin leucină.

Aceste particularități structurale conferă moleculelor sarcină pozitivă, la disociere în mediu, ceea ce favorizează interacțiunea cu fosfolipidele membranare. Toate polimixinele au activitate biologică similară. Sunt utilizate clinic doar polimixinele B și E (Fig. A.5.7).

Polimixinele B și E (colistine) sunt utilizate pentru tratarea infecțiilor cauzate de bacteriile G(-) rezistente la acțiunea altor antibiotice. Polimixina B și polimixina E au o secvență primară aproape identică, cu o diferență majoră prezentă la poziția 6, unde *D*-Phe (*D*-fenilalanina) în polimixina B este înlocuită cu *D*-Leu (*D*-leucină) în polimixina E. Bucla heptapeptidică intramoleculară ciclică este legată între gruparea amină a lanțului lateral de pe restul de acid diaminobutiric (Dab) la poziția 4 și gruparea carboxil a reziduului *L*-Thr (*L*-treonină) C-terminal la poziția 10. Prin urmare, secvența decapeptidică include trei regiuni, și anume: o buclă heptapeptidică, un lanț tripeptidic și un lanț de acizi grași. Polimixina are, de asemenea, alte caracteristici structurale remarcabile, inclusiv reziduuri cationice (*L*-α-γ-Dab), care pot fi deprotonate la un pH 7,4, și două domenii hidrofobe (lanțul de acid gras N-terminal și segmentul *D*-Phe6-*L*-Leu7 la polimixina B sau segmentul *D*-Leu6-*L*-Leu7 la polimixina E). Prezența grupărilor lipofile și hidrofile conferă proprietăți amfipatice (amfifil). În plus, molecula de polimixină este pliată pentru a forma două fețe distincte pentru domeniile polare și hidrofobe, conferind astfel amfipaticitate structurală care este esențială pentru activitatea antibacteriană a acesteia.

Aceste polimixine sunt utilizate pentru tratarea colitelor, enterocolitelor, dizenteriei, sepsisului, pneumoniei, infecțiilor tractului urinar cauzate de *P. aeruginosa*, atunci când alte antibiotice sunt ineficiente. Sunt utilizate sub formă de unguente în tratarea unor forme de eczemă, hidradenită supurativă, arsurilor și altor afecțiuni dermice.

Polimixina B se aplică topic în tratarea infecțiilor oculare, vezicii urinare, sepsisului. Polimixina E este frecvent utilizată în tratarea diareii la copii. Polimixinele sunt utilizate în combinație cu alte antibiotice. Administrarea parenterală a acestora este limitată din cauza neuro- și nefrotoxicității acestora.

Polimixinele la pH-ul fiziologic sunt substanțe cationice care reacționează cu fosfolipidele membranare. Acest fapt perturbă permeabilitatea membranară, facilitând eliminarea extracelulară a ionilor de K^+ și a altor substanțe, ceea ce explică activitatea bactericidă a polimixinelor.

Polimixinele au efect bactericid exclusiv asupra bacteriilor aerobe G(-) (precum *P. aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae, Enterobacter, Salmonella* etc.). Nu au activitate biologică asupra coccilor aerobi (*staphylo-, strepto-, pneumo-, gono-* și *meningococci*) și asupra bacteriilor G(+).

Mecanisme de acțiune a polimixinelor

Forma disociată a polimexinei B, fiind cationică, reacționează cu grupa fosfat a lipidelor din membrana externă a bacteriilor G(-). Ca rezultat are loc substituirea ionilor de calciu și de magneziu și înlăturarea acestora din membrană.

Acest fapt destabilizează lipopolizaharidele membranare (LPM), mărește permeabilitatea membranei celulare, produce liza membranei interne care într-un final determină apoptoza celulară (Fig. A.5.8 și A.5.9).

În general, polimixinele distrug bacteriile prin diverse mecanisme, cele mai importante fiind prezentate succinct în tabelul A.5.3.

Biosinteza polimixinei E (colistină)

Biosinteza polimixinei E (colistină) necesită utilizarea a trei componenți de bază: treonină, leucină și acidul 2,4-diaminobutiric. Inițial are loc biosinteza formei liniare care ulterior ciclizează. Schema de biosinteză a polimixinei E este prezentată în figura A.5.10. Biosinteza peptidelor non-ribozomale, inclusiv a polimixinei E, începe cu activarea aminoacizilor specifici. Activarea aminoacizilor are loc prin adenilare (A), atașarea unei grupe de adenozin monofosfat (AMP), formând intermediari aminoacil-adenozin monofosfat. Acest proces decurge în prezența sintetazelor peptidice non-ribozomale (SPNR). Aminoacizii activați sunt transferați din domeniile A la proteinele purtătoare de peptidil (PCP) prin legături de tioester. PCP-urile transportă lanțul de peptide în creștere către diferite centre catalitice din cadrul liniei de asamblare SPNR. O etapă importantă în biosinteza polimixinei E este epimerizarea (E) *D*-leucinei în *L*-leucină în poziții specifice, ameliorându-i proprietățile antibacteriene. Epimerizarea aminoacizilor în biosinteza polimixinei E are un rol critic în determinarea structurii tridimensionale și a bioactivității acesteia. Prin domeniile de condensare (domeniile C) se catalizează formarea de legături peptidice între aminoacizii activați atașați la PCP, ceea ce duce la creșterea lanțului peptidic.

Biotehnologia de producere a polimixinelor, pe exemplul polimixinei B

Polimixina B din comerț constă dintr-un amestec cu conținut variat de B_1, B_2 și B_3, constituentul major fiind B_1 (peste 70%). Pentru producerea industrială a polimixinelor se folosesc bacteriile G(+) *Bacillus polymyxa*. Schema tehnologică de producere a polimixinei B este prezentată în figura A.5.11. Inițial, se pregătește mediul nutritiv pentru inocularea bacteriilor în bioreactorul pentru inoculare **(1)**. Compoziția mediului nutritiv este prezentată în tabelul A.5.4. Mediul nutritiv pregătit se sterilizează prin autoclavare, se răcește până la 30ºC, se ajustează pH-ul la valoarea 7,0, ulterior se adaugă cultura de bacterii. Inoculul se incubează în bioreactorul pentru inoculare **(1)**, echipat cu un agitator mecanic, timp de 24 de ore la 27ºC și 240 rpm. Deoarece bacteriile *Bacillus polymyxa* sunt aerobe, în toată perioada de adaptare, în bioreactorul de inoculare se admite 1 L de aer steril/ 1 L de mediu de cultură aer / minut. Aerul este sterilizat prin filtrele amplasate la intrarea

în bioreactorul de inoculare. Ulterior, inoculul se transferă în fermentatorul **(2)**, în care în prealabil este adăugat mediul nutritiv, cu compoziția prezentată în tabelul A.5.4, care este sterilizat cu abur la 130ºC, timp de 15 minute. pH-ul mediului se ajustează la 7,0, temperatura de fermentare este de 30ºC. Procesul de fermentare durează 68-72 de ore și în fementator se barbotează aer cu un debit de 0,8 m^3 aer/m^3 mediu/min și se agită continuu cu viteza de 180 rpm. Ca rezultat se obține 1,8-2,8 g/L polimixina B.

În timpul procesului de fermentare concentrația glucozei se menține în intervalul de la 0,5 până la 2,5 g/L, iar concentrația ionilor de amoniu se menține în intervalul de la 0,3 până la 0,6 g/L. Conținutul de oxigen dizolvat se menține peste 30% în timpul fermentării. Ca sursă de aminoacizi în mediul de fermentare se poate folosi făina de soia, făina de grâu, tărâța de grâu, extractul de porumb etc. Fermentarea se consideră terminată atunci când nu se mai consumă glucoză.

După terminarea procesului de fermentare, soluția nativă, care conține amestec de polimixine B cu concentrația de 1,2-1,8 g/L, se pompează spre separare cu ajutorul pompei **(3)** și se separă de biomasă cu ajutorul filtrului cu tambur rotativ **(4)**. Soluția nativă filtrată se pompează în rezervorul **(5)**, echipat cu agitator cu palete și se ajustează pH-ul amestecului la valoarea 3,0, cu acid sulfuric, dozat din vasul **(6)**. După ajustarea pH-ului la soluție se adaugă 1% cărbune activ (CA) pentru decolorarea soluției și după o oră de amestecare suspensia se filtrează cu ajutorul filtrului **(7)**. Soluția decolorată se percolează printr-o coloană **(8)** umplută cu adsorbant neionogen AMBERLITE® XAD-4 (polimer stiren-divinilbenzen macroreticular reticulat). După trecerea soluției coloana este spălată cu apă deionizată, din vasul **(9)**. Apoi polimixina B este eluată de pe coloană cu soluție de izopropanol de 60% **(10)**. Eluatul se colectează în rezervorul (**11**), unde se ajustează pH-ul la 10,8 cu ajutorul soluției de NaOH, din dozatorul **(12)**. Ca rezultat are loc precipitarea polimixinei sub formă de bază, care este separată prin filtrare **(13)**. Precipitatul este colectat în rezervorul **(14)**, unde se spală cu apă deionizată fierbinte (70ºC), dozată din vasul (**15**), până când pH-ul devine 7,8. La amestecul obținut se adaugă soluție de acid sulfuric (10%) cu ajutorul dozatorului (**16**), pentru formarea soluției de sulfat de polimixina B. La amestecul dat se adaugă 0,5% CA, pentru decolorare.

Suspensia se filtrează printr-un filtru cu membrană cu dimensiunea porilor de 0,22 μm **(17)** și sulfatul de polimixina B se recuperează prin liofilizare în liofilizatorul **(18)**. Produsul obținut se ambalează și se depozitează.

Bacitracinele sunt polipeptide izolate din bacteriile *B. licheniformis*. Sunt produse de *Bacillus subtilis*. Au fost izolate zece bacitracine A, A_1, B, C, D, E, F_1,

F_2, F_3 și G. Bacitracina de uz clinic reprezintă un amestec de polipeptide care conțin în cantitate mai mare bacitracina A (Fig. 5.3).

Bacitracina A este un medicament bactericid care inhibă formarea catenelor peptidoglicanice, componente majore ale peretului celular. Majoritatea bacteriilor G(+) sunt sensibile la acest medicament, inclusiv *Staphylococcii* și *C. difficile*, grație lipsei membranei externe a peretelui celular. Bacitracina nu are efect asupra bacteriilor G(-). Este utilizată extern pentru tratarea infecțiilor purulente oculare și dermice. Administrarea intramusculară este rară din cauza nefrotoxicității. Administrarea intramusculară este indicată copiilor infectați cu pneumonie cauzată de *Staphylococci* rezistenți la alte antibiotice.

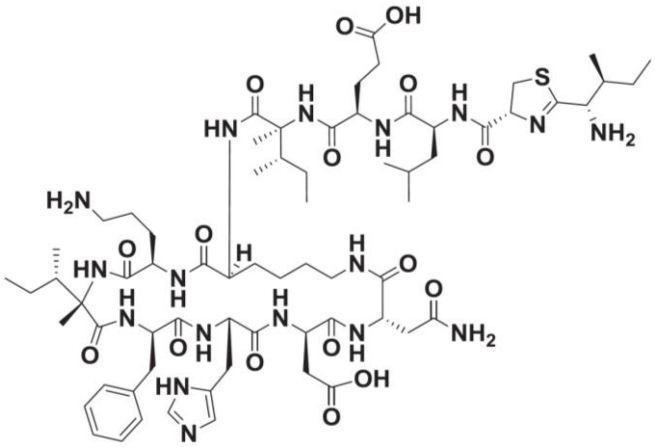


Figura 5.3. Formula de structură a *bacitracinei A*

Bacitracinele acționează prin inhibarea sintezei peptidoglicanului, component esențial al peretelui celular bacterian, blocând reciclarea purtătorului lipidic C_{55}-izoprenil pirofosfat (bactoprenol). Prin legarea de această moleculă, bacitracina blochează defosforilarea acesteia, esențială pentru transportul precursorilor de peptidoglican.

Această inhibare duce la perturbarea sintezei peretelui celular, slăbirea structurii bacteriene și, în final, moartea celulei prin liza osmotică. Bacitracina este utilizată în special în aplicații topice pentru tratarea infecțiilor bacteriene provocate de bacteriile G(+).

Biotehnologia bacitracinelor pe exemplul bacitracinei A

Bacitracina, inițial izolată din *Bacillus licheniformis* și *B. subtilis*, este un complex de antibiotice ciclopeptidice cu spectru larg de acțiune care cuprinde diverși aminoacizi, inclusiv *L*-histidină (*L*-His), *L*-asparagină (*L*-Asn), *L*-lizină (*L*-Lys), *D*-ornitină (*D*-Orn), acid *D*-aspartic (*D*-Asp), *D*-fenilalanină (*D*-Phe), acid *D*-glutamic (*D*-Glu), *L*-cisteină (*L*-Cys), *L*-leucină (*L*-Leu), *L*-izoleucină (*L*-Ile) și

L-valină (*L*-Val). Bacitracina conține mai mult de zece componente (inclusiv bacitracina A, B_1, B_2, B_3, D_1, D_2, D_3), care diferă prin unul sau doi aminoacizi constituenți, dintre care bacitracina A prezintă cea mai puternică activitate biologică. Bacitracina are un spectru antimicrobian larg, viteză de excreție rapidă, absorbție scăzută în organismele animalelor, dezvoltă greu rezistență și frânează sinteza peretelui celular al majorității bacteriilor G(+). Astfel, bacitracina este aplicată pe larg în furajele animaliere și în industria medicală timp de peste 50 de ani. În 2017, piața globală a produselor cu bacitracină a ajuns la 312 milioane de dolari, iar bacitracina acidului metilen salicilic deține cea mai mare cotă de producere. Deși industrializarea bacitracinei este largă, costurile ridicate, randamentele scăzute și producerea deșeurilor împiedică aplicațiile ulterioare ale acesteia. Actualmente au fost dezvoltate diferite metode pentru îmbunătățirea microorganismelor *Bacillus* și optimizarea proceselor de fermentare a bacitracinei.

Mediul pentru producerea bacitracinei conține 4,5% amidon de porumb, 10% făină de soia, 0,6% $CaCO_3$ și 0,1% $(NH_4)_2SO_4$ și pH-ul neutru.

Amidonul de porumb și făina de soia sunt materii prime utilizate în mod obișnuit pentru producția microbiană de antibiotice. Amidonul de porumb este o polizaharidă care nu este susceptibilă să traverseze membranele celulare. Microorganismele secretă în general *α*-amilaze în mediul extracelular pentru degradarea amidonului, iar maltodextrinele și maltoza rezultate sunt importate prin sistemele de transport ABC sau sistemul fosfotransferazelor. Cercetătorii au optimizat modul de utilizare a amidonului din *B. licheniformis*, prin întărirea transportului transmembranar al hidrolizatelor enzimatice de amidon și promovarea degradării acestora la nivel metabolic central, sporind astfel producția de bacitracină în mediul de fermentare cu conținut scăzut de amidon de porumb.

Făina de soia degresată conține cantități mari de proteine (≈45%) și are o diversitate mare de aminoacizi, fiind astfel o resursă importantă de precursori în sinteza bacitracinei. Subtilisin este o protează industrială importantă în *B. licheniformis*, care are un rol esențial în degradarea și utilizarea făinii de soia.

Disponibilitatea unei cantități suficiente de aminoacizi, care au rolul de precursori în sinteza bacitracinei, este o cerință importantă, dar capacitățile de sinteză a aminoacizilor de către *B. licheniformis* sunt destul de mici; în plus, compoziția aminoacizilor din făina de soia diferă de cea a bacitracinei, ceea ce limitează producția de bacitracină. Adăugarea exogenă a aminoacizilor *L*-Cys, *L*-Ile, *L*-Leu, *L*-Lys, *L*-Asp, *L*-Orn și *S*-adenozilmetionină (SAM), care sunt precursori ai bacitracinei, mărește randamentul de biosinteză a acesteia.

Pentru a satisface cerințele de producție comercială și pentru a reduce costurile de fermentare, mai multe produse secundare agricole au fost utilizate ca

materii prime pentru producția biochimică industrială, cum ar fi făina de soia, făina de bumbac și făina de rapiță. Aceste materii prime sunt bogate în aminoacizi, vitamine și săruri anorganice și sunt resurse tipice de azot utilizate de microorganisme pentru producerea antibioticelor. O combinație de 7% făină de soia cu 2% făină de rapiță este o combinație economică optimă pentru producerea de bacitracină. În plus, s-a dovedit că suplimentarea cu lactoză este mai bună decât suplimentarea cu glucoză în menținerea sintezei bacitracinei, în timpul fermentării. Adăugarea exogenă a 515 mg/L KNO_3 și a 45 mg/L Orn crește randamentul de bacitracină. Suplimentarea cu 0,30 mg/L $MnCl_2$ crește activitatea acetoin reductazei și eficiența oxidării NADH, care contribuie la creșterea celulelor și la sinteza bacitracinei. În general, oligozaharidele sunt elicitori biotici (*elicitorii biotici – compuși de origine biologică care stimulează orice tip de apărare prin declanșarea metabolismului secundar pentru a proteja*) în sinteza antibioticelor și enzimelor. Totodată, adăugarea de oligoguluronat și a oligozaharidelor manan sporește semnificativ randamentul de biosinteză a bacitracinei. Schema biosintezei, transportului și rețelei de reglare a bacitracinei A este prezentată în figura A.5.12.

Pregătirea inoculului pentru producția de bacitracină

Compoziția mediului nutritiv este prezentată în tabelul A.5.5. Înainte de inoculare, pentru asigurarea sterilității mediul nutritiv se autoclavează la 121ºC timp de 15 minute. Ulterior în mediul nutritiv, steril, se inoculează cultura de bacterii *B. licheniformis* și se incubează în bioreactorul (**1**), echipat cu un agitator mecanic, la 36 ± 0,5ºC timp de 24 ore, agitat la viteza de 150 rpm, pH-ul 7.

După 24 de ore inoculul se trece în fermentatorul (**2**), în care este pregătit mediul de fermentare. Schema tehnologică de producere, separare și purificare a bacitracinelor este prezentată în figura A.5.13. Mediul nutritiv în prealabil se sterilizează cu abur la 125ºC, timp de 15 minute. Producerea bacitracinei de către *B. licheniformis* este influențată de substratul solid. În calitate de substrat la producerea bacitracinei pot fi folosite tărâțe de grâu, coji de orez, floarea-soarelui, făină de soia și semințe de bumbac. Totuși, frecvent este folosită făina de soia care este o sursă bogată în proteine și azot, iar producerea bacitracinei este dependentă de excesul de azot. Compoziția mediului nutritiv pentru procesul de fermentare este prezentată în tabelul A.5.5. În procesul de fermentare a bacitracinei conținutul oxigenului dizolvat trebuie menținut la 20%, care se asigură prin barbotarea aerului steril. Concentrațiile mai mici de oxigen în mediul de fermentare micșorează considerabil producerea bacitracinei. Concentrațiile mai mari de 20% de O_2 micșorează rata de absorbție a carbohidraților și rata de creștere a *B. licheniformis*. Viteza optimă de agitare, pentru asigurarea cu oxygen a întregului volum de biomasă, este de 400 rpm. Temperatura optimă în procesul de fermentare este de

35ºC, iar valoarea optimă a pH-ului este 7,0. Atât valorile ridicate, cât și cele scăzute ale pH-ului inhibă sinteza bacitracinei. Procesul de fermentare la producerea bacitracinei de către *B. licheniformis* durează 48 de ore. După 48 de ore de la începutul procesului de fermentare randamentul de producere scade, din cauza efectului inhibitor al bacitracinei asupra *Bacillus licheniformis*, precum și din cauza epuizării nutrienților din mediu. În plus, odată cu depășirea acestei perioade de fermentare începe dezaminarea oxidativă a inelului de tiazolină în cetotiozol din bacitracină.

Separarea și purificarea bacitracinelor

Există numeroase metode de separare și purificare a bacitracinelor, una dintre acestea este descrisă în continuare. După ce procesul de fermentare a luat sfârșit, soluția nativă se separă de biomasă prin filtrare cu ajutorul filtrului cu tambur rotativ (**4**), unde se pompează cu ajutorul pompei (**3**). Soluția nativă se colectează în rezervorul (**5**). Soluția nativă limpede se trece printr-o coloană cu adsorbant (**6**) cu proprietăți zeolitice (bentonită, caolin, silicat de magneziu, diatomit etc.). Înainte de utilizare, adsorbantul trebuie precondiționat, prin spălarea succesivă cu o soluție alcalină (cum ar fi hidroxidul de sodiu, calciu sau amoniu), apoi cu un acid (cum ar fi acetic, clorhidric sau sulfuric) și în final cu apă. Concentrația soluțiilor utilizate nu este fundamentală, dar este eficientă utilizarea soluțiilor diluate. Unele materiale zeolitice (de ex., bentonita) au proprietăți adsorbante foarte bune, dar este extrem de dificil de filtrat. Această dificultate poate fi depășită prin utilizarea unui amestec de bentonită și a unui auxiliar de filtrare, cum ar fi diatomitul calcinat. Acest amestec păstrează proprietățile excelente de adsorbție ale bentonitei și depășește dificultatea de separare a bentonitei de soluția nativă.

După trecerea soluției native prin adsorbant bacitracina, împreună cu unele impurități, este adsorbită și reținută pe adsorbant. Impuritățile adsorbite se îndepărtează din adsorbant prin spălarea lui succesivă cu apă deionizată din dozatorul (**7**), apoi cu soluție de clorură de fier (10%) din dozatorul (**8**) și în final cu apă până când apa de spălare este lipsită de ionii de fier. Această etapă de spălare nu este esențială, deoarece bacitracina adsorbită a atins deja puritatea necesară la această etapă. Cu toate acestea, etapa de spălare elimină unele impurități și crește puritatea produsului final.

Ulterior bacitracina adsorbită este eluată de pe adsorbant prin spălarea coloanei cu o soluție de bază, din dozatorul (**9**), precum hidroxidul de amoniu, sodiu, calciu sau bariu. Soluțiile de hidroxid de calciu şi bariu sunt preferabile, deoarece cationii pot fi îndepărtați ușor din soluție prin precipitare sub formă de

oxalat. Eluatul obținut se colectează în rezervorul (**10**) și se neutralizează cu un acid, cum ar fi cel clorhidric, sulfuric, acetic, citric, oxalic etc. Alegerea acidului se face în dependență de tipul de bază utilizat anterior și de necesitatea obținerii în final a bacitracinei lipsite de orice săruri. Astfel, dacă s-a folosit hidroxidul de calciu ca eluant, atunci se utilizează acidul oxalic (1,5-2,0%), dozat din vasul **(11),** pentru neutralizarea soluției și precipitarea oxalatului de calciu. Acesta se separă prin filtrare cu ajutorul filtrului **(12)** și se colectează în rezervorul **(13)**. Soluția apoasă de bacitracină se colectează în rezervorul **(14)**. Apoi eluantul neutralizat este concentrat în vid la temperatura de 60ºC în uscătorul **(15)** și ulterior liofilizat pentru a recupera bacitracina în liofilizatorul **(16)**. Randamentul de recuperare al bacitracinei prin această metodă este de 75-80%.

Mecanisme de rezistență bacteriană la bacitracine

Rezistența bacteriană la bacitracine se poate dezvolta prin mai multe mecanisme. Aceste mecanisme implică în general modificări în sinteza peretelui celular bacterian, modificări ale accesului și activității antibioticului. Principalele mecanisme de rezistență sunt succinct prezentate în tabelul A.5.6.

Printre antibiotice glicopeptidice obținute pe cale biotehnologică mai pot fi enumerate: vancomicina, tirocidinele etc.

Vancomicina a fost izolată pentru prima dată în 1956 din culturile *Streptomyces orientalis,* actualmente *Nocardia orientalis*; formula de structură a acesteia este prezentată în figura 5.4.

Vancomicina este un antibiotic glicopeptidic activ împotriva bacteriilor G(+). Acționează prin inhibarea sintezei peretelui celular bacterian, legându-se de porțiunea acil-*D*-ala-*D*-ala a peptidoglicanului și blochează formarea legăturilor încrucișate necesare stabilității peretelui celular. Aceasta duce la acumularea de precursori ai peptidoglicanului, activarea enzimelor degradative și, în final, la distrugerea bacteriei prin liză osmotică.

Vancomicina nu este eficientă împotriva bacteriilor G(-) din cauza dimensiunii mari a moleculei, care nu poate traversa membrana lor externă. Administrată intravenos, este utilizată pentru infecții severe cauzate de bacterii G(+) rezistente la alte antibiotice, precum sepsisul, endocardita, pneumonia și meningita. Administrarea orală este rezervată tratamentului infecțiilor cu *Clostridioides difficile*, deoarece nu este absorbită sistemic.

Este considerată antibiotic de prima linie împotriva *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis* rezistenți la meticilină, având ca analog comercial Vancocin.

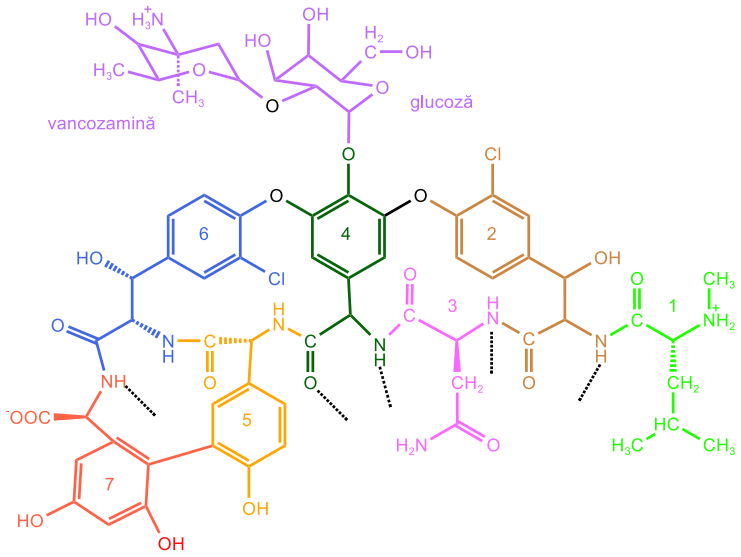


Figura 5.4. Structura chimică a vancomicinei

Dizaharidă compusă din vancozamină și glucoză atașată la poziția para a grupei fenil a (2-[α-4-L-epi-vancozaminil]-β-1-D-glucozil)-D-fenilglicinei - fragmentul 4. De asemenea, sunt prezentate fragmentul 1-N-metil-D-leucină; fragmentul 2-m-cloro-p-hidroxi-D-tirozină; fragmentul 3-asparagină; fragmentul 5-p-hidroxi-D-fenilglicină; fragmentul 6-m-cloro-p-hidroxi-D-tirozină şi fragmentul 7-m,m-dihidroxi-L-fenilglicină. Liniile negre, punctate, evidențiază grupele care formează legături cu substratul D-Ala-D-Ala din peptidoglican.

Mecanismul de rezistență la vancomicină

Utilizarea pe scară largă a vancomicinei a dus, în mod previzibil, la apariția și răspândirea rapidă a rezistenței la vancomicine între diferite bacterii G(+). Rezistența enterococilor la vancomicină se bazează pe modificarea aminoacizilor terminali *D*-Ala-*D*-Ala ai subunităților monomerului dipeptidic în *D*-Ala-*D*-Lac sau *D*-Ala-*D*-Ser. Această modificare permite formarea peretelui peptidoglicanului, dar limitează legarea vancomicinei.

Aceste mutații conferă fenotipuri rezistente în diferite grade la vancomicină. Acest fapt se explică prin afinitatea de legare a vancomicinei de *D*-Ala-*D*-Lac, care este de 1000 de ori mai redusă din cauza pierderii unei singure legături de hydrogen, în comparație cu afinitatea sa modestă (de 6 ori) mai redusă pentru *D*-Ala-*D*-Ser din cauza împiedicării sterice de către gruparea hidroxil *D*-Ser.

Tirocidina este un amestec de decapeptide ciclice produse de bacteria *Brevibacillus brevis* prezentă în sol. Poate fi formată din 4 secvențe diferite de aminoacizi, astfel se cunosc 4 forme de tirocidină A–D; formula de structură a acestora este prezentată în figura 5.5. *Tirocidina A* este un amestec de antibiotic,

fiind cunoscută pentru activitatea sa antibacteriană puternică, în special împotriva bacteriilor G(+).

Tirocidina A este compusă din zece aminoacizi, formând o peptidă ciclică. Secvența primară de aminoacizi a tirocidinei A include: *D*-fenilalanină, *L*-prolină, *L*-fenilalanină, *D*-fenilalanină, *L*-asparagină, *D*-glutamină, *L*-tirozină, *L*-valină, Ornitidină, *L*-leucină. Lanțul peptidic formează o structură ciclică, care contribuie la stabilitatea și bioactivitatea biologică.

Tirocidina A este un antibiotic care acționează prin perturbarea membranei celulare bacteriene, crescând permeabilitatea acesteia și provocând eliminarea ionilor esențiali, ceea ce duce la moartea celulelor. Este eficientă împotriva bacteriilor G(+), precum *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* și *Bacillus subtilis*, dar are o activitate limitată împotriva bacteriilor G(-) din cauza membranei externe.

Forma tirocidinei în funcție de poziția aminoacizilor			
Tirocidina	3	4	7
A	L-Phe	D-Phe	L-Tyr
B	L-Trp	D-Phe	L-Tyr
C	L-Trp	D-Trp	L-Tyr
D	L-Trp	D-Trp	L-Trp

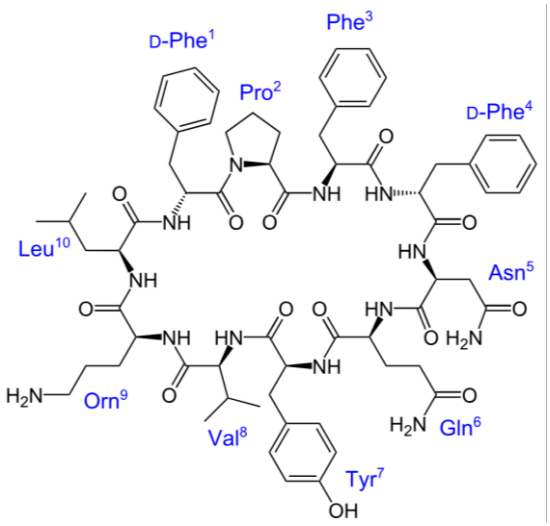


Figura 5.5. Formula de structură a tirocidinei A și formele tirocidinei B, C și D în funcție de aminoacizii din pozițiile 3, 4 și 7

Din cauza toxicității sistemice, inclusiv efectelor hemolitice și citotoxice, utilizarea tirocidinei este restricționată la aplicații topice sub formă de unguente și creme pentru infecțile superficiale. Pentru un efect terapeutic mai important este combinată cu alte antibiotice. Tirocidina A este produsă de *Bacillus brevis* prin biosinteză non-ribozomală.

Mecanismul de rezistență

Bacteriile sunt puțin rezistente la acțiunea tirocidinei A, fiind astfel un medicament important în tratarea infecțiilor rezistente la alte antibiotice.

Analogi comerciali: *trachisan* (78-80% tirocidine și 20-30% gramicidine); *tirotricina* (78-80% tirocidine și 20-30% gramicidine) etc.

Întrebări petru autoevaluare

1. Clasificați aminoacid- și peptido-antibioticele explicând diferențele structurale și funcționale dintre clase și relevanța lor terapeutică actuală.
2. Identificați și reprezentați formulele de structură a principalilor aminoacid- și peptido-antibiotice.
3. Analizați comparativ mecanismele de acțiune biologică ale aminoacid- și peptido-antibioticelor, corelând structura chimică cu activitatea antibacteriană și specificitatea față de ținta biologică.
4. Propuneți mecanismele generale de biosinteză a aminoacid-antibioticelor, evidențiind etapele critice și posibilele puncte de optimizare biotehnologică.
5. Elaborați scheme detaliate pentru biosinteza polimixinelor, gramicidinelor și bacitracinelor, analizând potențialele inovații tehnologice sau intervenții genetice ce pot îmbunătăți productivitatea.
6. Proiectați un proces biotehnologic complet pentru producerea *D*-cicloserinei, incluzând etapele de cultivare, extracție, separare și purificare. Explicați rolul fiecărei etape în asigurarea calității produsului final.
7. Descrieți procesul integrat de obținere a gramicidinelor, cu accent pe gramicidina S, și evaluați critic metodele actuale de purificare și caracterizare utilizate în industrie.
8. Analizați avantajele producerii biotehnologice a polimixinelor, din punct de vedere economic, ecologic și al eficienței terapeutice. Comentați asupra provocărilor legate de toxicitate și reglementare.
9. Propuneți schema tehnologică detaliată pentru biosinteza și purificarea polimixinei B, explicând rolul controlului parametrilor de proces și al metodelor moderne de monitorizare a calității.
10. Descrieți procesul biotehnologic de producere a bacitracinelor și argumentați importanța controlului factorilor de mediu (pH, temperatură, compoziția mediului) asupra randamentului și purității produsului.

BIBLIOGRAFIE

1. ROBBINS, L., BALARAM, A., DEJNEKA, S. et al. Heterologous production of the *D*-cycloserine intermediate O-acetyl-*L*-serine in a human type II pulmonary cell model. In: *Scientific Reports*, 2023, 13, 8551. https://doi.org/10.1038/s41598-023-35632-4.
2. TAKADA, Y., ITOH, H., PAUDEL, A. et al. Discovery of gramicidin A analogues with altered activities by multidimensional screening of a one-bead-one-

compound library. In: *Nature Communications*, 2020, 11, 4935. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18711-2.
3. ALENEZI, F.N., BOUKET, A.C., CHERIF-SILINI, H., SILINI, A., JASPARS, M., OSZAKO, T., BELBAHRI, L. Loss of Gramicidin Biosynthesis in Gram-Positive Biocontrol Bacterium *Aneurinibacillus migulanus*. Its Biological Control Ability of Phytophthora. In: *Forests*, 2022, 13, 535. https://doi.org/10.3390/f13040535.
4. IACOVELLI, R., BOVENBERG, R.A.L., DRIESSEN, A.J.M. Nonribosomal peptide synthetases and their biotechnological potential in Penicillium rubens. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, 48(7–8), kuab045. https://doi.org/10.1093/jimb/kuab045.
5. BERDITSCH, M., TRAPP, M., AFONIN, S. et al. Antimicrobial peptide gramicidin S is accumulated in granules of producer cells for storage of bacterial phosphagens. In: *Scientific Reports*, 2017, 7, 44324. https://doi.org/10.1038/srep44324.
6. SCHOLAR, E. Polymyxin B. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007, pp. 1–4. https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.62442-0.
7. YU, Z., QIN, W., LIN, J., FANG, S., QIU, J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. In: *BioMed Research International*, 2015, 679109. https://doi.org/10.1155/2015/679109.
8. SLINGERLAND, C. J., WESSELING, C.M.J., INNOCENTI, P. et al. Targeted delivery of antibiotics. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(23), 15878–15892. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01528.
9. KIM, S.Y., PARK, S.Y., CHOI, S.K., PARK, S.H. Biosynthesis of polymyxins B, E, and P using genetically engineered polymyxin synthetases in the surrogate host Bacillus subtilis. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(7), pp. 1015–1025. https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05036.
10. TANG, H., ZHANG, Y., MA, J. et al. Design, synthesis and antimicrobial studies of some polymyxin analogues. In: *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73(3), pp. 158–166. https://doi.org/10.1038/s41429-019-0262-0.
11. EPPELMANN, K., DOEKEL, S., MARAHIEL, M.A. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host Bacillus subtilis. In: *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37), pp. 34824–34831. https://doi.org/10.1074/jbc.m104456200.
12. KLINE, T., HOLUB, D., THERRIEN, J. et al. Synthesis and characterization of the colistin peptide polymyxin E1 and related antimicrobial peptides. In: *Journal of Peptide Research*, 2001, 57(3), pp. 175–187. https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2001.00835.x.
13. MACHADO, I., INÁCIO, J., JORGE, P., TEIXEIRA, F. A game with a purpose: Designing structural modifications in polymyxin B to face multi-drug resistant bacteria. In: *Medical Sciences Forum*, 2023, 23, 2. https://doi.org/10.3390/msf2023023002.
14. AHN, J.M., KASSEES, K., LEE, T.K. et al. Strategy and tactics for designing analogs: Biochemical characterization of the large molecules. In: *Comprehensive*

Medicinal Chemistry III, 2017, pp. 66–115. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.12413-8.
15. ZHU, J., WANG, S., WANG, C. et al. Microbial synthesis of bacitracin: Recent progress, challenges, and prospects. In: *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(2), pp. 314–322. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2023.03.009.
16. ALI, S., NELOFER, R., ANDLEEB, S. et al. Biosynthesis and optimization of bacitracin by mutant Bacillus licheniformis using submerged fermentation. In: *Indian Journal of Biotechnology*, 2018, 17(2), pp. 251–260. http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/45099.
17. ZHU, J., CAI, D., XU, H. et al. Enhancement of precursor amino acid supplies for improving bacitracin production by activation of branched chain amino acid transporter BrnQ and deletion of its regulator gene lrp in Bacillus licheniformis. In: *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(4), pp. 236–243. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.009.
18. BISCHOFF, D., PELZER, S., BISTER, B. et al. The biosynthesis of vancomycin-type glycopeptide antibiotics – The order of the cyclization steps. In: *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40(24), pp. 4688–4691. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20011217)40:24<4688::aid-anie4688>3.0.co;2-m.
19. XU, L., HUANG, H., WEI, W. et al. Complete genome sequence and comparative genomic analyses of the vancomycin-producing Amycolatopsis orientalis. In: *BMC Genomics*, 2014, 15, 363. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-363.
20. HO, Y.T.C., SCHITTENHELM, R.B., IFTIME, D. et al. Exploring the flexibility of the glycopeptide antibiotic crosslinking cascade for extended peptide backbones. In: *Chembiochem*, 2023, 24(6), e202200686. https://doi.org/10.1002/cbic.202200686.
21. THAKER, M.N., KALAN, L., WAGLECHNER, N. et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 59(3), pp. 1405–1410. https://doi.org/10.1128/aac.04490-14.
22. LI, G., WALKER, M.J., DE OLIVEIRA, D.M.P. Vancomycin resistance in Enterococcus and Staphylococcus aureus. In: *Microorganisms*, 2023, 11, 24. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010024.
23. PHILLIPS-JONES, M.K., LITHGO, R., DINU, V. et al. Full hydrodynamic reversibility of the weak dimerization of vancomycin and elucidation of its interaction with VanS monomers at clinical concentration. In: *Scientific Reports*, 2017, 7, 12620. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12620-z.
24. AFTAB, M.N., IKRAM-UL-HAQ, B.S. Systematic mutagenesis method for enhanced production of bacitracin by Bacillus licheniformis mutant strain UV-MN-HN-6. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(1), pp. 78–88. https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100009.
25. ZAREI, I. Biosynthesis of bacitracin in stirred fermenter by Bacillus licheniformis using defatted oil seed cakes as substrate. In: *Modern Applied Science*, 2012, 6(2), 30. https://doi.org/10.5539/mas.v6n2p30.

26. NARAYANA, J.L., CHEN, J.Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. In: *Peptides*, 2015, 72, pp. 88–94. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.05.012.
27. HASSAN, A., ALI, S., FAROOQ, M.A. et al. Optimization of enhanced microbial production of zinc bacitracin by submerged fermentation technology. In: *Journal of Basic Microbiology*, 2020, 60(7), pp. 585–599. https://doi.org/10.1002/jobm.201900694.

6. BIOTEHNOLOGIA AMINOGLICOZIDELOR

1. Aminoglicozide: clasificare, structură, proprietăți chimice și utilizare farmaceutică. Mecanismele de acțiune biologică a aminoglicozidelor și dezvoltarea rezistenței la aminoglicozide
2. Biosinteza aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei
3. Procesul biotehnologic de producere a aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei

Abilități

Studentul:

- clasifică aminoglicozidele;
- explică mecanismul de acțiune și mecanismele de rezistență la aminoglicozide;
- prezintă formulele de structură a aminoglicozidelor;
- elaborează fluxul tehnologic de producere a streptomicinei;
- elaborează schema generală de biosinteză a aminoglicozidelor;
- descrie etapele și parametrii tehnici ai proceselor biotehnologice de producere a streptomicinei;
- aplică metode fizice, chimice și fizico-chimice pentru izolarea și purificarea aminoglicozidelor.

6.1. Aminoglicozide: clasificare, structură, proprietăți chimice și utilizare farmaceutică. Mecanismele de acțiune biologică a aminoglicozidelor și dezvoltarea rezistenței la aminoglicozide

Aminoglicozidele sunt antibiotice formate din două sau mai multe aminoglucide legate prin legături glicozidice cu un aminoalcool ciclic. Aminoalcoolul ciclic poate fi de tip **streptidină** regăsit în *streptomicină* sau *2-deoxistreptamină*, regăsit în alte aminoglicozide (Fig. 6.1). Antibioticele ce conțin *2-deoxistreptamina* se diferențiază după numărul și tipul glucidelor care se leagă de aminoalcool (ciclitol): neomicinele conțin trei fragmente de glucide legate de aminoalcool, kanamicinele și gentamicinele, fiecare au câte două fragmente de glucide legate de aminoalcool. Kanamicinele și gentamicinele diferă după tipul aminohexozelor.

Aminoglicozidele sunt cel de-al doilea tip de antibiotice de origine naturală descoperite şi utilizate după *β*-lactame. Streptomicina, prima aminoglicozidă, a fost identificată de Waksman şi colab., în *Streptomyces griseus*. În 1949, același grup de cercetători au identificat neomicina în *Streptomyces fradiae*, cu activitate superioară împotriva bacteriilor G(-) aerobe. Neomicina este relativ toxică pentru om, de aceea utilizarea acesteia este limitată. Ulterior a fost izolată gentamicina,

utilizată în special în cazul infecțiilor cauzate de *Pseudomonas aeruginosa*. În scopul reducerii rezistenței bacteriilor la aminoglicozidele naturale, au fost obținute de asemenea antibiotice semisintetice, precum amikacina, isepamicina și netilmicina. Streptomicina a fost primul medicament cu o eficiență înaltă în tratamentul tuberculozei provocate de bacilul *Koch*. Pentru aceste descoperiri lui Waksman i s-a acordat Premiul Nobel.

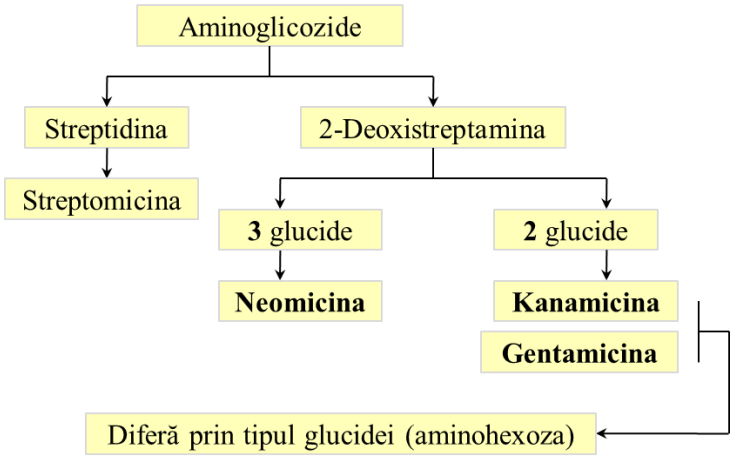


Figura 6.1. Clasificarea aminoglicozidelor în funcție de structura chimică

Cele mai utilizate aminoglicozide sunt: streptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, amikacina, tobramicina, sisomicina și netilmicina.

Unii autori clasifică aminoglicozidele în generaţii: *generaţia 1* – care cuprinde streptomicina, kanamicina şi neomicina; *generaţia a 2*^{a} – gentamicina, tobramicina, sisomicina şi *generaţia a 3*^{a} – amicacina, netilmicina, isepamicina.

Aminoglicozidele sunt clasificate pe scară largă în patru subclase în baza fragmentului aminociclitol: (1) *fără deoxistreptamină* (ex., streptomicina care are un inel de streptidină); (2) *un inel de deoxistreptamină monosubstituit* (ex., apramicină); (3) *un inel de deoxistreptamină 4,5-di-substituit* (ex., neomicină, ribostamicină); (4) *un inel de deoxistreptamină 4,6-disubstituit* (ex., gentamicină, amikacină, tobramicină și plazomicină). Structura de bază poate conține grupe amino și hidroxil care influențează direct mecanismele de rezistență a bacteriilor la aminoglicozide.

Structura comună a aminoglicozidelor include un aminociclitol, de care se leagă 2 (sau în mod excepțional 3) glucide (Fig. 6.2). Aceste inele pot avea substituenți, dintre cel mai des întâlnite fiind grupele hidroxil și amino.

Aminoglicozidele naturale pot fi clasificate în funcție de natura aminociclitolului sau de tipul glucidelor constituente (Fig. A.6.1).

• Ciclitol = streptidină – streptomicina,

• Ciclitol = deoxistreptamină,
• glucide legate în pozițiile 4 și 6:

a) *kanamicinele A* și *B, amikacina* (semisintetică, derivată din kanamicina A), *tobramicina, dibekacina*;
b) *gentamicina* (gentamicina comercială este un amestec de trei componente ale gentamicinei C (C_1,C_{1a},C_2) în proporție de aproximativ 30:30:40);
c) *gentamicina B* (necomercializată), *isepamicina* (semisintetică);
d) *sisomicina, netilmicină* (semisintetică, diferită de alte aminoglicozide după tipul glucidei),

• glucide legate în pozițiile 4 și 5 – neomicina.

Utilizarea farmaceutică a aminoglicozidelor

Aminoglicozidele sunt molecule policationice la pH-ul fiziologic, ceea ce seminifică că se leagă de molecule anionice, cum ar fi ADN și ARN. Sunt molecule polare, respectiv, bine solubile în apă. Au caracter bazic, formând săruri cu acizii. La administrarea orală sunt foarte slab absorbite, de aceea sunt administrate parenteral. Deoarece aminoglicozidele sunt rapid degradate de sucul gastric, se preferă administrarea injectabilă a acestora. Ele pot trece prin bariera placentară, dar nu trec prin bariera cerebrală. De aceea în tratrea meningitelor, pentru obținerea unui efect terapeutic, aminoglicozidele se administrează direct în SNC. Aminoglicozidele sunt antibiotice cu proprietăți bactericide puternice, cu spectru larg de acțiune, administrate în principal pentru tratrea infecțiilor cauzate de bacteriile aerobe, G(-). În asociere cu alte clase de antibiotice, acționează împotriva unor microorganisme G(+). Aminoglicozidele sunt deosebit de efective împotriva *Enterobacteriaceae*, inclusiv *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* și *K. oxytoca, Enterobacter cloacae* și *E. aerogenes, Providencia spp., Proteus spp., Mor ganella spp., Serratia spp.* Sunt active împotriva *Yersinia pestis* și *Francisella tularensis*, agenții care provoacă ciuma și, respectiv, tularemia. Au o activitate bună împotriva *Staphylococcus aureus*, inclusiv împotriva celor rezistente la meticilină și vancomicină, *P. aeruginosa* și într-un anumit grad împotriva *Acinetobacter baumannii*. Multe *Mycobacterium spp.* sunt rezistente la aminoglicozide, inclusiv *Mycobacterium tuberculosis, M. fortuitum, M. chelonae* și *M. avium*. Pentru absorbția aminoglicozidelor în celule bacteriene este necesar transportul activ de electroni, de aceea ele nu sunt active în mod inerent împotriva bacteriilor anaerobe. De asemenea, aminoglicozidele nu sunt active împotriva majorității *Burkholderia spp., Stenotrophomonas spp., Streptococcus spp.* și *Enterococcus spp*. Formulele de structură a unor aminoglicozide sunt prezentate în figura 6.2.

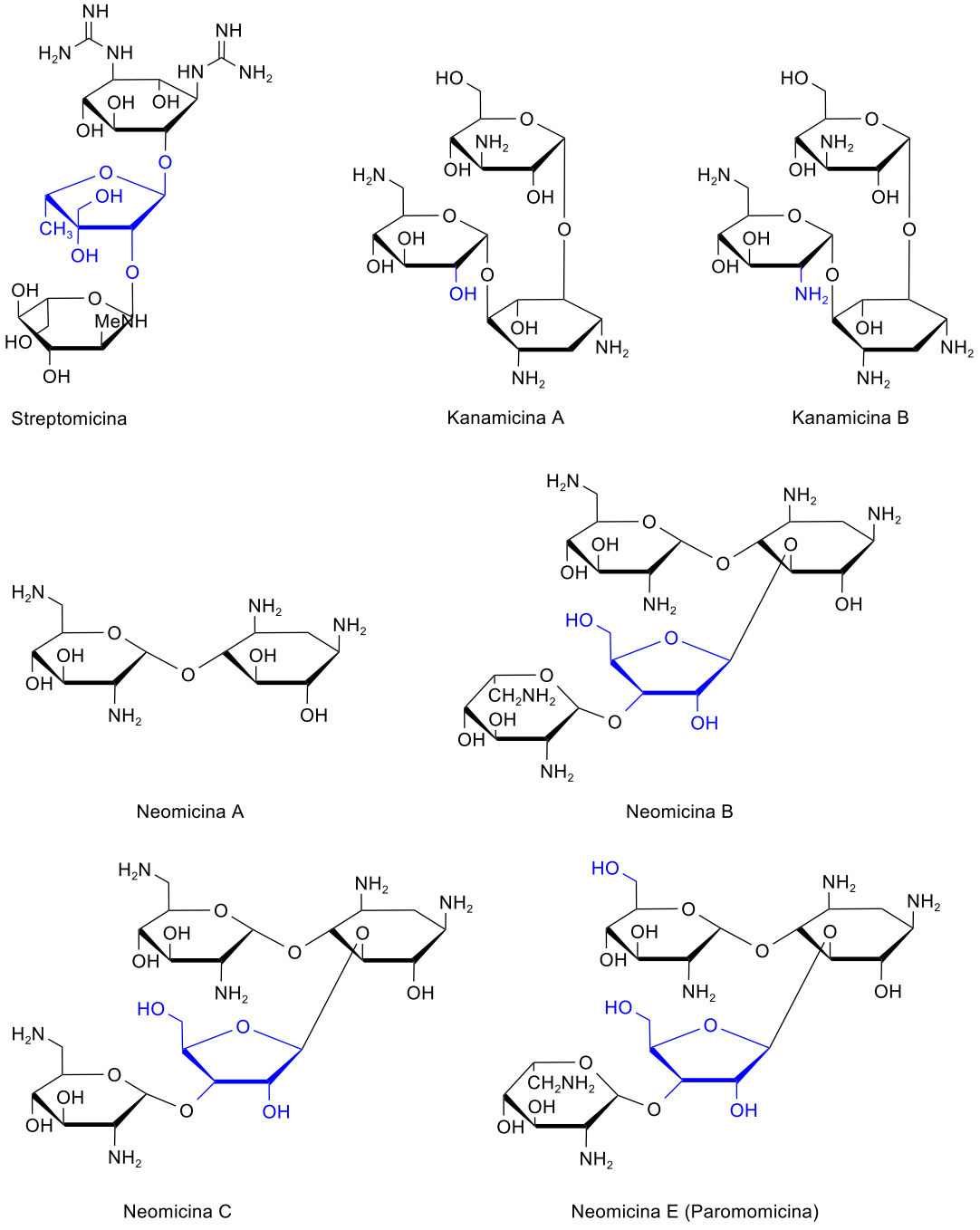


Figura 6.2. Formulele de structură a unor aminoglicozide

Mecanismul de acțiune a aminoglicozidelor se desfășoară în general în trei etape (Fig. A.6.2). Aminoglicozidele sunt protonate la pH-ul fiziologic și există sub formă de policationi. Administrarea aminoglicozidelor împreună cu *β*-lactame inhibă biosinteza stratului peptidoglicanic, facilitând penetrarea peretelui celular.

Bacteriile dezvoltă mecanisme de rezistență față de aminoglicozide (Fig. A.6.3): mutații la nivelul ribozomilor, metilarea subunității 30S, pompe de eflux, inactivarea enzimatică a aminoglicozidelor.

Inactivarea enzimatică a aminoglicozidelor. Unele enzime modifică chimic aminoglicozidele, ceea ce diminuează substanțial afinitatea lor față de subunitățile 16S. Aceste enzime se clasifică în trei clase: *acetiltransferaze* (Fig. A.6.4), *fosfotransferaze* și *nucleotidiltransferaze* sau *adenoziltransferaze*. Inactivarea kanamicinei A de aceste enzime este reprezentată în figura A.6.5. Acetiltransferazele acetilează grupele amino C_1 și C_3 ale fragmentului deoxistreptaminic și $C_{2'}$ și $C_{6'}$ ale fragmentului 2,6-dideoxi-2,6-diaminoglucozidic. Fosfotransferazele microorganismelor patogene fosforilează în special poziția $C_{3'}$. Adenoziltransferazele similar celorlalte enzime recționează selectiv cu grupele hidroxil ale aminoglicozidelor. Kanamicina A poate fi adenilată în pozitia $C_{4''}$ a fragmentului 6-deoxi-6-aminoglucozidic, iar streptomicina în poziția $C_{3''}$ a fragmentului *N*-metilglucozaminic și C_6 a fragmentului streptidinic.

6.2. Biosinteza aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei

Streptomicina este obținută prin reacția precursorilor: streptidin-6-fosfatul **(8)**, CDP-*N*-metil-*L*-glucozamina **(14)** și dTDP-*L*-dihidrostreptoza **(19)** (Fig. 6.3) (CDP = citidindifosfat, dTDP = deoxitimidindifosfat). Acești precursori se formează prin trei căi metabolice distincte având ca punct de plecare **glucozo-6-fosfatul**. Biosinteza streptidin-6-fosfatului **(8)** implică mai multe etape. În prima etapă are loc conversia (**8)** la *myo*-inozitol **(3)**. Inițial are loc oxidarea aldehidei (**1a)** la (**1b)** în prezența NAD^+, care prin reciclizare trece în (**1c)** (Fig. 6.4).

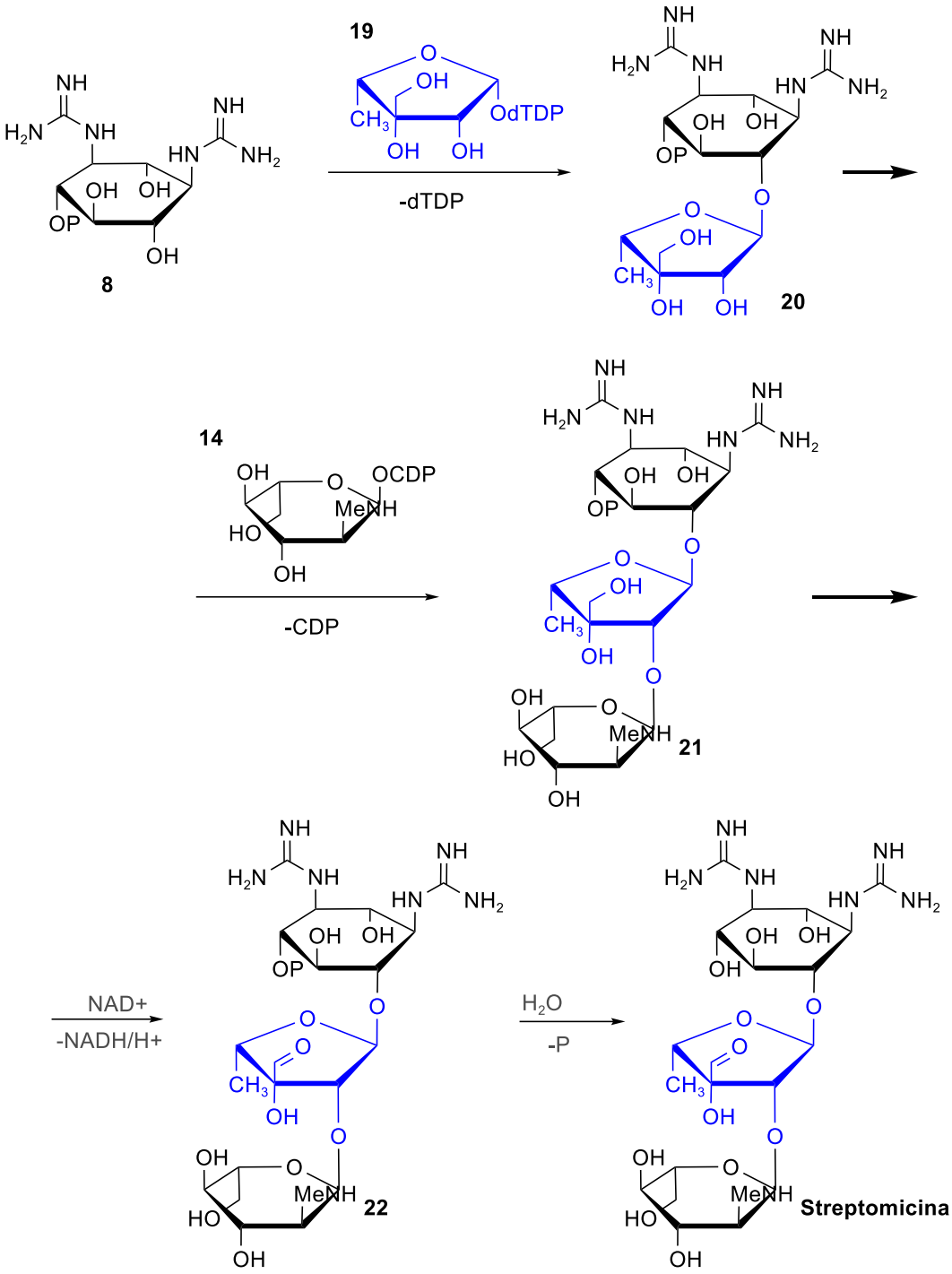


Figura 6.3. Biosinteza streptomicinei

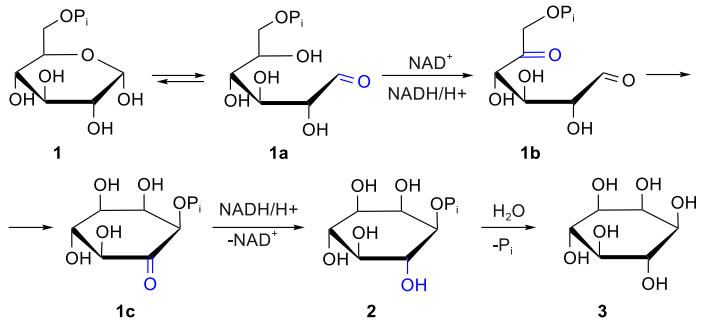


Figura 6.4. Biosinteza *myo*-inozitolului

Prin reducerea **1c** se formează *myo*-inozitol-1-fosfat **(2)** care ulterior hidrolizează la *myo*-inozitol **(3)**. În prezența NAD^+, *myo*-inozitolul este oxidat la *scyllo*-inozoză **(4)**, care prin transaminare cu *L*-glutamina (Gln) formeaza *scyllo*-inozamina **(5)** și, ca produs secundar, acidul *α*-cetoglutaric (KGAM). Reacția de transaminare este reprezentată în figura 6.5.

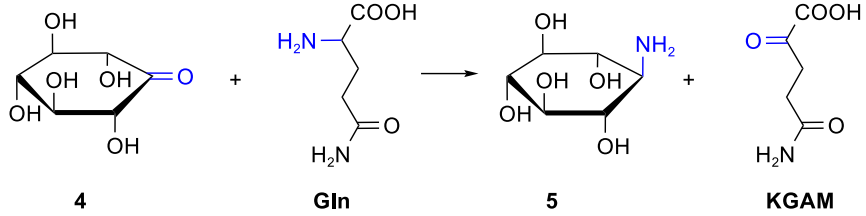


Figura 6.5. Biosinteza *scyllo*-inozaminei

În următoarea etapă *scyllo*-inozamina este fosforilată cu ATP în pozitia C_4. Se formeaza *scyllo*-inozamina-4-fosfatul **(6)**. Prin amidinare succesivă, în prezența argininei (Arg), intermediarul **6** se transformă în amidino-*scyllo*-inozamina-4-fosfat **(7)** (Fig. 6.6). Se observă că în această reacție de amidinotransferare arginina, agentul de amidinare, se transformă în ornitină (**Orn**).

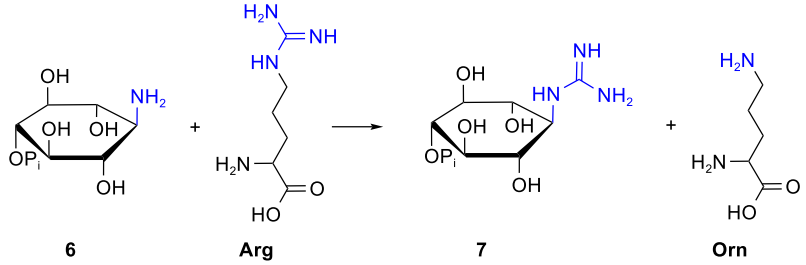


Figura 6.6. Biosinteza amidino-*scyllo*-inozamina-4-fosfatului

Amidino-*scyllo*-inozamina-4-fosfatul **(7)** ulterior trece în **streptidina-6-fosfat (8)**, primul precursor final de biosinteză al streptomicinei.

Biosinteza **precursorului 14**, **CDP-*N*-metil-*L*-glucozaminei**, este inițiată de izomerizarea glucozei-6-fosfat **(1)** în glucoza-1-fosfat **(9)** (Fig. 6.7).

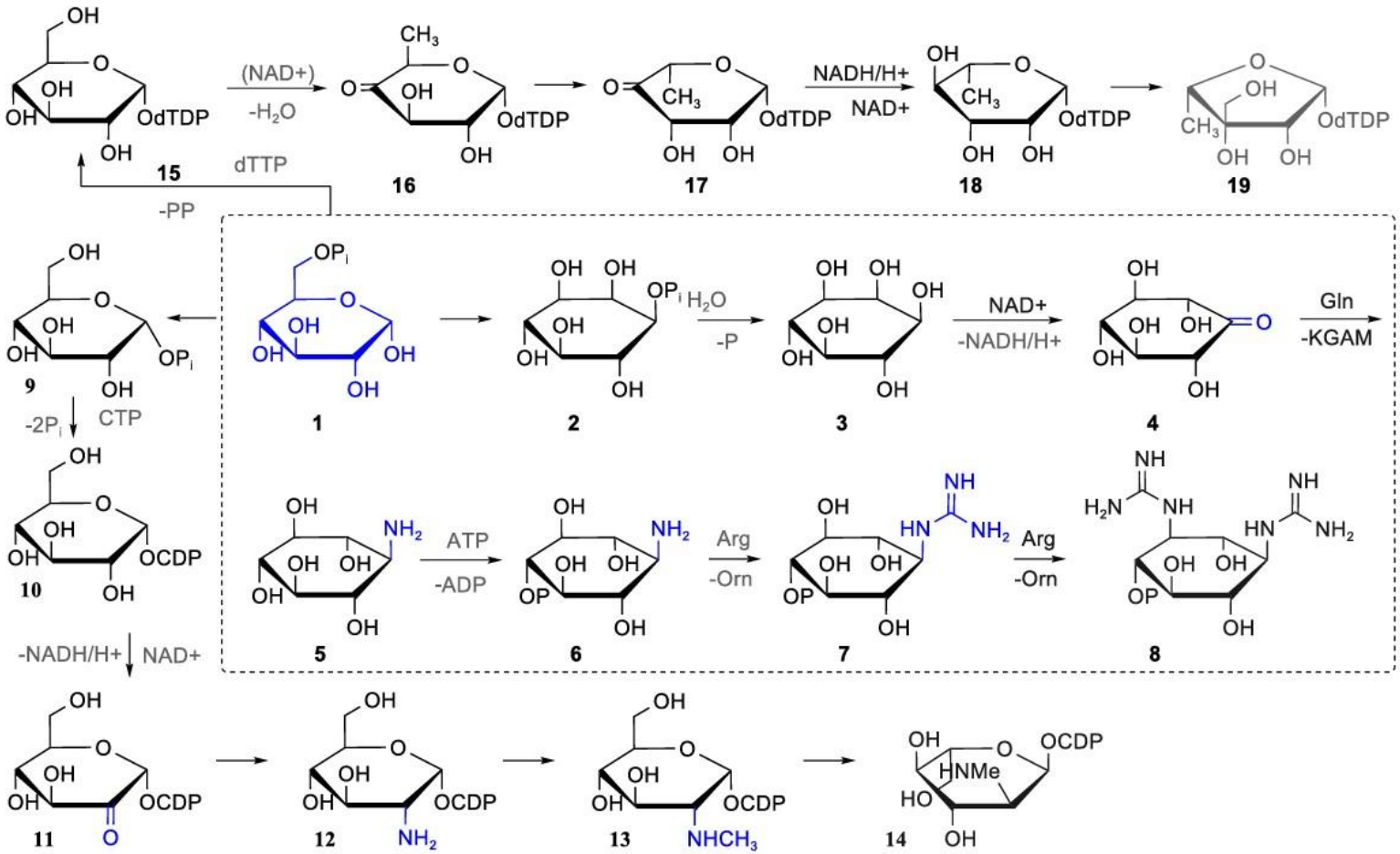


Figura 6.7. Biosinteza precursorilor streptomicinei

Acest intermediar este glicozilat prin reacția cu CTP (citidintrifosfat) la dinucleotida **10**, CDP-*D*-glucoza (Fig. 6.8). Prin reacții de *oxidare* (**11**), *transaminare* (**12**), *metilare* (**13**) și *izomerizare* (**14**), intermediarul 10 se transformă în CDP-*N*-metil-*L*-glucozamină **(14)** (Fig. 6.9).

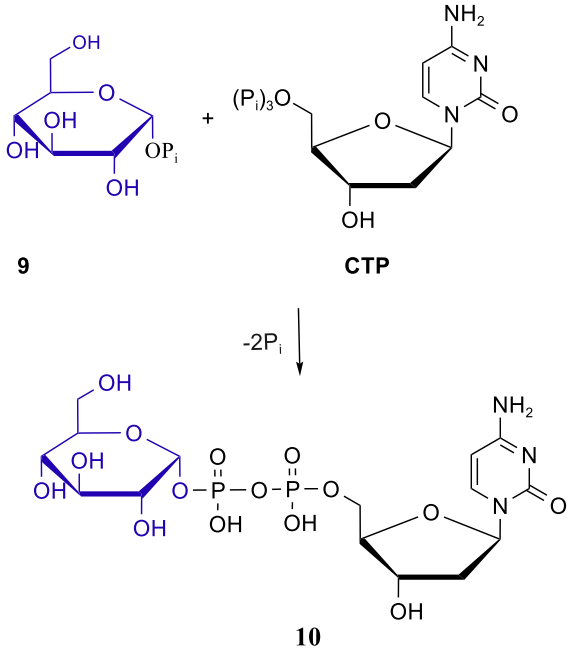


Figura 6.8. Biosinteza CDP-*D*-glucozei

Biosinteza **precursorului 19**, **dTDP-*L*-dihidrostreptozei**, are loc în mai multe etape, la fel din glucoza-1-fosfat (Fig. 6.9). Inițial are loc esterificarea glucozei-1-fosfat cu dTTP, se obține glicozida dTDP-*D*-glucoza, **15**. În prezența NAD^+ are loc oxidarea hidroxilului C_4 cu formarea intermediarului **15a**. Acest derivat se deshidratează în pozitia C_6 și alchena obținută, **15b**, este ulterior redusă la 4-ceto-6-deoxi-dTDP-*D*-glucoza, **16**. În următoarea etapă are loc schimbarea configurației atomilor de carbon, C_3 și C_5; astfel, se formeaza dTDP-4-ceto-*L*-ramnoza, **17**, care ulterior este redusă la dTDP-*L*-ramnoza, **18**. Prin izomerizare intermediarul **18** se transformă în dTDP-*L*-dihidrostreptoza, **19** (Fig. 6.10).

Biosinteza streptomicinei este inițiată de reacția dintre precursorii **8** și **19**. Astfel, se formează O-1,4-*α*-*L*-dihidrostreptozil-(streptidin-6-il)fosfatul, **20** (Fig. 6.11). În urmatoarea etapă acest intermediar reacționează cu precursorul **14** cu formarea dihidrostreptomicinei-6-fosfat, **21**, oxidate ulterior de NAD^+ la streptomicină-6-fosfat, **22**. În acest caz are loc oxidarea grupei $-CH_2OH$ din fragmentul dihidrostreptozilic la aldehidă, -CH=O. În etapa finala are loc hidroliza grupei fosfat din **22** și formarea streptomicinei.

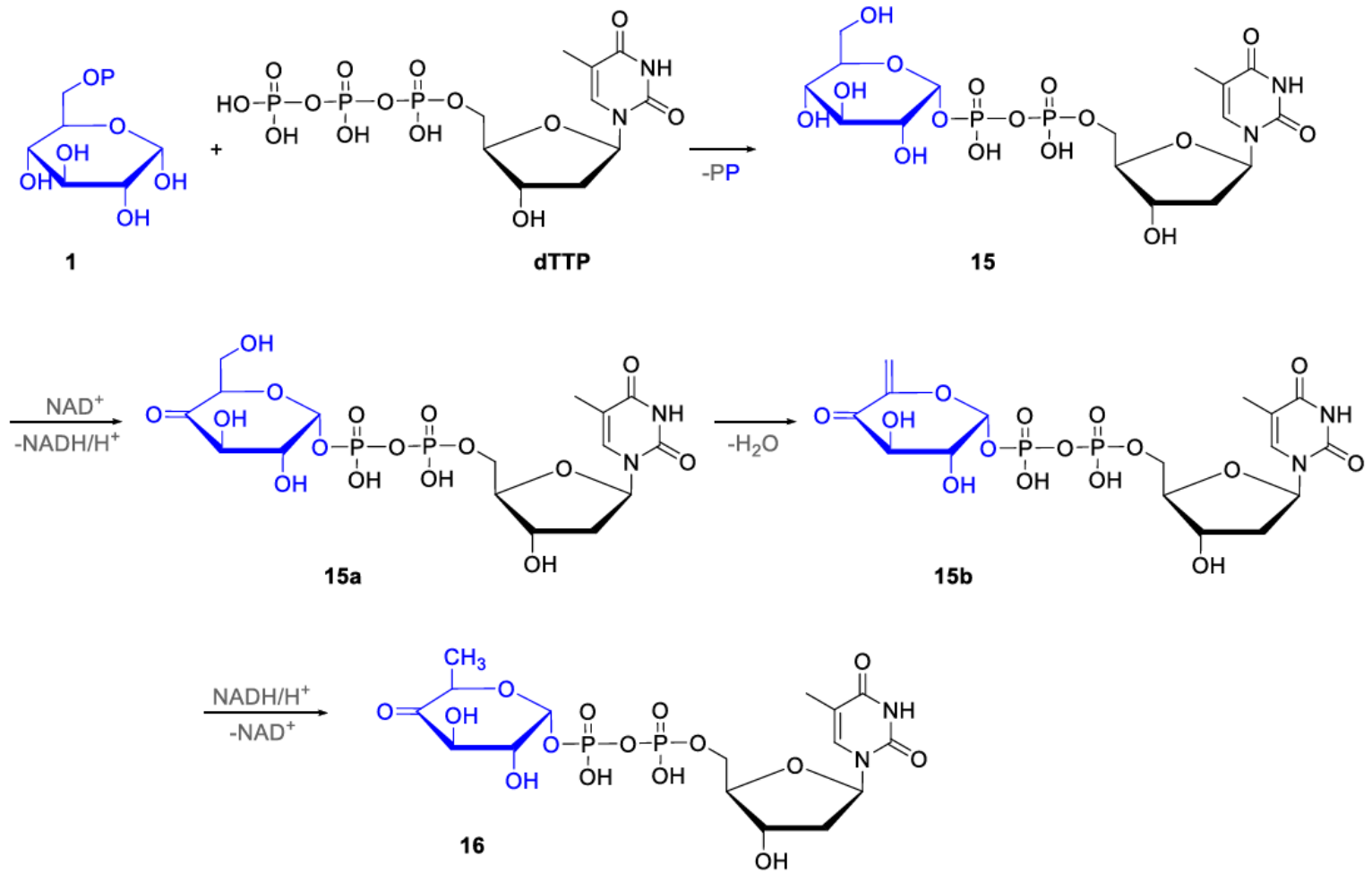


Figura 6.9. Biosinteza 4-ceto-6-deoxi-dTDP-D-glucozei

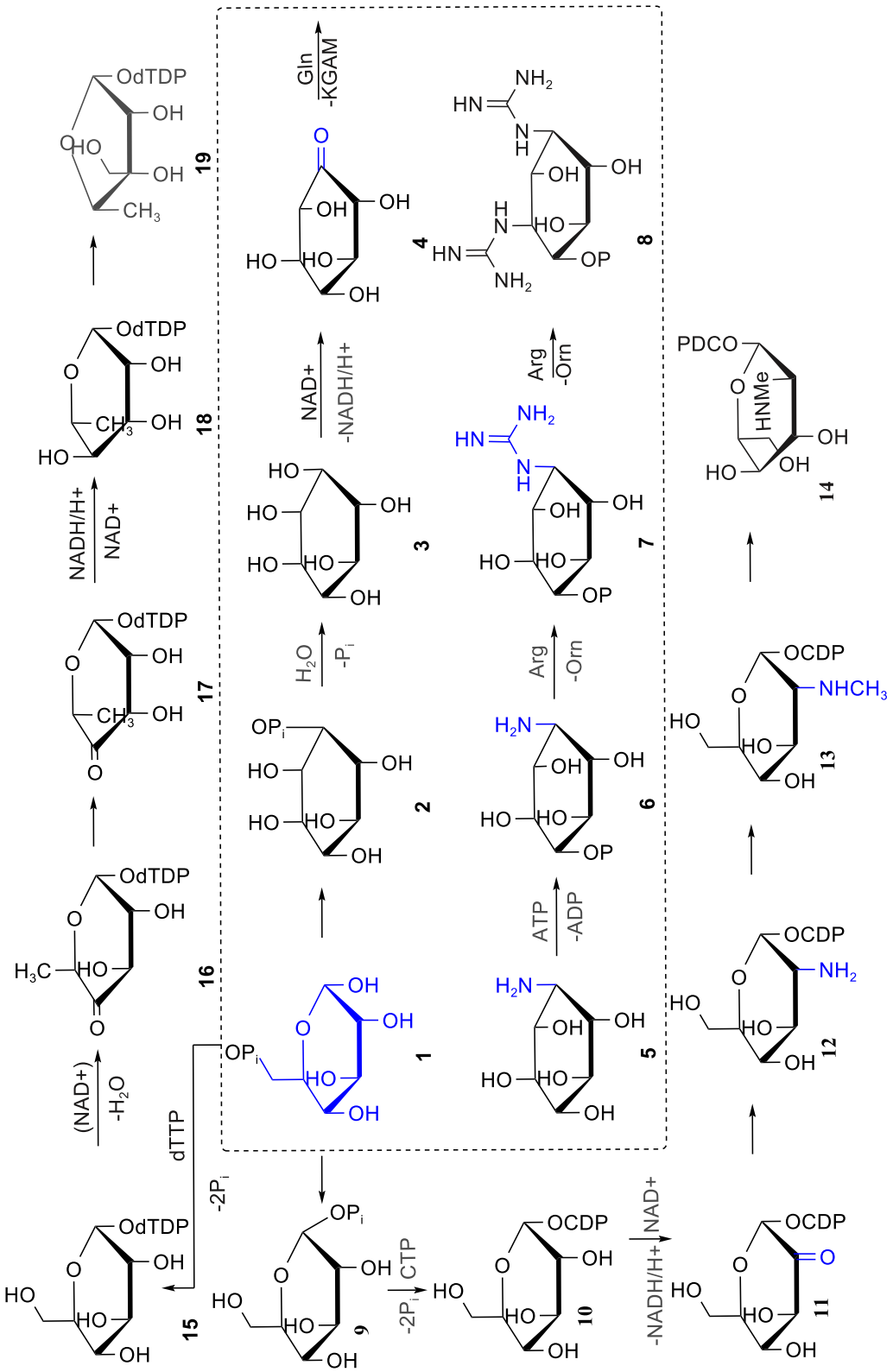


Figura 6.10. Biosinteza precursorilor streptomicinei

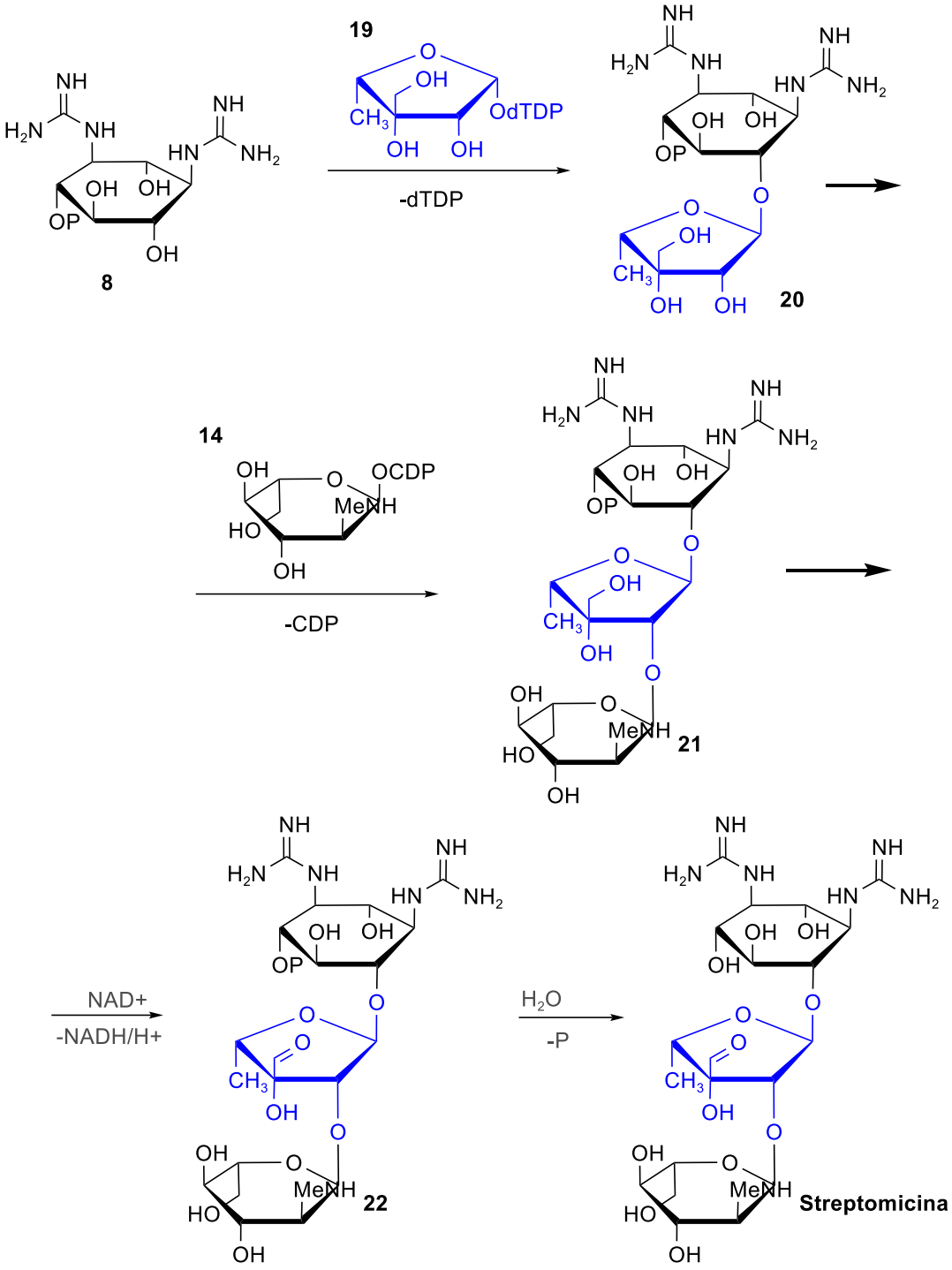


Figura 6.11. Biosinteza streptomicinei

6.3. Procesul biotehnologic de producere a aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei

Producerea biotehnologică a streptomicinei este efectuată în prezența bacteriilor *Streptomices grizeus* (bacterie G(+), aerobă) (Fig. A.6.6). După obținerea *inoculului* **(1)** (Fig. A.6.7) acesta este transferat în *fermentatorul* (150 m^3) **(2),** unde procesul durează 70-120 de ore. În timpul procesului de fermentare se adaugă mediul nutritiv care conține în calitate de sursă de carbon – glucoză, amidon, maltoză sau dextrine, de sursă de azot – făină de soia, extract de carne, săruri de amoniu, minerale – 1-3 g/L clorură de sodiu (la fel pot fi folosiți sulfați, fosfați sau alte cloruri) și microelemente (magneziu, calciu, potasiu, sodiu). În calitate de stimulatori de creștere, la producerea streptomicinei se folosesc *L*-naftalina, acidul acetic și acidul fenilacetic. În plus, pentru accelerarea procesului de producere a streptomicinei se mai pot folosi prolina, uleiurile, acizii grași și unii antioxidanți. Pentru producerea streptomicinei nu sunt necesari precursori. Metabolismul este aerob, viteza de oxigenare constituie 0,5 – 1,0 vvm (volum gaz per volum de bioamestec per minut), pH-ul soluției 6,6-8,0, temperatura procesului de fermentare se menține în intervalul 28-30^{0}C. Compoziția mediului nutritiv pentru procesul de inoculare și fermentare la producerea streptomicinei, în prezența culturilor de *Streptomices grizeus*, este prezentată în tabelul A.6.2. În rezultatul fermentării streptomicina se obține în concentrație de 1,2-2,4 g/L de mediu.

După terminarea procesului de fermentare, înainte de filtrare, mediul de cultură se tratează cu acid oxalic până la pH-ul 3 și se încalzește la temperatura de 70-75^{0}C, timp de 30 min, pentru a coagula substanțele proteice. La acest amestec se adaugă pământ de infuzorii (facilitează filtrarea) și se filtrează prin filtru cu *tambur rotativ* **(3)**. Din soluție, streptomicina este reținută în *coloanele* (**5)** (pline cu cationit cu grupe funcționale carboxilat de sodiu). Viteza de trecere a soluției de streptomicină este de 800-1200 L/h. Schimbul de cationi are loc ca în ecuațiile:

$$Streptomicina - NH_2 + H_2O \rightleftharpoons Streptomicina - NH_3^+OH^- \quad (6.1)$$

$$Cationit - COONa + Streptomicina - NH_3^+OH^- \rightleftharpoons Cationit - COO^-streptomicină - NH_3^+ + NaOH \quad (6.2)$$

Coloana saturată cu streptomicină se scoate din circuit și se spală cu apă distilată, apoi streptomicina se eluează de pe coloană cu soluție de acid sulfuric (5%) adăugat cu un debit de 70 L/oră. Soluția acidă de sulfat de streptomicină este trecută prin prima *coloană* **(6)** ce conține anionit de tip R-NH_2, unde se reține excesul de acid sulfuric, apoi prin a doua *coloană* **(6)** cu cationit sulfonic R-SO_3H, unde se reținn cationii Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} și unele baze organice. Soluția de streptomicină astfel separată ajunge în vasul *colector* (**7)**, unde este decolorată cu

carbune activ (CA) **(8)** apoi filtrată la presiune redusă **(9)** și purificată pe o coloană de anionit, RNH_2, unde se reține anionii. Din vasul *colector* **(11)**, soluția de sulfat de streptomicină se concentrează sub vid în *compartimentul* **(12)** la 40 mmHg și temperatura de 35^0C, până la aproximativ 0,028%. Soluția care a fost concentrată este purificată cu *CA* **(13)** apoi *filtrată* **(14)**, se adaugă antioxidanți, stabilizatori de pH, substanțe antibacteriene și se usucă prin *atomizare* **(18)**. Separarea aerului de pulberea de sulfat de streptomicina are loc în *ciclonul* **(19)**.

Reprezentanți ai aminoglicozidelor

Streptomicina (Fig. 6.12) este izolată din culturile de actinomicete *Streptomyces griseus* (bacterie G(+), aerobă). Streptomicina a fost primul medicament utilizat în tratarea tuberculozei cauzate de *Mycobacterium tuberculosis*. Din cauza proprietăților nefrotoxice, caracteristice aminoglicozidelor, aceasta a fost substituită prin izoniazidă și rifampicină, uneori *D*-cicloserină. Streptomicina are un spectru larg de acțiune antibacteriană. Este activă față de bacteriile G(+) și G(-), precum *staphylococci, streptococci, pneumococci, gonococci, meningococci* etc. Streptomicina este utilizată în tratarea multor maladii, precum endocardite, meningite, infecții ale tractului urinar, infecții gastrice etc.

Analogi comerciali: streptan, streptocol, streptomicină sulfat.

Neomicina este un complex de antibiotice (A, B, C, D, E și F) fiind produsă de actinomicetele *Streptomyces fradiae*. Neomicina A nu are proprietăți antibiotice. Spre deosebire de neomicina A, neomicina B (Fig. 6.12), conține suplimentar două glucide și posedă activitate antibacteriană. Neomicina C se deosebește de neomicina B prin poziția grupei aminometil. Analog steptomicinei, neomicina prezintă un spectru larg de acțiune antibacteriană. Este activă față de bacteriile G(+) și G(-) (*staphylococci, pneumococci, gonococci, meningococci* etc.).

Neomicina este administrată sub formă de sulfat în tratarea comei hepatice, disfuncțiilor neurologice care apar ca rezultat al disfuncției ficatului. În combinație cu sulfatul de polimixina B și hidrocortizonă, neomicina, sub formă de soluție injectabilă, se folosește în tratarea infecțiilor bacteriene ale canalului auditiv extern. La fel în combinație cu sulfatul de polimixina B și dexametazonă, neomicina se utilizează în tratarea infecțiilor oculare și este disponibilă pentru uz local dermic.

Analogi comerciali: framycetin, soframycin, tautomycin etc.

Paromomicina (Fig. 6.12) este izolată din actinomicetele *Streptomyces rimosus*. Acest antibiotic are aceeași utilizare ca și neomicina. Suplimentar este recomandată pentru formele severe și cronice provocate de amibele gastrice, protozoarele parazitare de tipul *Entamoeba histolytica*, care infectează în special intestinul gros.

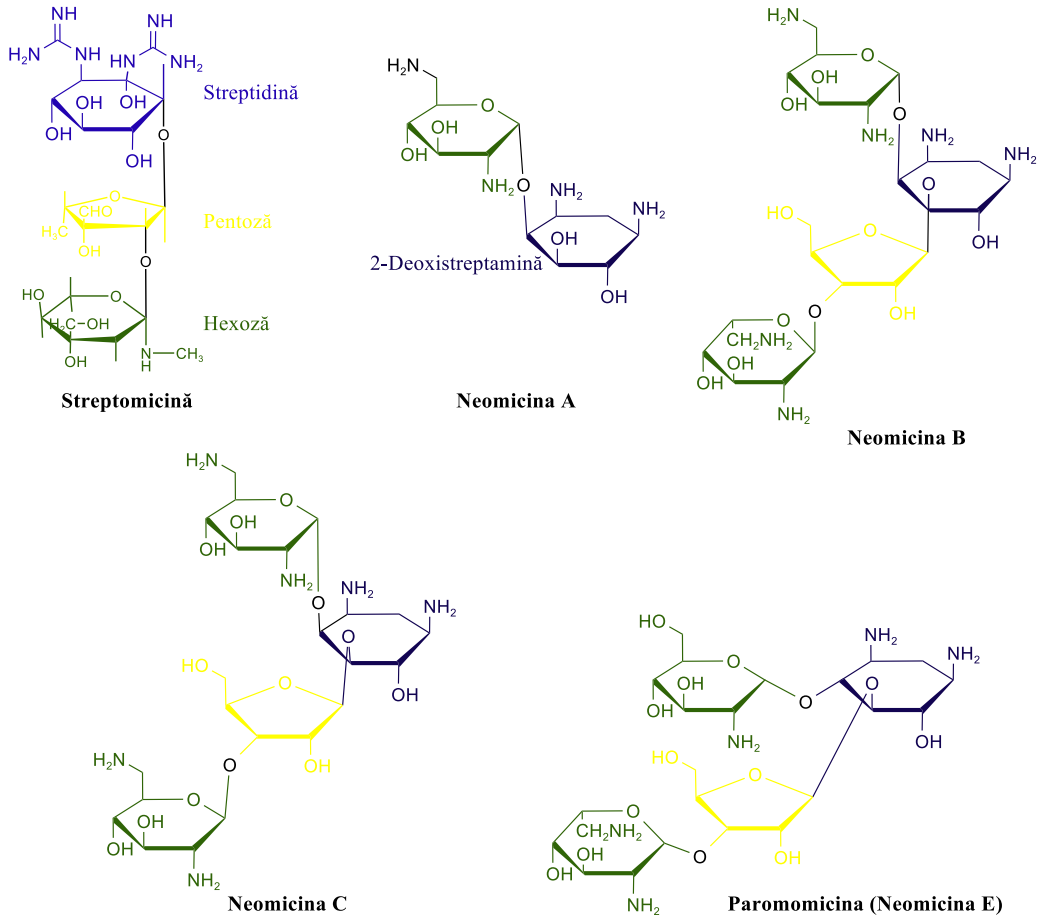


Figura 6.12. Principalii reprezentanți ai aminoglicozidelor obținuți pe cale biotehnologică

Analogi comerciali: Aminosidina, Catenulin, Crestomycin, Hidroximicin, Monomicin etc. Alți analogi comerciali ai aminoglicozidelor: Gentamicina – Gentamcicine, Gentamcicine Shifa, Gentaxyn, GentaCare, Genwell-D, Gentamicine sulfat, Genta-Ject etc.; Kanamicina – Kanamicin, Kanamix, Kanamicină MDKR etc.; Amikacina – Miacin, Amikacin, Biocacin, Amikacin sulfat, Merkacin, Amicacina Teva etc.; Toleramicina – Nebcin, Brulamicin etc.; Netilmicină – Netromycin, Nettacin, Cenet, NetilDex, Nettavisc, XanterNet etc.

Efectele secundare și adverse ale aminoglicozidelor

Cele mai importante efecte adverse ale aminoglicozidelor sunt nefrotoxicitatea şi ototoxicitatea lor. La acestea se adaugă efectul pseudocurarizant (blocaj neuromuscular). Nefrotoxicitatea reversibilă apare la 8-26% dintre pacienții care au primit aminoglicozide mai mult de 5-6 zile. Dozele mai mari și vârsta înaintată cresc riscul de nefrotoxicitate. Principalul motiv pentru care

aminoglicozidele sunt nefrotoxice este acumularea lor în celulele epiteliale ale tubilor renali proximali. Acumularea se face în vacuolele endozomale, lizozomale şi în aparatul Golgi.

Aminoglicozidele cresc acumularea lipidelor polare în lizozomii celulelor tubilor proximali. Ele inhibă o serie de enzime tubulare renale, cum ar fi ATP-aza, fosfolipaza, sfingomielinaza etc. Aminoglicozidele eliberate din lizozomi au diferite efecte adverse intracelulare ce conduc la dereglări grave ale funcţiei celulei tubulare şi în final la moartea acesteia. Ele inhibă transportul Ca^{2+}, respiraţia celulară şi pot forma complexe foarte oxidante cu Fe (Fe II – gentamicina) care pot duce la moartea celulelor.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați aminoglicozidele și prezentați principalele caracteristici structurale, explicând relevanța lor în medicina modernă.
2. Reprezentați formulele de structură a principalelor aminoglicozide și analizați corelația dintre structura chimică și activitatea biologică.
3. Explicați mecanismele de acțiune a aminoglicozidelor asupra bacteriilor, evidențiind impactul asupra sintezei proteice.
4. Prezentați și explicați mecanismul de rezistență a bacteriilor la aminoglicozide.
5. Descrieți și explicați mecanismul de biosinteză a aminoglicozidelor, pe exemplul streptomicinei, integrând ecuațiile corespunzătoare și aspectele de reglementare asociate.
6. Identificați materiile prime utilizate în producerea biotehnologică a aminoglicozidelor și evaluați rolul acestora în obținerea unui proces sustenabil și eficient.
7. Propuneți fluxul tehnologic de producere biotehnologică a aminoglicozidelor.
8. Descrieți etapele și parametrii tehnici în producerea aminoglicozidelor și analizați factorii critici care influențează randamentul.
9. Argumentați importanța respectării condițiilor de mediu (compoziția mediului nutritiv, pH, temperatură, oxigen, viteză de agitare) în producerea biotehnologică a aminoglicozidelor.
10. Propuneți și evaluați metode de separare și purificare a aminoglicozidelor, incluzând analiza critică a avantajelor și limitărilor fiecărei metode.
11. Elaborați strategii de optimizare a procesului biotehnologic de producere a aminoglicozidelor, incluzând utilizarea inovațiilor tehnologice, respectarea reglementărilor de calitate și colaborarea interdisciplinară.

BIBLIOGRAFIE

1. SWAYZE, E.E., GRIFFEY, R.H., BENNETT, C.F. Nucleic Acids (Deoxyribonucleic and Ribonucleic Acid). In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2007, pp. 1037–1052. https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00065-1.
2. KOWALEWSKI, J., TOMASZCZYK, M., GUICHOU, J.F., GELIN, M., LABESSE, G., LIONNE, C. Structural and molecular basis of resistance to aminoglycoside antibiotics by APH(3')-IIb from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *BioRxiv*, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.03.30.646141.
3. DALU, A. Aminoglycosides. Editor(s): Philip Wexler. In: *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition), Elsevier*. 2005, pp. 93-96. ISBN 9780123694003. https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00059-4.
4. PANG, A., GREEN, K., TSODIKOV, O., GARNEAU-TSODIKOVA, S. Chapter Twelve - Discovery and development of inhibitors of acetyltransferase Eis to combat *Mycobacterium tuberculosis*. Editor(s): Matthew Lloyd. In: *Methods in Enzymology, Academic Press*, 2023, 690, pp. 369-396. ISSN 0076-6879. ISBN 9780443158711. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2023.06.017.
5. KRAUSE, K.M., SERIO, A.W., KANE, T.R., CONNOLLY, L.E. Aminoglycosides: An Overview. In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2016, 6(6). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029.
6. GARNEAU-TSODIKOVA, S., LABBY, K.J. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. In: *Medchemcomm*, 2016, 7(1), pp. 11-27. https://doi.org/10.1039/C5MD00344J.
7. JO, J.T., BRINKMAN, F.S., HANCOCK, R.E. Aminoglycoside efflux in Pseudomonas aeruginosa: involvement of novel outer membrane proteins. In: *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(3), pp. 1101-1111. https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1101-1111.2003.
8. SEUPT, A., SCHNIEDERJANS, M., TOMASCH, J., HÄUSSLER, S. Expression of the MexXY aminoglycoside efflux pump and presence of an aminoglycoside modifying enzyme in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates are highly correlated. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020. https://doi.org/10.1128/aac.01166-20.
9. DE GAETANO, G.V., LENTINI, G., FAMÀ, A., COPPOLINO, F., BENINATI, C. Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps. In: *Antibiotics*, 2023, 12, 965. https://doi.org/10.3390/antibiotics12060965.
10. BARBUTO, F.S., CAMMAROTA, M., SCHIRALDI, C., RESTAINO, O.F. Streptomycetes as platform for biotechnological production processes of drugs. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(2), pp. 551-568. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11064-2.
11. SKLENICKA, J., TRAN, T., RAMIREZ, M.S., DONOW, H.M., MAGAÑA, A.J., LAVOI, T., MAMUN, Y., CHAPAGAIN, P., SANTOS, R., PINILLA, C., GIULIANOTTI, M.A., TOLMASKY, M.E. Structure-activity relationship of pyrrolidine pentamine derivatives as inhibitors of the aminoglycoside 6′-N-acetyltransferase type Ib. In: *BioRxiv*, 2024. https://doi.org/10.1101/2024.05.14.594018.

7. BIOTEHNOLOGIA MACROLIDELOR

1. Macrolide: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică
2. Mecanismele de acțiune biologică a macrolidelor. Dezvoltarea rezistenței la macrolide
3. Căile metabolice de biosinteză a macrolidelor
4. Procesul biotehnologic de producere, separare și purificare a macrolidelor
5. Macrolidele polienice

Abilități

Studentul:

- clasifică și caracterizează macrolidele pe baza structurii chimice și a spectrului de acțiune;
- explică mecanismele de acțiune și mecanismele de rezistență la macrolide;
- reprezintă formulele de structură a unor macrolide;
- elaborează și descrie schema generală de biosinteză a macrolidelor;
- descrie și evaluează etapele și parametrii tehnici ai proceselor biotehnologice de producere a macrolidelor naturale și semisintetice, argumentând rolul inovațiilor tehnologice și al digitalizării;
- aplică și compară metode fizice, chimice și fizico-chimice pentru izolarea, purificarea și condiționarea macrolidelor.

7.1. Macrolide: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică

Macrolidele sunt antibiotice care conțin un **macrociclu de tip lactonă** substituit (Fig. 7.1). Prima macrolidă a fost izolată, în 1950, dintr-o tulpină de *Streptomyces* și a fost numită pikromicină datorită gustului său amar (*pikro* înseamnă amar). Principala caracteristică chimică a pikromicinei care este comună tuturor macrolidelor, izolate ulterior, este prezența unui inel lactonic macrociclic din care derivă denumirea macrolidei. Macrolidele sunt clasificate în funcție de dimensiunea inelului lactonic macrociclic ca fiind macrolide ciclice cu 12, 14, 15 sau 16 atomi. Majoritatea macrolidelor conțin aminoglucide și/sau fragmente de hidrat de carbon neutru legate de inelul lactonic printr-o legătură glicozidică. Prezența fragmentelor dimetil amino la resturile de glucide conferă caracter bazic macrolidelor și, respectiv, proprietatea de a forma săruri.

Metimicina produsă de *Streptomyces sp.* este principalul reprezentant al macrolidelor cu 12 atomi de carbon. Eritromicina este cel mai cunoscut reprezentant al grupului cu 14 atomi de carbon și a fost izolată din *Streptomyces*

erythraeus sau *Arthrobacter sp*. Oleandomicina, lankamicina și pikromicină sunt, de asemenea, reprezentanți importanți ai acestui grup.

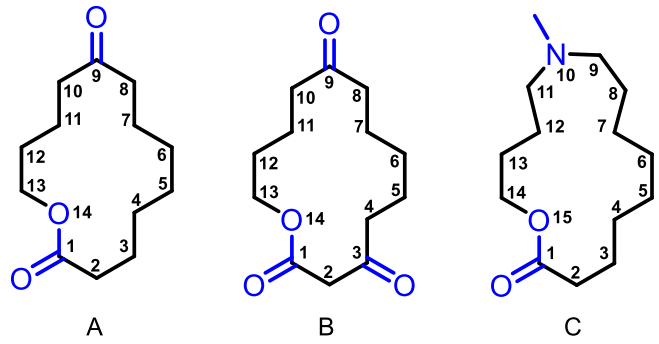


Figura 7.1. Tipuri de macrocicluri din compoziția macrolidelor: lactonic (A), chetolidic (B) și azalidinic (C)

Ultimul grup cuprinde macrolidele cu 16 atomi de carbon, cele mai importante fiind *tilozina, carbomicina* și *nidamicina*. Clasificarea antibioticelor macrolide în funcție de mărimea ciclului lactonic macrociclic este prezentată în figura 7.2. În plus, față de dimensiunea inelului de lactonă, macrolidele variază după numărul și tipul fragmentelor de zaharidă din ciclul lactonic. Macrolidele pot fi clasificate în trei generații (Tab. A.7.1).

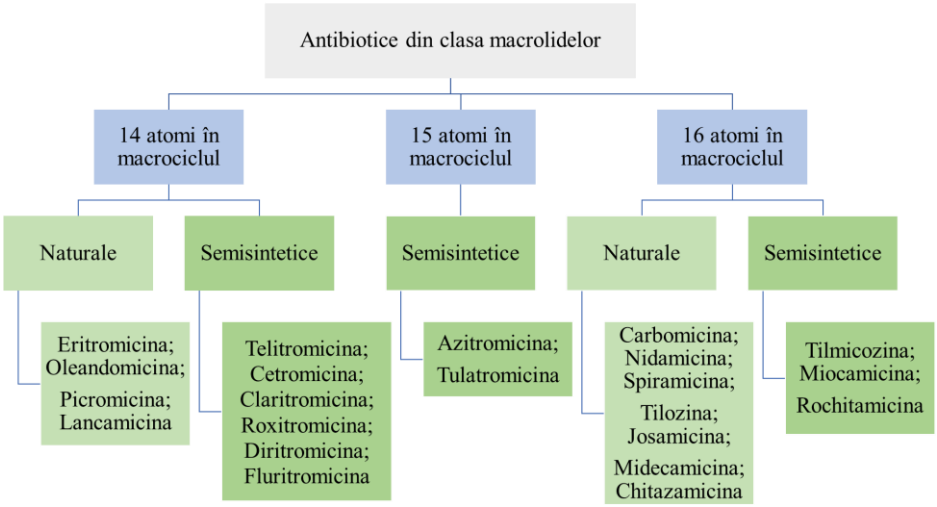


Figura 7.2. Clasificarea antibioticelor macrolide în funcție de mărimea ciclului lactonic

Etromicina și claritromicina conțin un macrociclu lactonic constituit din 14 atomi de carbon. În pozițiile 2, 4, 6, 8, 10 și 12 sunt poziționate șase grupe metil, iar în poziția 13 o grupă etil. În cazul claritromicinei, grupa hidroxil din poziția C_6

este eterificată cu o grupă metil. Ambele antibiotice conțin un carbonil C_9. Macrocilul azitromicinei conține 15 atomi fiind extins cu un atom de azot metilat, grupa carbonil fiind transformată în metilen. Macrolidele conțin în pozițiile C_3 și C_5 două fragmente de deoxiglucide. Diferențele sunt prezentate în figura 7.3.

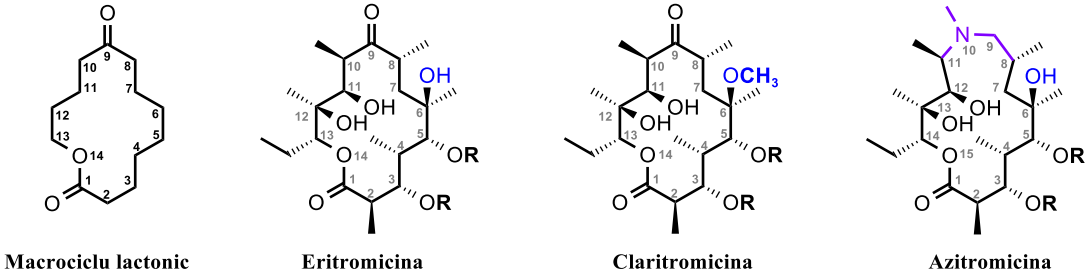


Figura 7.3. Structura macrociclului lactonic al unor macrolide

Proprietăți fizico-chimice ale macrolidelor

Macrolidele sunt molecule insolubile în apă și solubile în alcool etilic. În formă solidă, reprezintă o pudră cristalină de culoare alb-gălbuie. Sunt stabile în soluție apoasă la temperatura camerei. Sunt stabile la pH neutru și instabile în mediu acid și catalizează formarea cetalului ciclic intern, astfel inactivându-se.

Spectrul de acțiune antibacteriană a macrolidelor

7.2. Mecanismele de acțiune biologică a macrolidelor. Dezvoltarea rezistenței la macrolide

Macrolidele sunt antibiotice cu spectru larg, active împotriva bacteriilor G(+) și G(-), inclusiv *stafilococi, streptococi, mycoplasma, chlamydia, shigella* și *salmonella*. Comparativ cu eritromicina, claritromicina este mai activă, iar azitromicina este mai stabilă în mediu acid și eficientă împotriva unor bacterii anaerobe. Telitromicina și cetromicina au un spectru mai larg de acțiune. Cu toate acestea, cetromicina este încă în faza testărilor clinice.

Eritromicina este bacteriostatică, dar poate avea efect bactericid la concentrații specifice. Este eficientă împotriva bacteriilor G(+) (*stafilococi, streptococi, pneumococi*) și a unor G(-) (*gonococi, brucelle, hemofile*). Este utilizată în tratamentul pneumoniei, difteriei, enteritelor, sinusitelor și otitelor. Deoarece este inactivată în mediul acid (Fig. A.7.1), se administrează sub formă de săruri mai stabile (estolat, stearat, etilsuccinat) sau parenteral ca lactobionat. Se metabolizează hepatic și difuzează bine în fluidele organismului, dar limitat în meninge.

Claritromicina este mai stabilă în mediul gastric, fiind activă și împotriva *Mycobacterium leprae* și *Toxoplasma gondii*. Are o bună absorbție tisulară, iar metabolitul său principal, 14-hidroxiclaritromicina, are proprietăți antibacteriene.

Azitromicina, prototipul azalidelor, are o eliminare crescută prin salivă, atinge concentrații ridicate în gingii și se eliberează lent din țesuturi, permițând administrarea unei singure doze zilnice. Nu este inactivată de enzimele dependente de citocromul P_{450}.

Macrolidele mai noi (azitromicina, claritromicina, roxitromicina) sunt eficiente împotriva *Campylobacter pylori* și *Haemophilus influenzae*.

Macrolidele blochează procesul de biosinteză proteică (Fig. A.7.2), prin legarea de subunitatea 50S a ribozomilor bacterieni, la nivelul compartimentului peptidil (Fig. A.7.2A). Acest fapt interferează procesul de translocație, deplasarea ribosomului spre următorul codon și, în final, elongarea proteică. Astfel, sinteza proteinelor dependente de ARN este suprimată, iar creșterea bacteriană este inhibată. Macrolidele nu se leagă de ribosomii mamiferelor, ceea ce explică toxicitatea selectivă a acestora. Actualmente macrolidele sunt considerate cele mai inofensive antibiotice. Acestea reprezintă o alternativă în tratamentul pacienților care prezintă reacții alergice față de peniciline. Macrolidele pot fi bacteriostatice sau bactericide în funcție de concentrație, sensibilitate și viteza de creștere a microorganismelor. Activitatea antibacteriană a macrolidelor depinde de pH-ul mediului. Activitatea antibacteriană înaltă este observată în mediu neutru și bazic. Eritromicina este inactivată în mediul acid al sucului gastric. Structura chimică a chetolidelor le conferă o afinitate mai importantă față de ARN-ul ribozomal decât celelalte macrolide. Ca rezultat, telitromicina are o potență crescută, un risc mai scăzut de inducere a rezistenței bacteriene și o activitate crescută împotriva microorganismelor rezistente la celelalte macrolide.

Antibioticele macrolide prezintă de asemenea o activitate antiinflamatoare. Ele previn producerea de mediatori proinflamatori și citokine, precum și inhibă migrarea neutrofilelor către locurile de inflamare. Roxitromicina are proprietăți antiinflamatoare mai puternice decât claritromicina și azitromicina.

Totodată, macrolidele pot preveni formarea biofilmului bacterian, reduc formarea radicalilor liberi, favorizează apoptoza neutrofilelor, micșorează secreția mucusului, îmbunătățesc sau reduc activarea sistemului imunitar.

Rezistența bacteriilor la eritromicină poate fi explicată prin mai multe mecanisme (Fig. A.7.2B): *rezistența cromozomică, plasmidică, prin eflux și permeabilitatea membranară joasă*. Rezistența cromozomială este mai rară și se explică prin biosinteza ribosomilor cu afinitate joasă față de macrolide. Rezistența plasmidică presupune două mecanisme: producerea de esteraze și metilarea subunității ribosomale 50S. În primul caz, bacteriile produc *eritromicin esteraze*, care hidrolizează grupa ester a macrolidei (Fig. A.7.3), ceea ce diminuează activitatea acestora. Acest tip de rezistență a fost descris pentru *Escherichia coli* și

Pseudomonas aeruginosa. Metilarea subunității ribosomale 50S creează un impediment steric, ceea ce face dificilă legarea macrolidei de ribosom. Acest tip de rezistență a fost observat la *Staphyloccoci* și *Streptoccoci*. Înlăturarea macrolidelor prin eflux este mai frecvent observată la *Streptococcus pyogens, S. pneumoniae, S. aures*. Bacteriile G(-) *Enterobacteriaceae* prezintă o permeabilitate membranară externă joasă față de eritromicină; prin urmare, ele nu sunt sensibile la acest antibiotic.

7.3. Căile metabolice de biosinteză a macrolidelor

Biosinteza macrolidelor naturale

Macrolidele se formează prin condensarea *propionil-SCoA* cu *S-metilmalonil-SCoA* în mai multe etape (Fig. A.7.4). Procesul de policondensare a acestor doi precursori are loc în prezența enzimei *carboxilaza*. Propionil-SCoA se formează fie din *β*-oxidarea acizilor grași, fie direct din acidul propionic prezent în bioamestec. *S*-metilmalonil-SCoA rezultă în două etape de biosinteză din succinil-SCoA format în cadrul ciclului Krebs. Inițial are loc *izomerizarea* succinil-SCoA în stereoizomerul *R*-metilmalonil-SCoA în prezența enzimei *mutaza*. Schimbarea configurației atomului de carbon și formarea izomerului *S*-metimalonil-SCoA este catalizată de *epimeraza*.

Inițial, prin condensarea propionil-SCoA cu *S*-metilmalonil-ScoA, se formează *2-metil-3-oxopentil-SCoA* (Fig. A.7.5). Acest precursor, prin condensare succesivă, formează o policetonă ce conține 15 atomi de carbon. Ulterior, toate grupele ceto, cu excepția carbonilului C_9, sunt reduse în prezența nicotinamid adenin dinucleotid fosfatului (NADPH). Hidroxicetona formată în următoarea etapă ciclizează prin eliminarea unei molecule de HSCoA, în *deoxieritronolida B,* un ciclu lactonic (ester ciclic) ce conține 14 atomi de carbon. În procesul de esterificare participă hidroxilul marginal, C_{13}. Odată formată, deoxieritronolida B inițial este hidroxilată enzimatic în poziția C_6 cu formarea *eritronolidei B* (Fig. A.7.6). În următoarele etape are loc eterificarea enzimatică succesivă a grupelor hidroxil C_3 și C_5 cu *L*-micarocă și *D*-dezozamină cu formarea *L-micarozil-eritronolidei B* și a *eritromicinei D*. Eritromicina D se transformă în *eritromicina C* prin hidroxilarea enzimatică a atomului de carbon C_{12}. În etapa finală, prin metilarea hidroxilului C_3 din fragmentul micarozilic, se formează *eritromicina A*. Alchilarea are loc în prezența *adenozil-L-metioninei*. Ecuațiile proceselor de eterificare și alchilare sunt prezentate în figura A.7.7.

7.4. Procesul biotehnologic de producere, separare și purificare a macrolidelor

Procesul biotehnologic de producere a macrolidelor constă din următoarele etape: creșterea biomasei (inocul), fermentarea, separarea și purificarea. Separarea și purificarea pot varia în funcție de proces.

Inițial se prepară inoculul de bacteria *Saccharopolyspora erythreus*, o specie de tip *actinomycete* (Fig. A.7.8) în bioreactorul (**1**), care este ulterior transferat în fermentătorul cu capacitatea mai mare de 120 m^3 (**2**). Procesul de fermentare este aerob și are loc la temperatura de 30-33^{0}C. Mediul de fermentare conține amidon de porumb, dextrine, glucoză, făină de soia, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$. Carbonatul de calciu se adaugă pentru menținerea pH-ului în intervalul 6,8-7,0. În timpul procesului de fermentare se barbotează aer și se adaugă, la anumite intervale de timp, mediu nutritiv care conține și *0,2-0,5% acid propanoic*, precursor de biosinteză. Procesul durează 70-120 de ore. Concentrația eritromicinei ajunge până la 10 g/L după 72 de ore de fermentare. În timpul procesului se monitorizează concentrația glucozei.

După terminarea procesului de fermentare bioamestecul se tratează cu bromura de cetil-piridină și electroliți (NaCl, $CaCl_2$) pentru a precipita proteinele solubile (pH 9,6). Miceliul și proteinele coagulate se pompează cu pompa **(3)**, se filtrează în **(4)** și filtratul se depozitează în unitatea **(5)**. În următoarea etapă, la un pH 9-10, eritromicina se extrage **(6)** cu acetat de butil. Din fazele organice, eritromicina se extrage rapid în extractoare centrifugale **(7)** cu soluție apoasă de KH_2PO_4 la pH 4. Fracțiile apoase se alcalinizează (pH 10) și se extrag imediat **(8)** la temperatura 0-10 ^{0}C cu diclorometan. În unitatea **(9)** fracțiile organice se evaporă la temperatura 30-40 ^{0}C și presiunea 0,4 atm. Prin răcirea concentratului organic la temperatura de (-10) ^{0}C, eritromicina cristalizată se filtrează **(10)**.

Pe altă cale (Fig. A.7.8A) după extracția cu soluție apoasă de KH_2PO_4, eritromicina poate fi precipitată prin alcalinizarea soluției la un pH 11 **(11)**, filtrată **(10)** și recristalizată **(12)** din amestec de acetonă-apă sau eter de petrol. Un alt proces (Fig. A.7.8B) implică purificarea cromatografică **(13)** după extracția cu acetat de butil **(6)**, urmată de recristalizare și filtrarea eritromicinei **(12)**.

Producerea macrolidelor de semisinteză

Claritromicina, sinonim biaxin, este un analog semisintetic al eritromicinei A, în care grupa hidroxil din poziția C_6 a fost substituită prin grupa metoxi. Claritromicina, spre deosebire de eritromicină, prezintă o absorbție mai mare și un grad de iritare mai mic al tractului gastrointestinal. Claritromicina este de 2-4 ori mai activă decât eritromicina față de unii *streptococci* și *staphylococci*. Claritromicina este utilizată pentru tratarea bronșitelor, pneumoniei, infecțiilor

dermice și sexuale. În cazul pacienților care prezintă o hipersensibilitate la peniciline, claritromicina reprezintă un medicament alternativ în tratarea otitelor acute cauzate de *H. influenzae, M. catarrhalis* sau *S. pneumoniae*. Claritromicina se obține prin mai multe etape de sinteză din eritromicina A. Randamentul global constituie 30%: din 3 kg de eritromicină A se obține 1 kg de claritromicină.

Azitromicina este un antibiotic de semisinteză. Este de 2-4 ori mai puțin activă decât eritromicina față de unii *streptococci* și *staphylococci*. Totuși, spre deosebire de celelalte macrolide, azitromicina este mai activă față de unele bacterii anaerobe. Azitromicina este utilizată în tratarea bronșitelor de origine bacteriană, pneumoniei, afecțiunilor dermice și infecțiilor sexual transmisibile. Analog comercial: *zithromax*. Azitromicina este indicată în tratarea infecțiilor pulmonare cronice sau acute provocate de *Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis* sau de *Streptococcus pneumoniae,* precum și în tratarea infecțiilor dermice provocate de *Staphylococcus aures, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae,* a uretritelor cauzate de *Chlamydia trachomatis* sau de *Neisseria gonorrhoeae*. Azitromicina de uz pediatric este utilizată în tratarea otitelor, pneumoniei, faringitelor. Analog claritromicinei, azitromicina se obține prin mai multe etape de sinteză din eritromicina A (Fig. A.7.9). Inițial se obține derivatul hidroxilaminic prin condensarea eritromicinei A cu hidroxilamina. În prezența clorurii de tozil, acest derivat, prin transpoziție *Beckmann*, se transformă în amida corespunzătoare, care ulterior este redusă pe un catalizator de Pd-C. Amina obținută este metilată cu aldehidă formică și acid formic (reacția *Eschweiler-Clarke*). Randamentul global de sinteză constituie 40%: din 2,5 kg de eritromicină A rezultă 1 kg de azitromicină.

7.5. Macrolidele polienice

Macrolidele polienice sunt antibiotice produse la fel de bacteriile genului *Streptomyces*. Aceste macrolide au *ciclul lactonic* format din 26-38 atomi de carbon, 3-7 *legături duble conjugate* (regiunea hidrofobă), mai multe grupe *hidroxil* poziționate în sens contrar legăturilor duble (regiunea hidrofilă), un fragment *acetalic* hexaatomic substituit și un fragment aminoglucidic, *micozamină*. Cele mai reprezentative macrolide polienice sunt *natamicina*, *nistatina* și *amfotericina B* (Fig. 7.5). Spre deosebire de celelalte antibiotice, aceste macrolide au ***proprietăți fungistatice***. Nistatina și amfotericina B sunt utilizate în tratarea infecțiilor provocate de fungii patogeni, iar natamicina, numită și *piramicină,* este folosită ca aditiv alimentar în prepararea cașcavalului.

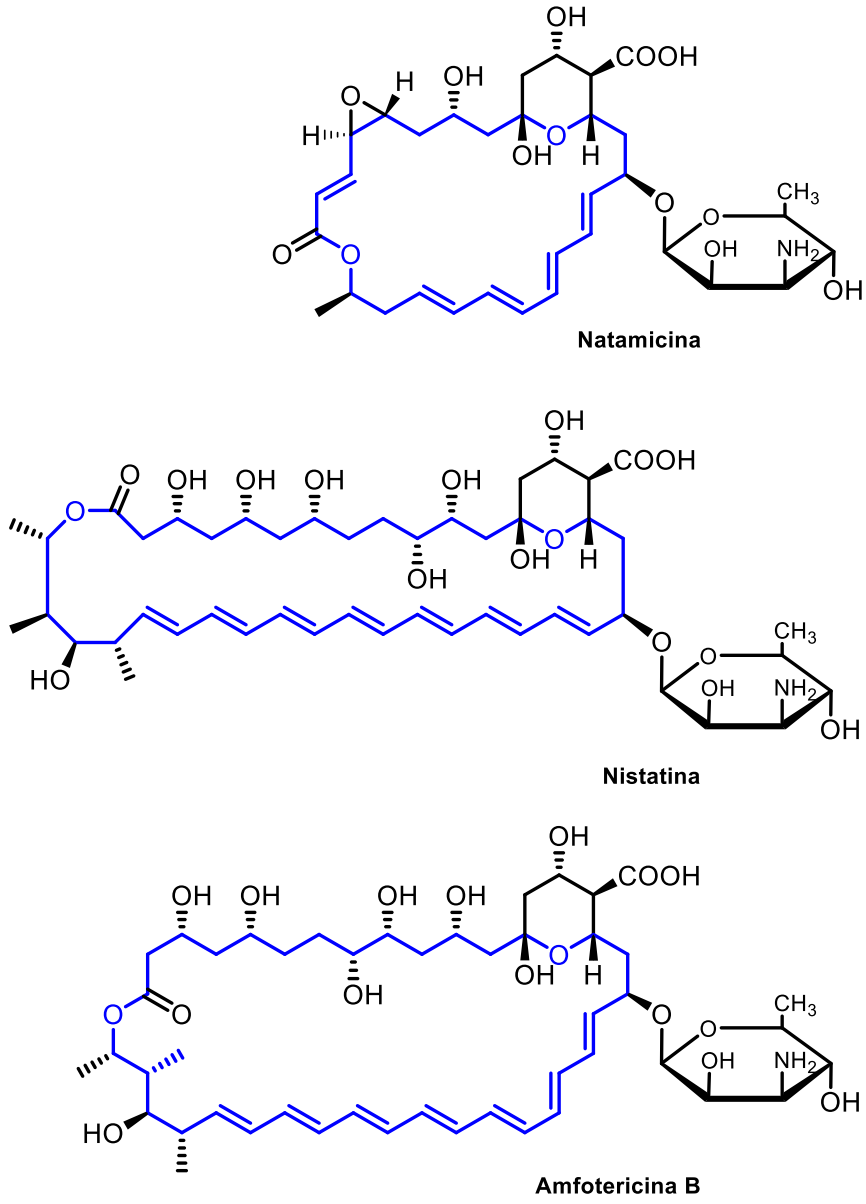


Figura 7.5. Formulele de structură a natamicinei, nistatinei și a amfotericinei B

Mecanismul de acțiune a macrolidelor polienice (Fig. A.7.10) implică interacțiunea acestora cu sterolii din membranele celulelor fungice.

Aceste antibiotice prezintă o afinitate mai mare față de *ergosterol*, sterol tipic al membranelor fungilor decât față de *colesterol*, caracteristic membranelor celulelor mamiferelor, fapt ce explică selectivitatea acestora. Astfel, prin interacțiunea mai multor molecule de macrolide cu ergosterolii se formează *pori transmembranari*. Macrolidele sunt orientate cu partea hidrofobă spre ergosterolii

membranari și, cu partea hidrofilă, spre interiorul porului. Formarea porului este asigurată de interacțiunile hidrofobe și de legături intermoleculare de hidrogen ergosterol-antibiotic. Acest fapt perturbează activitatea membranară, ceea ce permite eliminarea ionilor (Na^+, K^+, Cl^- și H^+) și deci *liza celulară* a fungilor.

Polienele acționează asupra fungilor prin legarea de ergosterolul din membrana celulară, ceea ce duce la formarea unor pori care cresc permeabilitatea membranei și provoacă eliminarea ionilor și a moleculelor esențiale. Această destabilizare a membranei determină moartea celulei fungice prin liza osmotică. Descrierea succintă a mecanismelor de acțiune a polienelor asupra fungilor este prezentată în tabelul A.7.2.

Rezistența fungilor la poliene se poate dezvolta prin modificarea compoziției membranei celulare, cum ar fi reducerea conținutului de ergosterol sau înlocuirea acestuia cu steroli alternativi, diminuând astfel afinitatea polienelor pentru membrană. De asemenea, mecanismele de rezistență includ activarea pompelor de eflux și a sistemelor de protecție celulară împotriva stresului oxidativ indus de poliene. Descrierea succintă a mecanismelor de rezistență a fungilor la poliene este prezentată în tabelul A.7.3.

Amfotericina B (Fig. 7.5) este o macrolidă produsă de *Streptomyces nodosus*. În funcție de concentrație, acest antibiotic poate fi fungiostatic sau fungicid. Amfotericina B nu este foarte selectivă, fiind toxică și pentru celulele mamiferelor. Cu toate acestea, fiind foarte activă, acest antibiotic este utilizat în tratarea micozelor sistemice (candidozelor, criptococcozelor, aspergilozelor, histoplasmozelor, blastomicozelor), candidozelor bucale și digestive.

Nistatina (Fig. 7.5) a fost primul antibiotic antifungic descoperit în anul 1950 ca produs de biosinteză a *Streptomyces noursei*. Prin administrare orală, nistatina este utilizată în tratarea infecțiilor digestive provocate de *Candida*, *Trychosporon*, *Geotrichum*, fiind folosită și în profilaxia chirurgiei digestive. Topic este utilizată pentru profilaxia și tratarea candidozelor dermice și ale membranelor mucoase. Tratamentul îndelungat cu unele antibiotice (peniciline, tetracicline, levomicetina) poate determina apariția candidomicozelor, iar nistatina este folosită pentru profilaxia dezvoltării acestor infecții.

Natamicina (Fig. 7.5) este un macrolid izolat din culturile *Streptomyces natalensis*. Spre deosebire de amfotericina B și nistatină, natamicina are un spectru mai îngust de acțiune. Fiind mai puțin toxică decât celelalte macrolide, natamicina este utilizată în tratarea infecțiilor oculare.

Biotehnologia de producere, separare și purificare a nistatinei

Producerea nistatinei, o macrolidă polienică, antifungică, implică o serie de procese biotehnologice. Aceste procese includ fermentarea în prezența

Streptomyces noursei, separarea și purificarea. Etapele biotehnologice de producere, separare și purificare a nistatinei sunt prezentate în figura 7.6.

Producerea biotehnologică a nistatinei începe cu prepararea mediul nutritiv pentru inoculare, compoziția căruia este prezentată în tabelul 7.1, apoi se ajustează pH-ul la valoarea 7,0–7,2 cu ajutorul soluției de acid clorhidric. Mediul preparat se sterilizează la 121ºC timp de 15-20 min, se răcește, apoi se inoculează în inoculator **(1)**, unde se adaugă și cultura de *Streptomyces noursei*. Cultura de microorganisme se incubează la temperatura de 28ºC, agitare continuă 150 rpm și aerare 0,9-1,0 vvm timp de 30 de ore, după care inoculul se transferă în fermentatorul **(2)**, unde în prealabil s-a adăugat mediul nutritiv sterilizat. Procesul de fermentare durează între 5 și 7 zile, sub agitare continuă 150 rpm, aerare 1 vvm, pH-ul 7,0-7,2 la temperatura de 28-30ºC. Concentrația glucozei în procesul de fermentare se menține între 1 și 10 g/L, iar saturația cu O_2 în jur de 40%. În timpul fermentării se monitorizează pH-ul, temperatura, saturația cu oxigen, concentrația glucozei și concentrația de nistatină. La finalul procesului de fermentare rezultă 1,8-2,4 g nistatină/L mediu. În următoarea etapă are loc separarea soluției native, în care se conține nistatina și alți metaboliți, de biomasă. Cu ajutorul pompei **(3)**, mediul se pompează spre filtru cu tambur **(4)** pentru filtrare. Soluția nativă se colectează în extractorul **(5),** unde nistatina se extrage cu metanol, care se dozează din **(6)**. Fiind insolubilă în apă, nistatina se extrage în faza organică. Extractul organic cu nistatină se colectează în rezervorul **(7)**, unde este răcită la 0-2ºC timp de 24 de ore. Ulterior extractul se filtrează prin filtrul **(8)** și se trece în echipamentul de concentrare în vid **(9),** unde se îndepărtează solventul la temperatura de sub 45ºC. Reziduul rămas se colectează în rezervorul **(10)**. La reziduul obținut se dozează butanol **(11)** și soluție de NaCl **(12)**, se răcește la 0-2ºC și se lasă timp de 24 de ore. Se îndepărtează faza apoasă inferioară și faza cu butanol superioară. Materialul insolubil de la interfață, care conține cea mai mare parte a nistatinei, se colectează în rezervorul **(13)** și se spală cu soluție salină 0,85% saturată cu butanol **(14)**, pentru a îndepărta pigmenții inerți și apoi cu soluție salină 0,85% **(12)** pentru a îndepărta butanolul și pigmenții rămași.

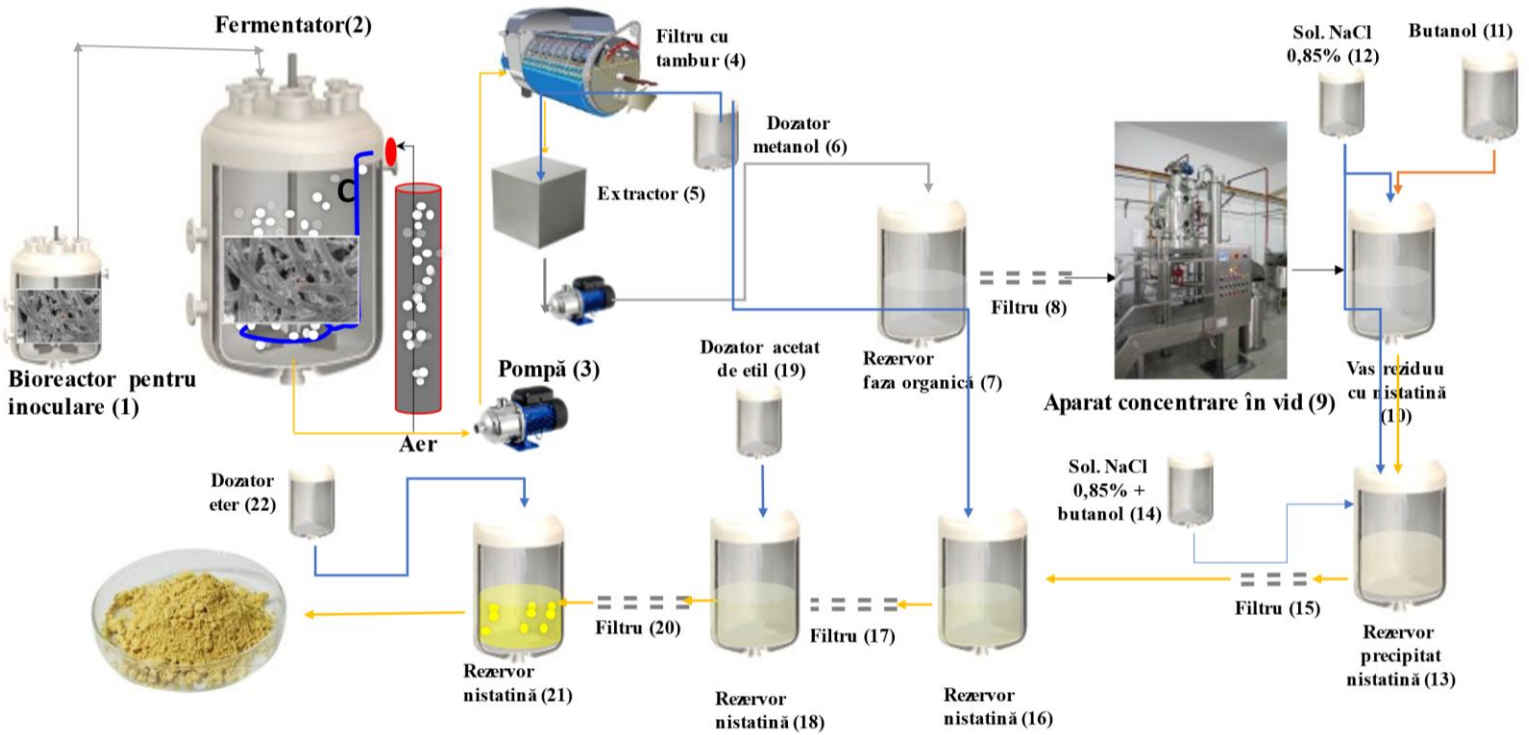


Figura 7.6. Schema biotehnologică de producere, separare și purificare a nistatinei

Bioreactor pentru inoculare (1); fermentator (2); pompă (3); filtru cu tambur (4); extractor (5); dozator pentru metanol (6); rezervor pentru colectarea fazei organice (7); filtru (8); echipament pentru concentrare în vid, pentru îndepărtarea solventului (9); rezervor pentru colectarea reziduului cu nistatină (10); dozator pentru butanol (11); dozator pentru soluție de NaCl (0,85%) (12); rezervor pentru colectarea și spălarea precipitatului de nistatină (13); dozator soluție de NaCl (0,85%) saturată cu butanol (14); filtru (15); rezervor colectare și dizolvare precipitat de nistatină (16); filtru (17); rezervor colectare și reprecipitare nistatină (18); dozator acetat de etil, pentru precipitarea nistatinei (19); filtru (20); rezervor colectare nistatină purificată (21); dozator eter pentru uscarea nistatinei (22).

Tabelul 7.1. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a *nistatinei*

Mediul	Componenți	Conținut,%
de inoculare	Glucoză	1,000
	Triptone	0,500
	K_2HPO_4	0,200
	NaCl	0,200
	Agar	0,100
	$FeSO_4$	0,001
	Apă distilată	98,000
de fermentare	Glucoză	2,000
	Zaharoză	1,000
	Extract de drojdie	1,000
	Peptone	1,000
	Extract de porumb	1,000
	Extract de malț	0,500
	$(NH_4)_2SO_4$	0,500
	K_2HPO_4	0,100
	$CaCO_3$	0,100
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050
	$CaCO_3$	0,020
	Apă distilată	92,730

Reziduul spălat se trece prin filtrul cu membrană **(15)** și se colectează în rezervorul **(16),** unde se dizolvă cu puțin metanol **(6)** la temperatura de până la 55ºC. Extractul limpezit se filtrează prin filtrul **(17)**, se colectează în rezervorul **(18)** și se reprecipită cu acetat de etil dozat din **(19)**. Se răcește la 0-2ºC și se lasă pentru precipitare completă timp de 24 de ore. Precipitatul obținut se filtrează prin filtrul **(20)**, se colectează în rezervorul **(21)** şi se usucă cu eter **(22)**. Produsul uscat reprezintă nistatina, care este de culoare gălbuie.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați macrolidele în baza structurii lor chimice.
2. Prezentați aplicațiile clinice ale macrolidelor în domeniul farmaceutic.
3. Explicați mecanismul de acțiune biologică a macrolidelor.
4. Explicați dezvoltarea rezistenței microorganismelor la macrolide.
5. Scrieți și explicați mecanismul de biosinteză a macrolidelor.
6. Descrieți procesul biotehnologic de producere a macrolidelor, materiile prime și condițiile de fermentare.

BIBLIOGRAFIE

1. FEßLER, A. T., WANG, Y., WU, C., SCHWARZ, S. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. In: *Plasmid*, 2018, 99, pp. 2-10. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.05.001.
2. COENEN, S., FERECH, M., MALHOTRA-KUMAR, S., HENDRICKX, E., SUETENS, C., GOOSSENS, H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient macrolide, lincosamide and streptogramin (MLS) use in Europe. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(2), pp. 418–422. https://doi.org/10.1093/jac/dkl184.
3. OSSET-TRÉNOR, P., PASCUAL-AHUIR, A., PROFT, M. Fungal Drug Response and Antimicrobial Resistance. In: *Journal of Fungi*, 2023, 9(5), 565. https://doi.org/10.3390/jof9050565.
4. RUIZ-BACA, E., ISELA ARREDONDO-SÁNCHEZ, R., CORRAL-PÉREZ, K., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, A., MENESES-MORALES, I., M. AYALA-GARCÍA, V., LILIA MARTÍNEZ-ROCHA, A. Molecular Mechanisms of Resistance to Antifungals in *Candida albicans*. In: *IntechOpen*, 2021. https://doi.org/10.5772/intechopen.96346.
5. FISHER, M.C., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., BERMAN, J. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. In: *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 20, pp. 557–571. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1.
6. BRAUTASET, T., SEKUROVA, O.N., SLETTA, H., ELLINGSEN, T.E., STRØM, A.R., VALLA, S., ZOTCHEV, S.B. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. In: *Chemistry & Biology*, 2000, 7(6), pp. 395–403. https://doi.org/10.1016/s1074-5521(00)00120-4.
7. FJAERVIK, E., ZOTCHEV, S.B. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(4), pp. 436-43. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1802-4.
8. BRAUTASET, T., SLETTA, H., NEDAL, A., BORGOS, S.E.F., DEGNES, K.F., BAKKE, I., ZOTCHEV, S.B. Improved Antifungal Polyene Macrolides via Engineering of the Nystatin Biosynthetic Genes in *Streptomyces noursei*. In: *Chemistry & Biology*, 2008, 15(11), pp. 1198–1206. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.009.

8. BIOTEHNOLOGIA TETRACICLINELOR

1. Structura, clasificarea și activitatea biologică a tetraciclinelor
2. Mecanismul de acțiune și de dezvoltare a rezistenței la tetracicline
3. Biosinteza tetraciclinelor
4. Procesul biotehnologic de producere, separare și purificare a tetraciclinelor
5. Producerea tehnologică a tetraciclinelor de semisinteză

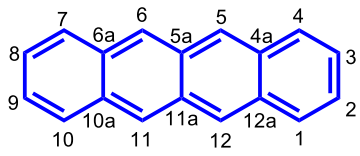
Abilități

Studentul:

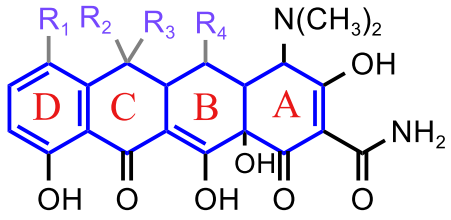
- clasifică tetraciclinele în funcție de generația acestora;
- explică mecanismul general de acțiune a tetraciclinelor;
- explică mecanismele de dezvoltare a rezistenței la tetracicline;
- prezintă mecanismul general de biosinteză a tetraciclinelor;
- descrie etapele și parametrii tehnici ai unui proces biotehnologic de biosinteză a unor tetracicline;
- elaborează fluxul tehnologic de producere biotehnologică a unor tetracicline.

8.1. Structura, clasificarea și activitatea biologică a tetraciclinelor

Tetraciclinele sunt antibiotice cu structură tetraciclică care derivă de la naftacen-carboxamidă. Nucleul tetraciclinic este constituit din patru inele benzenice condensate. Aceste inele sunt etichetate ca inele A, B, C și D, de care sunt atașate diferite grupe funcționale care pot varia în funcție de tetraciclină (Tab. A.8.1). Formula generală a tetraciclinelor este prezentată în figura 8.1.



Naftacen



Formula generală a tetraciclinelor

Figura 8.1. Formula de structură a naftacenului și formula generală de structură a tetraciclinelor

Diferența în activitatea biologică se explică prin tipul substituenților prezenți în fragmentul naftacenic. Primul antibiotic din această serie a fost **clorotetraciclina** izolată din culturile *Streptomyces aureofaciens* și care este utilizată clinic din 1948. Tetraciclinele au un spectru similar de acțiune biologică.

Alte tetracicline descoperite mai târziu sunt la fel produse naturale, izolate din speciile de microorganisme *Streptomyces* sau derivate obținute pe cale semi-sintetică (de exemplu, metaciclină, doxiciclină și minociclină). Cu toate că primele tetracicline au avut un succes considerabil, totuși au fost solicitați alți analogi cu o solubilitate mai mare în apă pentru a îmbunătăți absorbția orală. Aceste abordări au condus la dezvoltarea compușilor semisintetici, de exemplu a rolitetraciclinei și a limeciclinei. În același timp, a fost descoperită o altă grupă de tetracicline semi-sintetice numite glicilcicline, de exemplu: 9-(*N*,*N*-dimetil glicilamido)-6-dimetil-6-deoxitetraciclina, 9-(*N*,*N*-dimetil glicilamido)-minociclina și 9-*terț*-(butil glicilamido)-minociclina. Tetraciclina a declanșat dezvoltarea multor antibiotice modificate chimic și astfel s-a dovedit a fi una dintre cele mai remarcabile descoperiri făcute în domeniul antibioticelor.

Similar altor antibiotice, tetraciclinele sunt molecule chirale. Atomii de carbon asimetrici sunt localizați obligatoriu în pozițiile C_4, C_{4a} și C_{12a} și, în funcție de tipul tetraciclinei, în pozițiile C_5 și C_6 (Fig. 8.2).

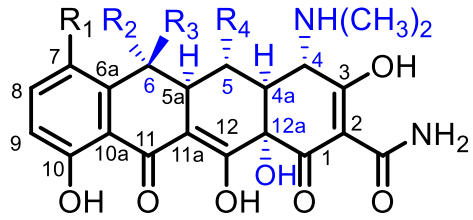


Figura 8.2. Formula generală a tetraciclinelor cu indicarea atomilor de carbon asimetrici

Tetraciclinele care au activitate antibiotică au o grupare dimetilamină la C_4 în inelul A. Modificarea în zona periferică superioară, în special la pozițiile C_7 până la C_9 ale inelului D, a condus la obținerea tetraciclinelor semisintetice, cum ar fi minociclina și doxiciclina. Bioactivitatea, selectivitatea față de ținta biologică și acțiunea antibacteriană, împotriva bacteriilor G(+) și G(-), depinde în mare măsură de modificările în grupările de zonele periferice inferioare și superioare ale scheletului tetraciclinei. O tetraciclină activă care demonstrează activitate antibacteriană trebuie să aibă inelul naftacen DCBA în inelul A, o grupare carbonil C_2 și amido exociclică. Prezența unei grupări amino în poziția C_4 și a tautomerilor cetoenolici în pozițiile C_1 și C_3 ale inelului A este necesară pentru ca tetraciclina să acționeze ca inhibitor al sintezei proteinelor. Prezența grupării amino în poziția C_4 este esențială pentru activitatea antibiotică. Activitatea antibacteriană împotriva bacteriilor G(-) poate fi diminuată prin epimerizarea izomerului 4S natural al grupării C_4-dimetilamino în izomerul 4R. De asemenea, necesită o substructură

C_{10}-fenol și C_{11}-C_{12} ceto-enol în combinație cu o grupare 12a-OH (Fig. 8.2) în regiunea periferică inferioară. Unele modificări cauzează pierderea puterii antibacteriene, cum ar fi modificarea grupei amidă din poziția C_2. Prin modificarea chimică a pozițiilor C_5 - C_9 se obțin diferiți derivați ai tetraciclinelor cu activități antibacteriene variate. Modificarea grupelor R_1, R_2, R_3 oferă o selectivitate mai înaltă a compușilor cu activitate antifungică, dar un efect neînsemnat pentru compușii ce prezintă proprietăți antibacteriene. Inelul D este cel mai flexibil pentru a fi modificat, prezentând activitate antibacteriană. Modificările grupei funcționale în poziția R_4 sunt necesare pentru a obține o specificitate bacteriană înaltă și o schimbare profundă a farmacocineticii. În mod convențional, tetraciclinele sunt clasificate în trei generații (Tab. A.8.2).

Prima generație include tetraciclinele de biosinteză și de semisinteză obținute în perioada anilor 1948-1963. Toate tetraciclinele din aceasta clasă, cu excepția *rolitetraciclinei* și *limeciclinei*, diferă după tipul substituenților în inelul naftacenic. Celelalte diferă prin funcționalizarea grupei carboxamidice. Aceste tetracicline se caracterizează printr-o absorbție scăzută după administrarea orală.

A doua generație include tetracicline de semisinteză, *doxiciclina* și *minociclina,* descoperite în perioada anilor 1965-1972. Aceste antibiotice prezintă o absorbție superioară în comparație cu prima generație și pot fi de asemenea administrate intravenos.

A treia generație include la fel tetracicline de semisinteză, *tigeciclina* și *amadaciclina*, care derivă formal de la minociclină prin funcționalizarea în poziția C_9 cu *terț-butil-glicilamidă* și *neopentil-amino-metil*, corespunzator. Tigeciclina are un spectrul mai larg de acțiune decât tetraciclinele din prima și din a doua generații, fiind disponibilă și în forme injectabile. Amadaciclina a trecut ultima fază a cercetărilor clinice; cu toate acestea, încă nu a fost acceptată ca medicament antibacterian în toate țările. Tetraciclinele din această generație sunt active față de bacteriile rezistente la acțiunea celorlalte tetracicline, *staphylococci* rezistenți la meticilină, *enterococci* rezistenți la vancomicină, *S. pneumoniae* rezistente la penicilină.

8.2. Mecanismul de acțiune și de dezvoltare a rezistenței la tetracicline

Tetraciclinele, analog macrolidelor, exercită acțiune antibiotică prin *blocarea proceselor de biosinteză proteică*. Totuși, spre deosebire de macrolide, tetraciclinele se leagă reversibil de subunitatea 30S a ribozomilor bacterieni. În aceste condiții, aminoacil-ARNt nu se poate lega de subunitatea 30S atașată la ARNm, ceea ce blochează biosinteza proteică (Fig. A.8.1A). Tetraciclinele ajung în celula bacteriană prin difuzie sau prin *porine* în majoritatea cazurilor sub formă de

complecși (TMG(+)) cu ionii de Mg^{2+}, care ulterior blochează biosinteza proteică prin legarea de subunitatea ribozomală 30S. Acest tip de transport este prezent doar la procariote, asigurând acumularea preferențială a tetraciclinelor în celulele bacteriene. Acest fapt explică toxicitatea specifică a tetraciclinelor active față de bacteriile G(+), G(-) aerobe și anaerobe. Bacteriile pot dezvolta rezistență față de tetracicline prin mai multe mecanisme descrise în tabelul A.8.3 și în figura A.8.1B.

În prezența unor enzime produse de bacterii are loc degradarea chimică a tetraciclinelor, rezultând derivați inactivi. Una dintre aceste reacții ar fi hidroxilarea tetraciclinelor în poziția C_{11a} (Fig. 8.3.).

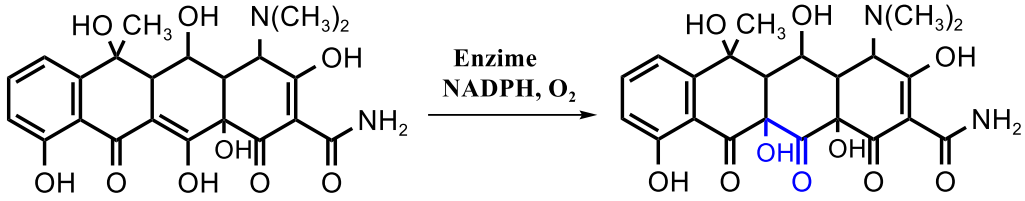


Figura 8.3. Reacția de hidroxilare a tetraciclinelor în poziția C_{11a}, pe exemplul oxitetraciclinei (sub acțiunea tetraciclin destructazelor)

8.3. Biosinteza tetraciclinelor

Tetracicline de biosinteză

Tetraciclinele de biosinteză sunt antibiotice naturale produse de microorganisme din genul *Streptomyces* prin căi metabolice secundare. Printre acestea se numără: clorotetracilcina, demeclociclina, oxitetraciclina, tetraciclina (Fig. 8.4).

Clorotetraciclina (aureomicina) este un antibiotic obținut prin biosinteză de către actinomicetele *Streptomyces aureofaciens*. Acest antibiotic are o acțiune bacteriostatică și este eficient împotriva bacteriilor G(+) (de exemplu, *Staphylococcus* spp., inclusiv cele producătoare de *β*-lactamaze, *Streptococcus* spp., *Pneumococcus* spp.), bacteriilor G(-) (de exemplu, *Neisseria gonorrhoeae*, enterobacterii, *Klebsiella*, *Salmonella, Shigella*), precum și împotriva *Mycoplasma*, *Chlamydia* și *Spirochaeta*.

Totuși, anumite bacterii, precum *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. și *Serratia* spp., sunt rezistente la clorotetraciclină. Clorotetraciclina este utilizată pentru tratamentul diverselor infecții, inclusiv pneumonie, bronșită, angină, colecistită, endocardită, infecții intestinale, sifilis, gonoree, prostatită etc.

Analogi ai clorotetraciclinei: *aureomycin, biomycin, xanthomycin*.

Demeclociclina este un antibiotic obținut dintr-o cultură de *Streptomyces aureofaciens* modificată genetic. Se diferențiază de clorotetraciclină și de alte

tetracicline prin absența grupei metil din poziția C_6. Această modificare conferă demeclociclinei o stabilitate mai mare în condiții acide și alcaline, comparativ cu tetraciclinele care prezintă gruparea metilată în poziția C_6. Spectrul de acțiune a demeclociclinei este similar celorlalte tetracicline, fiind eficientă împotriva unui spectru larg de bacterii G(+) și G(-).

Analogi: *ledermycin, biotetricin, decyclin, declomycin*.

Oxitetraciclina este un antibiotic obținut prin biosinteză de către actinomicetele *Streptomyces rimosus*. Acesta are un spectru de acțiune similar cu cel al clorotetraciclinei, fiind eficient împotriva unui spectru larg de bacterii G(+) și G(-), inclusiv *Mycoplasma pneumoniae, Pasteurella pestis, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Diplococcus pneumoniae, Helicobacter pylori* și altele. Oxitetraciclina este utilizată în tratamentul diverselor infecții bacteriene, precum și în formele severe de acnee agravate de bacteria *Cutibacterium acnes*.

Analogi: *acromycin, bicyclin, cyclopar, sarcocyclin* etc.

Tetraciclina poate fi obținută atât prin biosinteză utilizând *Streptomyces viridifaciens* și *Streptomyces aureofaciens*, cât și semisintetic, prin hidrogenarea clorotetraciclinei pe un catalizator de Pd-C. Este utilizată în tratamentul febrei stâncoase de munte (*Rocky Mountain Fever*), o infecție bacteriană transmisă de căpușe, febrei tifoide și febrei Q (provocată de bacteria *Coxiella burnetii*, care se găsește la bovine, ovine și caprine). Tetraciclina este folosită, de asemenea, în tratarea infecțiilor căilor respiratorii superioare provocate de bacterii tipice, precum *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* și *Moraxella catarrhalis*, dar și a celor atipice, precum *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* și *Legionella pneumophila*. De asemenea, poate fi utilizată în tratamentul acneei.

Analogi: *tetramycin*.

Biosinteza tetraciclinelor

Biosinteza tetraciclinelor implică mai multe etape (Fig. 8.4-8.5). În prima etapă, *acetil-CoA*, obținută prin glicoliză, este carboxilată, formând *malonil-SCoA*, care ulterior este transformată în *amid-malonil-SCoA* în prezența acidului glutamic (Fig. 8.4). Alternativ, *amid-malonil-SCoA* poate fi obținută și din asparagină, printr-un proces în două etape. Un intermediar important, *policetona 3* (policetidă), se formează prin condensarea succesivă a unei molecule de *amid-malonil-SCoA* cu opt molecule de *malonil-SCoA*. *Malonil-SCoA* este sensibilă la ionii de fosfat anorganic, care la concentrații înalte inhibă procesul de biosinteză.

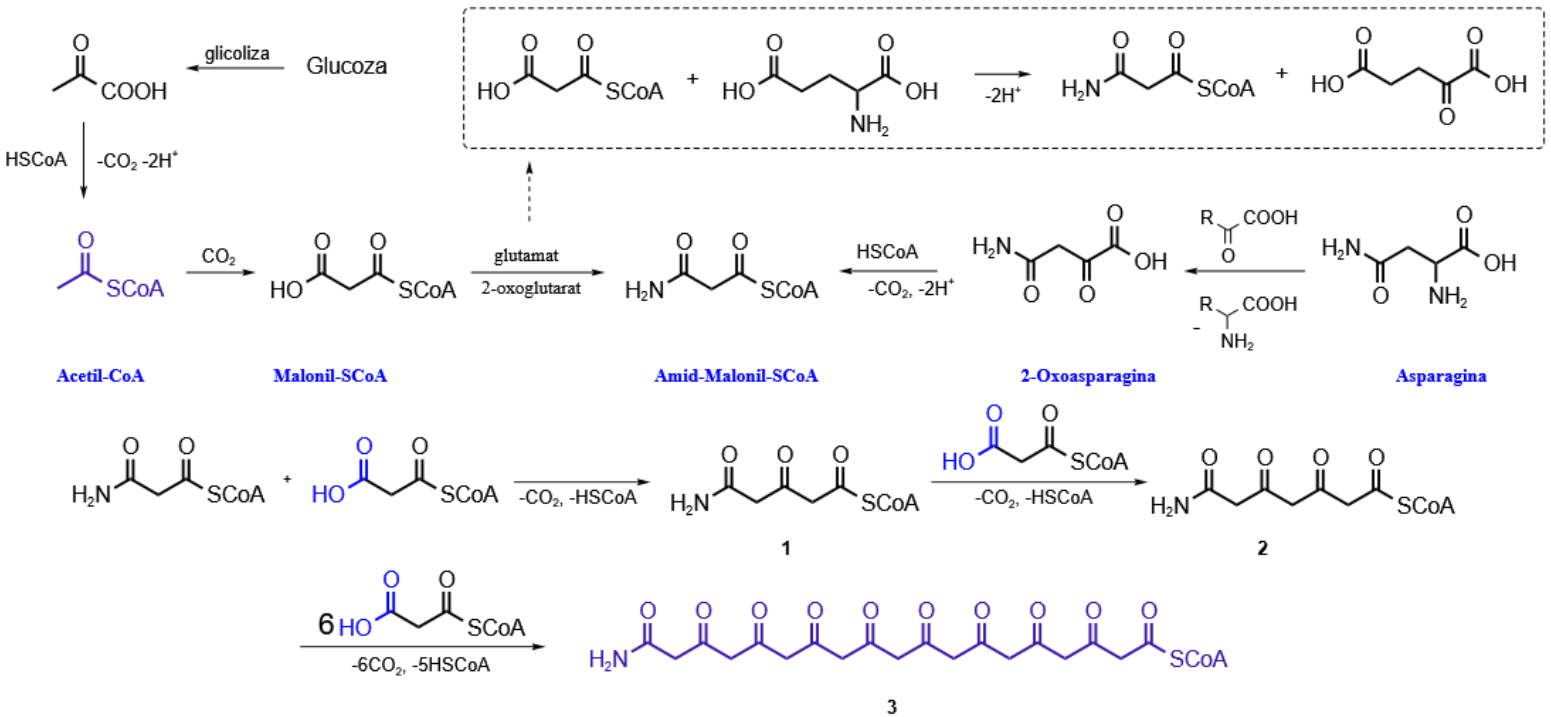


Figura 8.4. Reacțiile de biosinteză a policetidei (policetona) 3

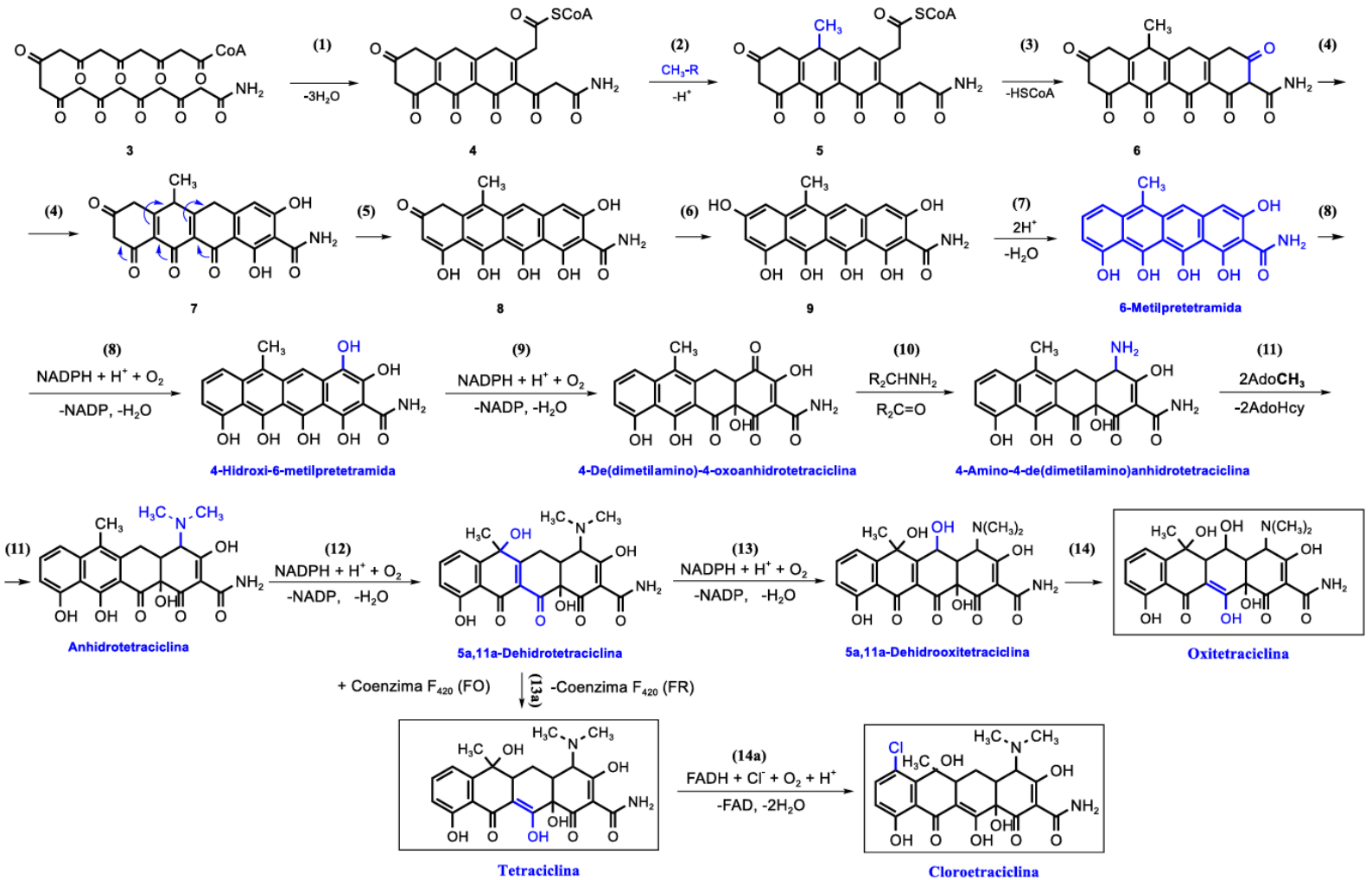


Figura 8.5. Reacțiile de biosinteză a tetraciclinei, clorotetraciclinei și a oxitetraciclinei

Prin șapte etape succesive, policetona 3 se transformă în 6-metilpretetramidă (Fig. 8.5). Mecanismele detaliate ale acestor transformări nu sunt pe deplin elucidate.

Din *6-metilpretetramidă*, prin două oxidări succesive (etapele 8 și 9) în prezența *NADPH*, se formează *4-de(dimetilamino)-4-oxoanhidrotetraciclina*.

Acest precursor, în etapa a 10-a, este aminat în poziția 4, rezultând *4-dimetilamino-4-oxoanhidrotetraciclina*. Alchilarea grupării amino din poziția 4 se realizează cu ajutorul *S-adenozil-L-metioninei* (AdoMet sau AdoCH$_3$) (etapa a 11-a), generând *anhidrotetraciclina* și *adenozil-L-homocisteina* (AdoHcys). Prin două oxidări succesive (etapele 12 și 13) și enolizare (etapa 14), *anhidrotetraciclina* se transformă în *oxitetraciclină*. Un alt intermediar de sinteză, *5a,11a-dehidrotetraciclina,* generat în etapa a 12-a, la fel din *anhidrotetraciclină*, formează *tetraciclina* în prezența *coenzimei 420*. În etapa a 13-a are loc enolizarea grupării carbonil din poziția C$_{12}$, formându-se tetraciclina. Prin reacția *tetraciclinei* cu ionii de clor, în prezența oxigenului și a *flavin-adenin dinucleotidei*, etapa a 14-a, se formează *clorotetraciclina*, cu atomul de clor în poziția C$_7$ a ciclului naftacenic.

Anhidrotetraciclina se formează ca rezultat al interacțiunii 4-amino-4-de(dimetilamino)anhidrotetraciclinei cu două molecule de adenozil-*L*-metionina (Fig. 8.6).

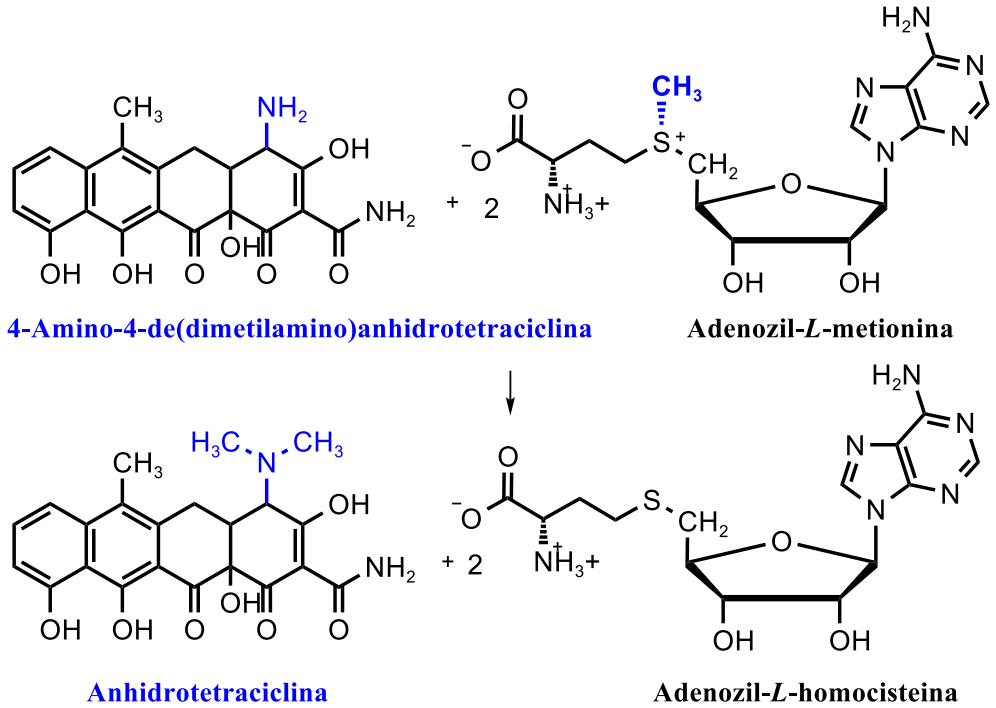


Figura 8.6. Alchilarea 4-amino-4-de(dimetilamino)anhidrotetraciclinei

8.4. Procesul biotehnologic de producere, separare și purificare a tetraciclinelor

Procesul biotehnologic de producere a tetraciclinelor se bazează pe biosinteza acestor antibiotice de către actinomicete, în special *Streptomyces* spp. Aceste microorganisme sunt susceptibile să producă tetracicline printr-un proces complex care implică numeroase etape enzimatice și metabolice. Principalele etape ale procesului de producere a tetraciclinelor sunt: selecția tulpinilor de *Streptomyces*, inocularea, fermentarea, izolarea și purificarea.

Selecția tulpinilor de Streptomyces

Cele mai utilizate tulpini de bacterii pentru producerea tetraciclinelor sunt *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus* și *Streptomyces viridifaciens*. Aceste tulpini sunt selectate pentru abilitatea lor de a sintetiza tetraciclinele în cantități mari. Tulpinile pot fi modificate genetic pentru a îmbunătăți randamentele de producție sau pentru obținerea unor noi antibiotice mai active în raport cu tetraciclinele clasice.

Inocularea

Pentru producerea tetraciclinelor se folosesc streptomicete, bacterii G(+), precum *Streptomyces rimosus* (Fig. A. 8.2a) pentru producerea oxitetraciclinei și *Streptomyces aureofaciens* (Fig. A. 8.2b) pentru obținerea clorotetraciclinei.

Prepararea inoculului durează 24–30 de ore, timp în care bacteria atinge o densitate celulară și o viabilitate necesară pentru a fi transferată în bioreactoarele de producție. Compoziția mediului nutritiv variază în funcție de proces. Una dintre cele mai eficiente compoziții pentru aceste bacterii este prezentată în tabelul A.8.4. Agarul Oxoid este un amestec de polizaharide extrase din algele roșii numite agarofite. Mediul de inoculare este formulat pentru a asigura o creștere rapidă și sănătoasă a bacteriilor *Streptomyces*, pregătindu-l pentru transferul în mediul de fermentare. Mediul de fermentare conține surse de carbon și azot mai complexe pentru stimularea producției de tetracicline.

Fermentarea

Biosinteza tetraciclinelor este un proces aerob realizat în condiții strict controlate, în bioreactoare industriale de dimensiuni mari cuprinse între 80 m^3 și 150 m^3. Schema tehnologică de producere a tetraciclinelor, pe exemplul oxitetraciclinei, este prezentată în figura 8.7. Parametrii proceselor de fermentare pentru diferite tetracicline sunt prezentați în tabelul 8.1. În timpul biosintezei pH-ul variază între 5,8 și 7,0, iar temperatura este de 27,0–28,0ºC. Fermentarea durează de obicei între 5 și 7 zile, în funcție de condițiile și de randamentul scontat.

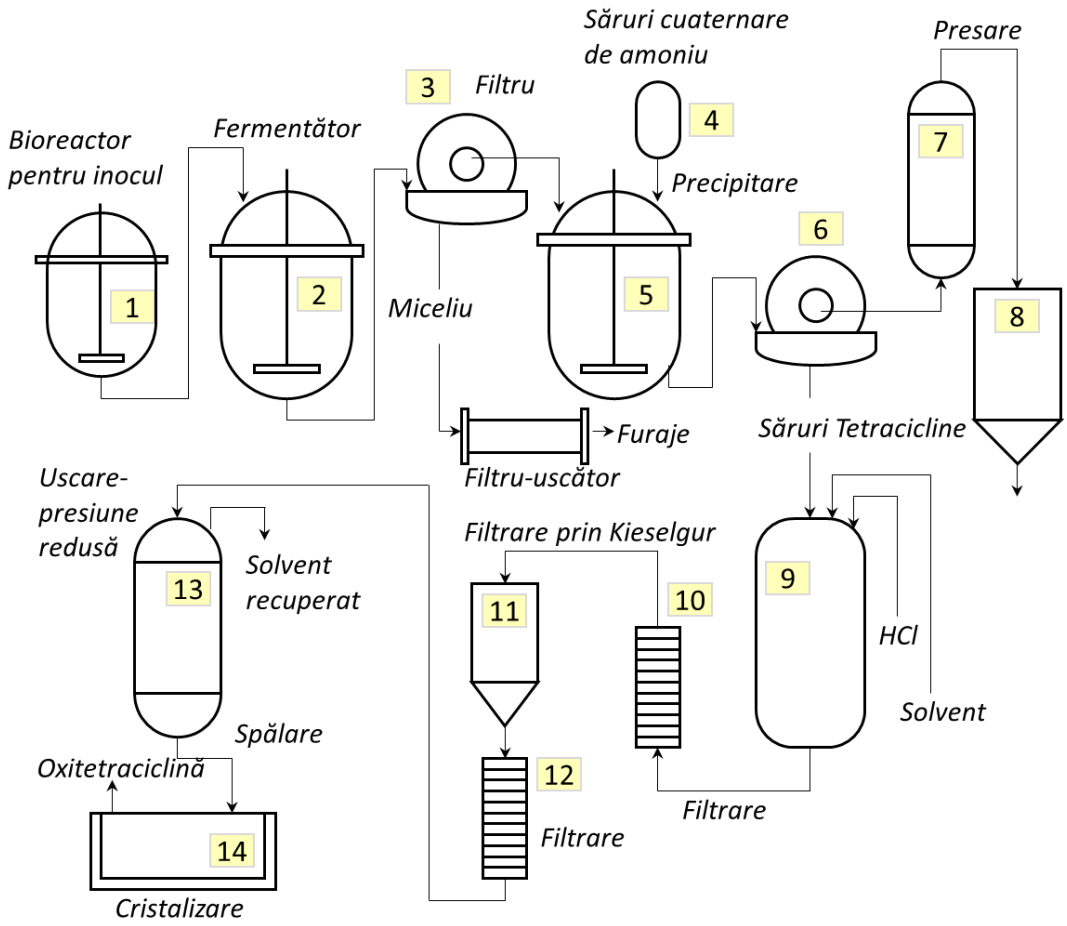


Figura 8.7. Schema tehnologică de producere a oxitetraciclinei

1 – bioreactor pentru inoculare; 2 – fermentator; 3 – filtru cu tambur; 4 – dozator de săruri cuaternare; 5 – extractor; 6 – filtru; 7 – aparat pentru presare; 8 – cuptor; 9 – extractor; 10 – filtru; 11 – rezervor pentru depozitarea filtratului; 12 – filtru; 13 – pompă; 13 – rotovapor; 14 – rezervor pentru cristalizarea oxitetraciclinei

Tabelul 8.1. Parametrii optimi în procesul de fermentare la producerea tretraciclinelor

Tetracicline	pH	T, ^{0}C	Viteza de agitare, vvm	Durata, ore
Tetraciclina	6,5-6,8	27,0	0,7-1,0	120,0
Clorotetraciclina	7,0	28,0	1,0	60,0-65,0
Oxitetraciclina	7,0	28,0	0,3-1,5	96,0

Compoziția mediului nutritiv pentru procesul de fermentare este prezentat în tabelul A.8.4. Frecvent, ca **sursă de carbon** este utilizată zaharoza, care în timpul procesului de fermentare este hidrolizată enzimatic în glucoză și fructoză. Glucoza inhibă procesul de biosinteză, de aceea conținutul acesteia este strict

monitorizat. Datorită capacității streptomicetelor de a produce *α*-amilaze, amidonul poate fi folosit, de asemenea, ca sursă de carbon. În sinteza oxitetraciclinei pot fi utilizați și acizii grași, gliceridele și glicerolul, care sunt metabolizați la acetil-CoA, un precursor esențial în biosinteza tetraciclinelor.

Sursa de azot este reprezentată de sărurile de amoniu, adăugate inițial sau pe parcursul procesului de fermentare. Hidroxidul de amoniu, adăugat în timpul fermentării, servește atât ca sursă de azot, cât și ca agent de neutralizare pentru menținerea unui pH constant. În unele procese, carbonatul de calciu poate fi folosit ca agent de neutralizare. O altă sursă de azot este concentratul de porumb, care conține aminoacizi, sau făina de soia, sursă de proteine. Pentru hidroliza proteinelor, actinomicetele secretă în bioamestec de endo- și exoproteaze.

Microelementele. Ionii fosfat (PO_4^{3-}) sunt necesari pentru creșterea streptomicetelor. În concentrații mari acești ioni blochează procesul de biosinteză. Cationii metalelor bivalente (Ca^{2+}, Mg^{2+} și Sr^{2+}) formează complecși cu tetraciclinele, ceea ce reduce concentrația tetraciclinelor solubile în mediu și, implicit, toxicitatea acestora față de streptomicete. În același timp, formarea complecșilor insolubili deplasează echilibrul de biosinteză spre formarea tetraciclinelor. Ionii de clor sunt necesari pentru biosinteza clorotetraciclinei. Dacă biosinteza vizează alte tetracicline, concentrația ionilor de clor trebuie limitată (Fig. A.8.3).

Stimulatori. În biosinteza clorotetraciclinei și a tetraciclinei produse de *S. aureofaciens* poate fi utilizat benziltiocianatul (Fig. A.8.4), o substanță care stimulează biosinteza acestor antibiotice. De asemenea, în biosinteza tuturor tetraciclinelor, pretetramida, un precursor sintetic, poate fi utilizată pentru a crește randamentul în tetracicline. Octadecanolul este folosit ca antispumant.

Izolarea clorhidratului de oxitetraciclină

După fermentare are loc filtrarea bioamestecului cu ajutorul filtrului tambur (unitatea 3), iar soluția apoasă rezultată este depozitată în reactorul 5. După filtrare, presare și uscare în filtrul-uscător miceliul rezidual este utilizat ca ingredient pentru furaje.

Din soluția apoasă oxitetraciclina este precipitată sub formă de săruri cuaternare de amoniu (Fig. 8.8), adăugate din dozatorul (**4**). Sărurile de oxitetraciclină sunt filtrate cu ajutorul filtrului (**6**) și transferate în reactorul (**9**), unde, prin adăugarea acidului clorhidric, se formează clorhidratul de oxitetraciclină. Acesta este extras ulterior cu un solvent organic, de obicei *n*-butanol. După presare (**7**) și uscare în uscător (**8**) biomasa reziduală este utilizată ca ingredient pentru furaje. Soluția organică din reactorul (**9**) este filtrată succesiv prin filtrele (**10**) și (**12**). Depozitarea filtratului după prima filtrare se face în

rezervorul (**11**). Filtrele conțin kieselgur sau celită (material poros obținut din fosilele algelor diatomee și format în principal din silicați). Solventul organic este îndepărtat prin evaporare la presiune redusă (**14**) și reutilizat în proces. Concentratul este spălat, iar oxitetraciclina este cristalizată sub formă de cristalohidrat (**15**).

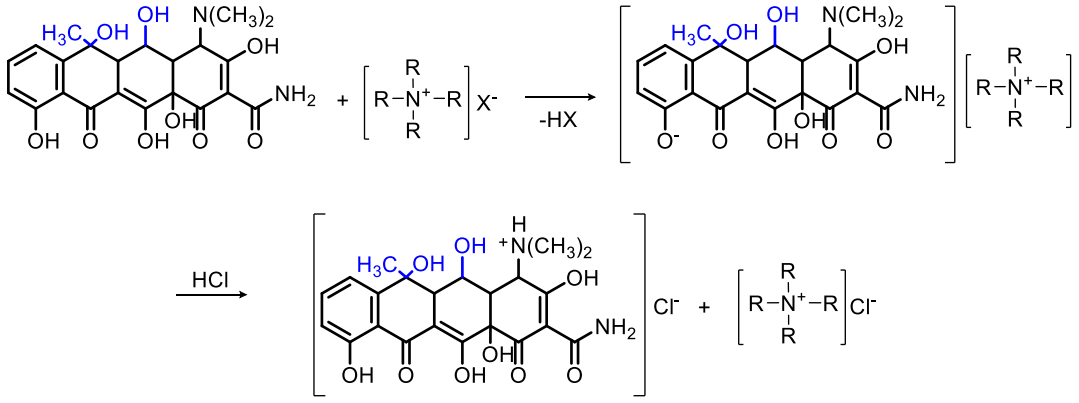


Figura 8.8. Reacțiile schematice de izolare a oxitetraciclinei cu săruri cuaternare și precipitarea sub formă de clorhidrat cu HCl

Prin alte procedee, oxitetraciclina, după filtrare, poate fi izolată prin adsorbție și eluare cu *n*-butanol sau precipitată sub formă de complecși ai ionilor metalelor alcalino-pământoase.

Izolarea clortetraciclinei

Clortetraciclina poate fi izolată prin mai multe metode:

1. Separarea bioamestecului, extracția cu acetat de *n*-butil și purificarea prin cromatografie de schimb ionic (metode utilizate în procesele mai recente).
2. Adsorbția pe cărbune activ la un pH de 4,5-5,0, urmată de spălare pentru îndepărtarea coloranților. Clortetraciclina se eluează cu metanol, etanol sau acetonă.
3. Filtrarea bioamestecului și precipitarea clortetraciclinei din mediul filtrat prin formarea de complecși insolubili cu ionii Ca^{2+}, Mg^{2+} sau Ba^{2+}. Prin acidulare cu acid clorhidric diluat are loc distrugerea complecșilor și eliberarea clortetraciclinei, care se extrage ulterior cu *n*-butanol. Fracțiile organice sunt apoi concentrate la presiune redusă.

Izolarea tetraciclinei

Tetraciclina poate fi izolată prin mai multe metode:

1. După filtrarea bioamestecului, tetraciclina este extrasă cu *n-butanol* sau cu *metil-izobutilcetonă* la un pH de 8,5. Din extractele organice concentrate

tetraciclina se precipită prin adăugarea de heptan. În etapa finală, precipitatul se extrage cu hidroxid de amoniu și se purifică cromatografic pe o coloană de tip Florisil (silicat de magneziu), utilizând ca eluent un acid diluat.

2. Tetraciclina, analog oxitetraciclinei, poate fi izolată prin precipitare cu săruri cuaternare de amoniu la un pH 10,0. În această metodă, inițial are loc precipitarea proteinelor (produse secundare) din bioamestec la un pH de 1,5. Pentru a evita degradarea tetraciclinei, proteinele precipitate și biomasa se filtrează rapid la temperatura de 10-15ºC. Filtratul este tratat cu hidroxid de amoniu (pH 7,7), ceea ce duce la precipitarea complexului tetraciclinei cu ionii de Ca^{2+}, insolubil în apă (Fig. 8.9). Ionii de calciu, sub formă de $CaCO_3$, se adaugă în procesul de fermentare pentru menținerea pH-ului. În etapa următoare, suspensia complexului de calciu este tratată cu acid oxalic, iar oxalatul de calciu format se separă. Din soluția filtrată, tetraciclina se precipită la un pH de 4. În etapa finală, precipitatul se extrage cu metanol și acetat de butil, extractele organice se concentrează, iar clorhidratul de tetraciclină se precipită prin adăugarea de acid clorhidric concentrat.

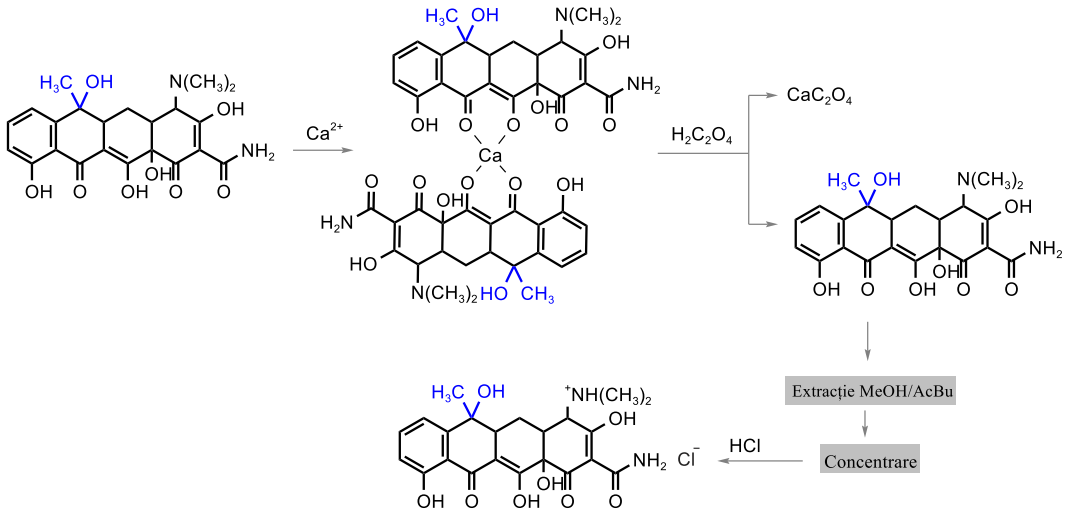


Figura 8.9. Schema reacțiilor de izolare a tetraciclinei

8.5. Producerea tehnologică a tetraciclinelor de semisinteză

Spre deosebire de tetraciclinele obținute prin biosinteză, tetraciclinele de semisinteză prezintă o absorbție mai ridicată (datorită lipofilicității mai mari), pot fi administrate sub formă injectabilă și au un spectru mai larg de acțiune, inclusiv împotriva bacteriilor rezistente la unele tetracicline și peniciline naturale.

Doxiciclina poate fi obținută prin două metode:

1. *Reducerea grupei hidroxil terțiare a oxitetraciclinei* (Fig. 8.10). În această metodă se pornește de la oxitetraciclina care conține o grupă hidroxil (-OH) terțiară la poziția C_6. Reducerea acestei grupe hidroxil se face cu hidrogen molecular (H_2) în prezența unui catalizator de rodiu pe suport de carbon activ (Rh-C). Prin această reacție oxitetraciclina se transformă într-un derivat mai puțin polar, care are o lipofilicitate mai mare, caracteristică pentru doxiciclină. Doxiciclina obținută are o activitate antibacteriană similară cu oxitetraciclina, dar cu o biodisponibilitate mai mare datorită caracteristicilor sale chimice îmbunătățite.

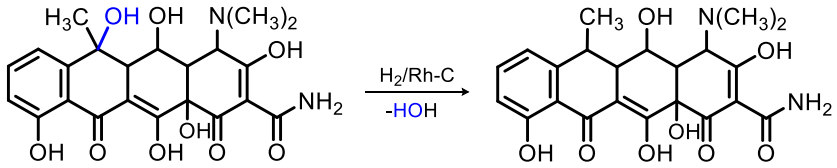


Figura 8.10. Sinteza doxiciclinei prin reducerea grupei hidroxil terțiare din poziția C_6

2. *Metoda cu N-clorosuccinimidă* (Fig. 8.11). Oxitetraciclina este tratată cu *N*-clorosuccinimida (NCS), un agent de clorurare. Aceasta introduce o grupare cloro în molecula de oxitetraciclină, formând acetalul clorurat (compusul 1). În prezența acidului fluorhidric (HF), acetalul este transformat în derivatul 11a-cloro-6-exometilenic (compusul 2). Acidul fluorhidric este important în activarea grupării clorură și permite formarea unei noi legături chimice, generând un nou compus chimic. După formarea compusului 2, se adaugă un agent reducător care elimină atomul de clor, rezultând intermediarul enolizat (compusul 3). Această etapă este importantă pentru stabilizarea structurii chimice a moleculei. În următoarea etapă, intermediarul enolizat (compusul 3) este tratat cu tiofenol, urmat de hidrogenare. Hidrogenarea contribuie la reducerea legăturilor duble și la stabilizarea compusului.

Doxiciclina este utilizată pentru aceleași indicații ca celelalte tetracicline. Totuși, se remarcă printr-o activitate mai mare împotriva anumitor bacterii și o tolerabilitate mai bună. Este indicată în tratamentul infecțiilor tractului respirator și urogenital, infecțiilor cu transmitere sexuală, dar și în diverse infecții ale pielii și ale țesuturilor moi. Este utilizată pentru tratamentele de lungă durată în prevenirea malariei și în tratamentul diverselor maladiii parazitare.

Analogi: *azudoxat, codidoxal, eftapan, vibramycin.*

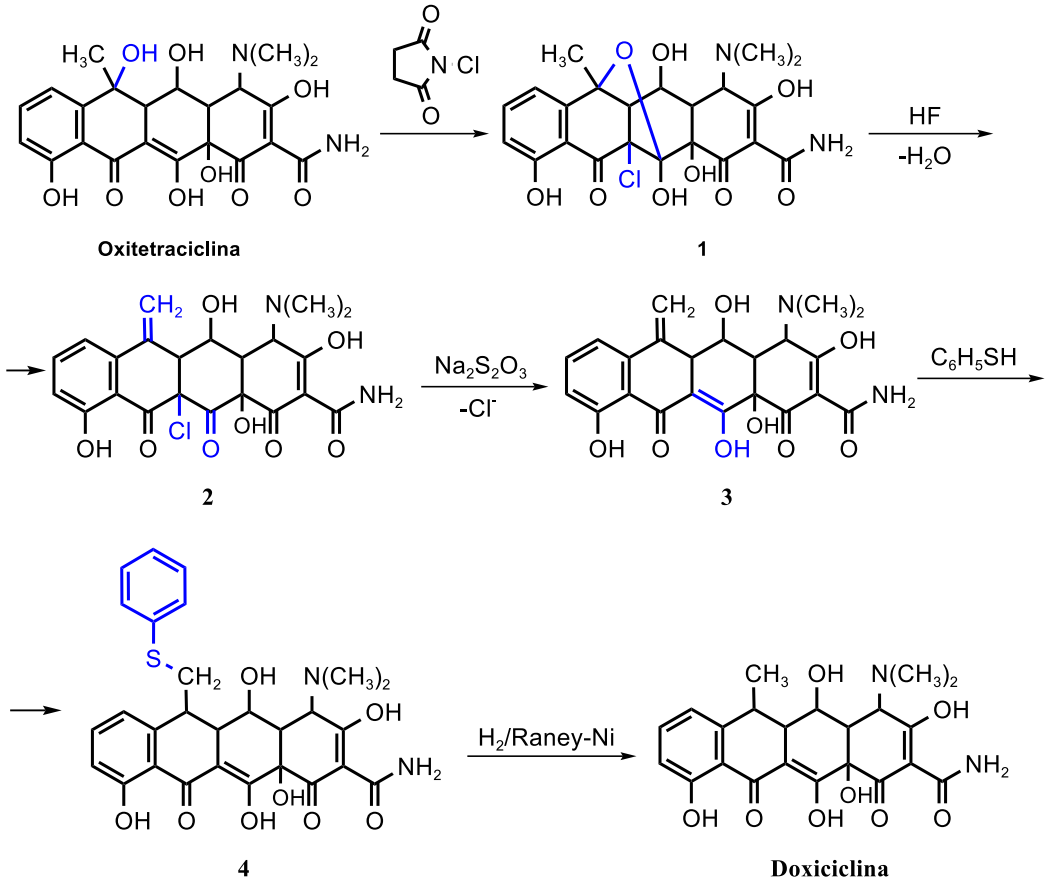


Figura 8.11. Sinteza doxiciclinei prin tratarea oxitetraciclinei cu *N*-clorosuccinimidă

Minociclina este un antibiotic tetraciclinic semisintetic, obținut printr-o serie de reacții chimice din tetraciclina 6-demetilată, care este produsă prin fermentare, atunci când procesul de metilare este blocat. Minociclina se obține în șase etape din 6-demetiltetraciclină (Fig. 8.12):

- ✓ În prima etapă, tetraciclina este obținută prin proces de fermentare a bacteriilor din genul *Streptomyces*, precum *Streptomyces aureofaciens*. În această etapă, bacteriile produc tetraciclina, un antibiotic cu spectru larg, prin biosinteză. În procesul biosintetic al tetraciclinei există o etapă în care grupările metil sunt adăugate pe anumite poziții ale moleculei de tetraciclină. Pentru a obține 6-demetiltetraciclina, acest proces de metilare este blocat, iar tetraciclina obținută are o grupare metil eliminată din poziția C_6 a structurii chimice.
- ✓ După obținerea 6-demetiltetraciclinei, minociclina este sintetizată printr-un proces chimic de modificare a structurii moleculei. 6-Demetiltetraciclina suferă o serie de reacții chimice care includ modificarea radicalilor

funcționali. Acestea implică reintroducerea unor grupări funcționale care modifică lipofilia și activitatea biologică a moleculei.

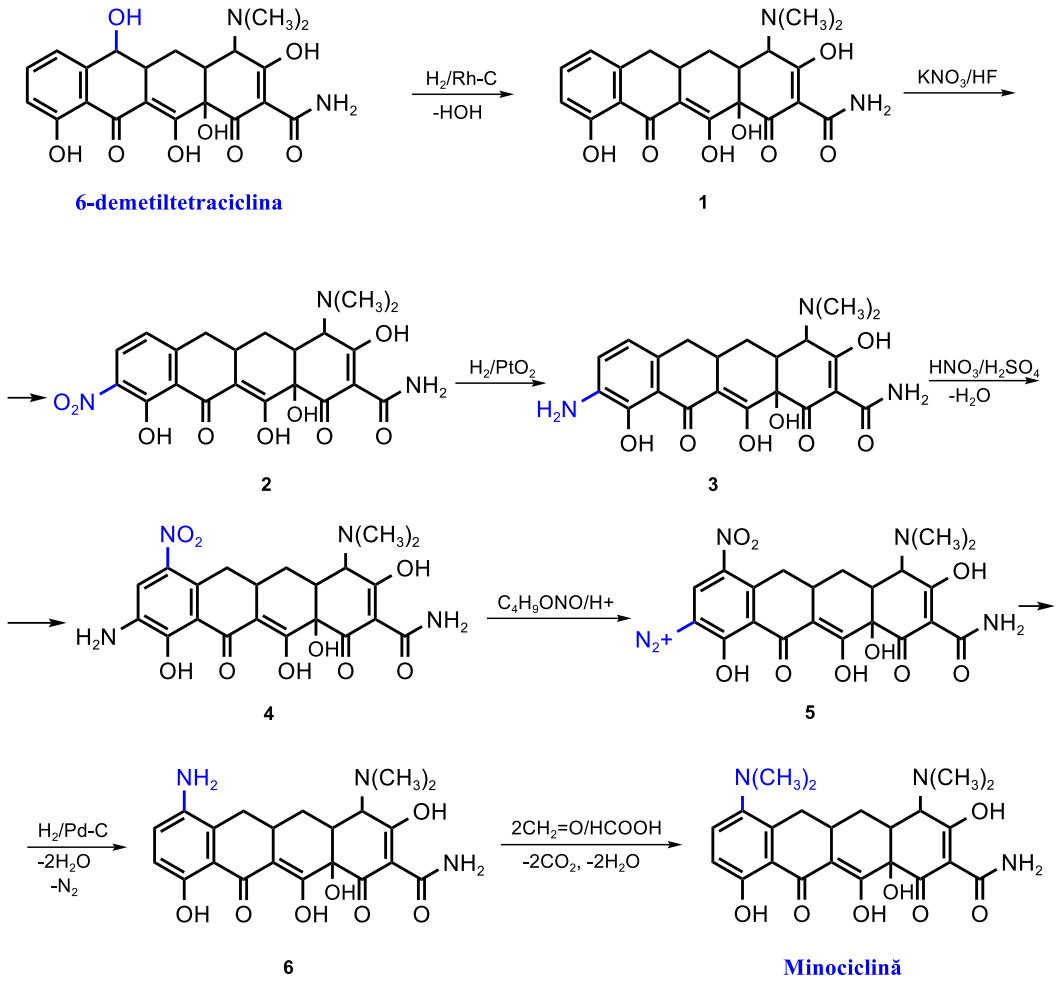


Figura 8.12. Sinteza minociclinei din 6-demetiltetraciclină

- ✓ O etapă esențială în sinteza minociclinei este introducerea unei grupări amino în nucleul tetraciclic. Această grupă are un rol important în creșterea lipofilicității moleculei și în potențarea efectului antibacterian, în special față de bacteriile rezistente la tetraciclinele naturale.
- ✓ Pentru a îmbunătăți activitatea minociclinei, se efectuează modificări chimice ale grupelor hidroxil din pozițiile C_6 și C_7, ceea ce îmbunătățește stabilitatea și eficiența acesteia împotriva anumitor tulpini de bacterii.

Minociclina este utilizată în tratamentul unor infecții bacteriene care nu pot fi tratate eficient cu alte tetracicline, precum infecții respiratorii, ale tractului urinar, dermice, ale tractului genital și limfatic, oculare. În plus, este eficientă împotriva

unor bacterii rezistente la alte tetracicline, ceea ce o face utilă în tratamentele infecțiilor persistente. **Analogi:** *clinocin, minocyn, vectrin* etc.

Metaciclina

Metaciclina este obținută din oxitetraciclină printr-un proces chimic (Fig. 8.13).

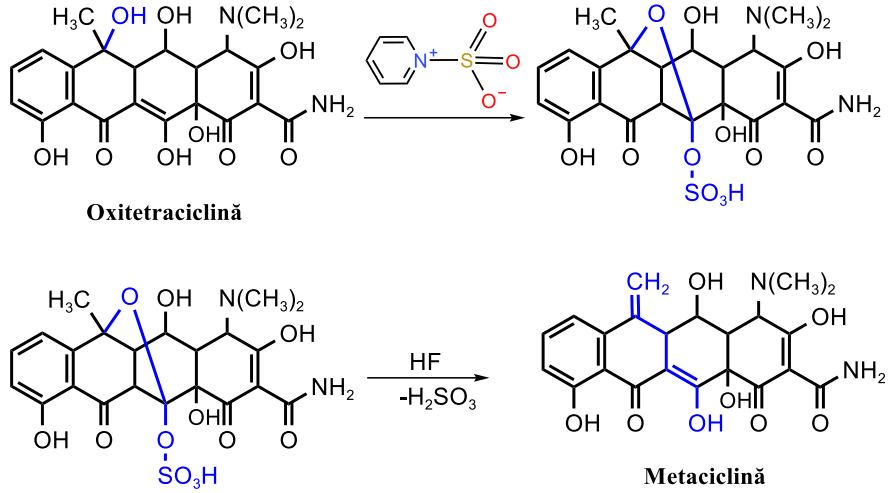


Figura 8.13. Sinteza metaciclinei din oxitetraciclină

Oxitetraciclina este obținută prin fermentare utilizând bacterii din genul *Streptomyces*. În procesul de semisinteză, oxitetraciclina este tratată cu trioxid de piridină, agent de oxidare care favorizează modificarea structurii chimice a moleculei de oxitetraciclină. În această etapă, trioxidul de piridina atacă grupările specifice ale oxitetraciclinei, facilitând formarea unui intermediar chimic reactiv, care va duce la modificarea structurii sale. După oxidarea inițială, intermediarul reactiv rezultat din tratamentul cu trioxid de piridină este tratat cu acid fluorhidric (HF). Acidul fluorhidric poate induce formarea unei grupe acetat în molecula de oxitetraciclină, transformând-o astfel într-o formă diferită, mai stabilă și cu un spectru de activitate modificat. După reacția cu acidul fluorhidric, acetatul format reacționează pentru a produce metaciclina, derivatul semisintetic al oxitetraciclinei. Metaciclina are o lipofilicitate mai importantă decât tetraciclina, ceea ce favorizează absorbția tisulară și, prin urmare, eficiența terapeutică a acesteia.

Analog altor tetracicline, metaciclina este utilizată pentru tratamentul unui spectru larg de infecții bacteriene, inclusiv ale căilor respiratorii (pneumonii, bronșite), ale tractului urinar (cistite, pielonefrite); ale pielii (acnee, infecții cutanate bacteriene), gastrointestinale și oculare.

Metaciclina are un profil de tolerabilitate mai bun comparativ cu alte tetracicline, ceea ce o face opțiune favorabilă în tratamentele pe termen lung sau în cazurile în care alte tetracicline sunt mai puțin tolerate.

Analogi: *rondomicina, metamicina* etc.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați și prezentați structura chimică generală a tetraciclinelor.
2. Explicați mecanismul de acțiune a tetraciclinelor asupra bacteriilor.
3. Explicați mecanismul de dezvoltare a rezistenței bacteriilor la tetracicline.
4. Prezentați și explicați principalele etape de biosinteză a tetraciclinelor.
5. Descrieți procesul biotehnologic de producere a tetraciclinelor naturale, materiile prime, condițiile optime de fermentare.
6. Propuneți metode de separare și purificare a tetraciclinelor din bioamestec.
7. Descrieți mecanismele de biosinteză a tetraciclinelor semisintetice.
8. Propuneți fluxul tehnologic de producere a tetraciclinelor semisintetice.
9. Argumentați avantajele tetraciclinelor de semisinteză față de cele naturale, din punct de vedere farmaceutic.
10. Propuneți metode de optimizare a procesului biotehnologic de obținere a tetraciclinelor în scopul creșterii randamentului global și purității produsului finit.

BIBLIOGRAFIE

1. PICKENS, L. B., TANG, Y. Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. In: *Metabolic Engineering*, 2009, 11(2), pp. 69–75. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.10.001.
2. CHAREST, M.G., SIEGEL, D.R., MYERS, A.G. Synthesis of (−)-Tetracycline. In: *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(23), pp. 8292–8293. https://doi.org/10.1021/ja052151d.
3. HERBST, E., LEE, A., TANG, Y., SNYDER, S.A., CORNISH, V.W. Heterologous Catalysis of the Final Steps of Tetracycline Biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *ACS Chemical Biology*, 2021, 16(8), pp. 1425–1434. https://doi.org/10.1021/acschembio.1c00259.
4. NELSON, M.L., LEVY, S.B. Tetracyclines and Tetracycline Derivatives. In: *Comprehensive Biotechnology*, 2011, 3, pp. 297–311. https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64046-8.00167-1.
5. NELSON, M.L., ISMAIL, M.Y., MCINTYRE, L., BHATIA, B., VISKI, P., HAWKINS, P., LEVY, S.B. Versatile and Facile Synthesis of Diverse Semisynthetic Tetracycline Derivatives via Pd-Catalyzed Reactions. In: *The Journal of Organic Chemistry*, 2003, 68(15), pp. 5838–5851. https://doi.org/10.1021/jo030047d.
6. MARKLEY, J.L., FANG, L., GASPARRINI, A.J., SYMISTER, C.T., KUMAR, H., TOLIA, N.H., WENCEWICZ, T.A. Semisynthetic Analogues of Anhydrotetracycline as Inhibitors of Tetracycline Destructase Enzymes. In: *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(4), pp. 618–633. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00349.

7. BUPP, J.E., TANGA, M.J. Synthesis of a doxycycline-[13CD3] standard. In: *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2016, 59(7), pp. 291–293. https://doi.org/10.1002/jlcr.3397.
8. NELSON, M.L., LEVY, S.B. The history of the tetracyclines. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1241(1), pp. 17–32. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x.
9. EL-ENSHASY, H.A., FARID, M.A., EL-DIWANY, A.I. Oxytetracycline production by free and immobilized cells of *Streptomyces rimosus* in batch and repeated batch cultures. In: *Progress in Biotechnology*, 1996, pp. 437–443. https://doi.org/10.1016/s0921-0423(96)80060-8.
10. MISRA, R., ACHARYA, S., DILNAWAZ, F., SAHOO, S.K. Sustained antibacterial activity of doxycycline-loaded poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) and poly(ε-caprolactone) nanoparticles. In: *Nanomedicine*, 2009, 4(5), pp. 519–530. https://doi.org/10.2217/nnm.09.28.
11. PAPICH, M.G. Considerations for using minocycline vs doxycycline for treatment of canine heartworm disease. In: *Parasites Vectors*, 2017, 10(2), 493, pp. 186-235. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2449-1.
12. MARKLEY, J.L., WENCEWICZ, T.A. Tetracycline-Inactivating Enzymes. In: *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01058.
13. PICKENS, L.B., TANG, Y. Oxytetracycline Biosynthesis. In: *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(36), pp. 27509–27515. https://doi.org/10.1074/jbc.r110.130419.
14. LIU, Y., HE, X., FU, Y., DIONYSIOU, D.D. Degradation kinetics and mechanism of oxytetracycline by hydroxyl radical-based advanced oxidation processes. In: *Chemical Engineering Journal*, 2016, 284, pp. 1317–1327. https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.034.
15. TATSUTA, K., YOSHIMOTO, T., GUNJI, H., OKADO, Y., TAKAHASHI, M. The First Total Synthesis of Natural (−)-Tetracycline. In*: Chemistry Letters*, 2000, 29(6), pp. 646–647. https://doi.org/10.1246/cl.2000.646.

9. BIOTEHNOLOGIA PROTEINELOR RECOMBINANTE

1. Proteine recombinante: clasificare, structură, proprietăți, utilizare farmaceutică și/sau cosmetică
2. Proteine folosite în cosmetologie: colagenul, cheratina și cheratina hidrolizată, toxina botulinum
3. Biotehnologia producerii insulinei: materii prime, etape de prefermentare, biosinteză, izolare și purificare

Abilități

Studentul:

- clasifică proteinele după structură și proprietățile biologice;
- caracterizează proteinele folosite în industria farmaceutică și cosmetică;
- explică diferența dintre proteinele native și cele recombinante;
- relatează referitor la structura, biosinteza și proprietățile proteinelor de interes farmaceutic și/sau cosmetic;
- descrie etapele și parametrii tehnici ai proceselor biotehnologice de biosinteză a insulinei;
- elaborează schema tehnologică de producere a insulinei;
- argumentează importanța producerii insulinei pe cale biotehnologică.

9.1. Proteine recombinante: clasificare, structură, proprietăți, utilizare farmaceutică și/sau cosmetică

Proteinele recombinante sunt descoperiri semnificative în biotehnologia biomedicală. Ele sunt utilizate nu doar în cercetarea biomedicală, dar și în tratamentele medicale, sub formă de medicamente. Prima proteină recombinantă utilizată în tratament a fost insulina umană recombinantă, aprobată în 1982. De atunci, industria proteinelor recombinante s-a dezvoltat rapid. Până în prezent, peste 130 de proteine recombinante au fost aprobate de FDA (Food and Drug Administration) din SUA pentru uz clinic. La nivel global, mai mult de 170 de proteine recombinante sunt produse și utilizate în medicină. Proteinele recombinante utilizate în practica clinică includ hormoni recombinanți, interferoni, interleukine, factori de creștere, factori de necroză tumorală, factori de coagulare a sângelui, medicamente trombolitice și enzime. Acestea sunt folosite pentru tratarea unor boli majore, precum diabetul, nanismul, infarctul miocardic, insuficiența cardiacă congestivă, accidentul vascular cerebral, scleroza multiplă, neutropenia, trombocitopenia, anemia, hepatita, artrita reumatoidă, astmul, boala Crohn, precum

și în terapii anticancer. Proteinele recombinante sunt proteine obținute cu ajutorul microorganismelor modificate genetic, care conțin gena sau genele de biosinteză a acestora. Microorganismele folosite în acest sens sunt bacteriile, drojdiile, celulele mamiferelor.

Tehnologia de ADN recombinant presupune frecvent inserarea cu ajutorul enzimelor specifice a genelor de interes în plasmida microorganismului donor, obținându-se astfel plasmide modificate genetic (ADN recombinant). Utilizând substanțe chimice specifice, numite promotori, are loc activarea genelor care asigură biosinteza produsului de interes; schema generală este prezentată în figura 9.1.

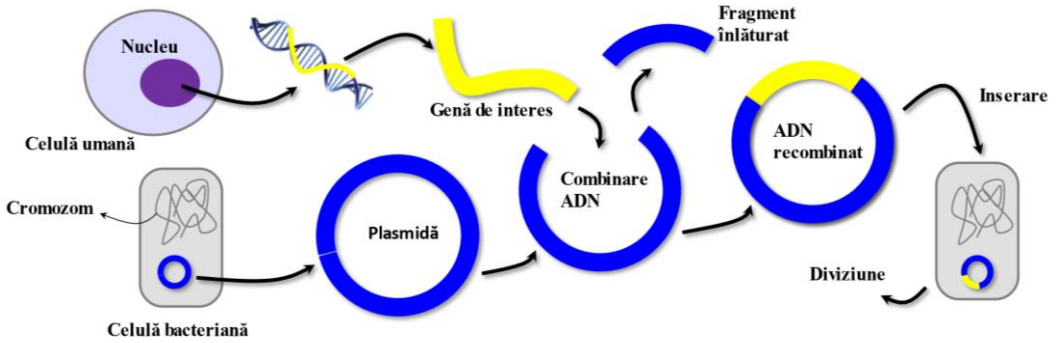


Figura 9.1. Schema generală de obținere a proteinelor recombinante prin tehnologia de ADN recombinant

Până în prezent, proteinele recombinante terapeutice au evoluat în trei generații (Tab. A.9.1).

Prima generație a inclus proteine recombinante cu structuri native, identice cu cele naturale, fără modificări structurale sau funcționale semnificative. Proteinele recombinante din prima generație sunt utilizate pentru a înlocui proteinele endogene în deficiențe sau disfuncții biologice (ex., insulină, hormon de creștere uman, interferon α-2). Aceste proteine au o eficiență terapeutică mai mică, cu biodisponibilitate și stabilitate limitată.

În a doua generație sunt incluse proteine modificate genetic pentru a îmbunătăți proprietățile lor, cum ar fi farmacocinetica (PK), biodistribuția sau specificitatea, în scopul reducerii efectelor secundare și creșterii eficacității. Această generație include proteine cu funcții noi sau modificate (ex., interferoni cu rezistență crescută la proteoliză, anticorpi monoclonali). Pentru producerea de proteine optimizate (ex., pegilarea pentru stabilitate sporită) sunt utilizate tehnologii avansate.

Iar a treia generație include proteine cu modificări complexe și multiple, concepute pentru noi căi de administrare sau mecanisme de acțiune, folosind

integrarea cu tehnologii emergente, cum ar fi nanomedicinele sau sistemele de livrare inteligente. Această generație include proteine de fuziune, proteine cu activitate multiplă și terapii combinate, care au demonstrat siguranță și eficiență clinică îmbunătățite semnificativ. Aceste caracteristici reflectă progresul tehnologic în dezvoltarea proteinelor recombinante, de la simple substituții ale proteinelor naturale la terapii inovatoare bazate pe inginerie moleculară.

Structura proteinelor recombinante este similară cu cea a proteinelor naturale, fiind formată din aminoacizi legați prin legături peptidice. Totuși, în funcție de procesul de producție și scopul terapeutic, aceste proteine pot prezenta particularități structurale și funcționale. Nivelurile structurale ale proteinelor recombinante sunt similare celor naturale, fiind clasificate în proteine cu structură primară, secundară, terțiară și cuaternară.

Structura primară – reprezintă secvența liniară de aminoacizi, determinată genetic. La proteinele recombinante, secvența este proiectată să fie identică cu cea a proteinei native sau să includă modificări pentru a spori eficiența sau stabilitatea.

Structura secundară – conține aranjamente locale regulate, cum ar fi α-helix și β-pliată. Este stabilizată prin legături de hidrogen între grupările funcționale ale catenelor.

Structura terțiară – reprezintă aranjarea tridimensională completă a unei proteine. Proteinele recombinante pot include regiuni modificate (ex.,: adăugarea de etichete pentru purificare sau modificări ale domeniilor active pentru stabilitate).

Structura cuaternară (opțională) – se referă la asocierea mai multor lanțuri polipeptidice pentru a forma o proteină funcțională. Exemple: anticorpi monoclonali recombinați (IgG), care au o structură cuaternară compusă din două catene cu masa moleculară mare și două catene cu masa moleculară mică.

Tipurile de modificări structurale posibile pentru proteine recombinante

Dintre tipurile de modificări structurale posibile pentru proteinele recombinante fac parte:

- pegilare – adăugarea de molecule de polietilenglicol (PEG) pentru a crește stabilitatea și timpul de înjumătățire.
  Exemplu: *Pegaspargaza, Pegfilgrastim, Pegloticază etc.*;
- glicozilare – modificare prin adăugarea de fragmente de carbohidrați pentru a imita proteinele naturale sau pentru a le spori stabilitatea. Exemple: *Eritropoietina recombinantă, anticorpi monoclonali (Trastuzumab, Rituximab, Adalimumab)*;
- fuzionare – proteinele pot fi create prin fuziunea a două sau mai multor domenii funcționale diferite. Exemple: *Etanercept* (fuziune între receptorul

TNF și un fragment Fc de imunoglobulină), *Belatacept* (fuziune între Domeniul Fc și CTLA-4), *Romiplostim* (fuziune între domeniul receptorului de trombopoietină și Fc) etc.;

- mutageneză direcționată – introducerea unor modificări specifice pentru a îmbunătăți specificitatea, eficiența sau rezistența la degradare. Exemple: *Interferon beta-1b, Eritropoietina (EPO) modificată, Factor VIIa recombinant* etc.;
- etichete (tags) – adăugarea de secvențe scurte de aminoacizi (ex.,: His-tag) pentru a ușura purificarea. Exemple: *Insulina Recombinantă, Interferonul Alfa Recombinant, Proteaza Caspază Recombinantă, Dornaza Alfa Recombinantă* etc.

Printre factorii care influențează structura proteinelor recombinante se numără:

- sistemul de expresie – proteinele produse în bacterii (*E. coli*) pot fi nonglicozilate, în timp ce cele produse în celule mamifere (CHO, HEK) pot avea modificări posttranslaționale complexe;
- mediul de producție – pH-ul, temperatura și condițiile de fermentare afectează structura finală;
- tehnologiile utilizate – optimizarea proceselor de pliere, purificare și formulare contribuie la obținerea unei structuri corecte și funcționale.

Structura proteinelor recombinante este proiectată pentru a asigura o funcționalitate terapeutică optimă și pentru a minimiza riscurile, cum ar fi imunogenicitatea sau instabilitatea.

Utilizarea farmaceutică și/sau cosmetică a proteinelor recombinante

Proteinele recombinante sunt esențiale în medicina modernă, având aplicații diverse și impact semnificativ asupra calității vieții pacienților. Progresele tehnologice continuă să amelioreze aceste tratamente, sporindu-le eficacitatea și accesibilitatea.

Printre principalele utilizări farmaceutice ale proteinelor recombinante se numără cele descriese mai jos.

1. *Terapia hormonală*

Proteinele recombinante sunt folosite pentru a înlocui sau suplimenta hormonii naturali deficienți. Insulina recombinantă este utilizată pentru gestionarea diabetului zaharat de tip 1 și 2, oferind o alternativă sigură insulinei derivate din surse animale. Hormonul de creștere uman (hGH) tratează deficiențele de creștere la copii și adulți, precum și afecțiunile de tipul sindromului Turner. Eritropoietina (EPO) stimulează producția de celule roșii, fiind utilizată în tratarea anemiei asociate insuficienței renale cronice sau chimioterapiei.

2. *Tratamentul bolilor hematologice*

Proteinele recombinante sunt esențiale pentru pacienții cu tulburări de coagulare. Factorii de coagulare VIII și IX recombinanți sunt utilizați în tratamentul hemofiliei A și B, reducând riscul infecțiilor asociate produselor derivate din sânge.

3. Terapia imunologică și antivirală

Interferonii recombinanți (α-, β-, γ-) activează răspunsul imun, fiind folosiți în tratarea hepatitei B și C, sclerozei multiple și a anumitor forme de cancer. Interleukinele recombinante, precum IL-2, sunt utilizate în imunoterapia cancerului și a maladiilor autoimune.

4. Tratamentul bolilor oncologice

Proteinele recombinante au un rol central în terapia cancerului. Anticorpii monoclonali recombinanți (de exemplu, Trastuzumab, Rituximab, Bevacizumab) sunt folosiți în tratarea diferitor tipuri de cancer, inclusiv a cancerului de sân, limfoamelor și tumorilor colorectale.

5. Terapia trombolitică și cardiovasculară

Activatorul tisular de plasminogen (tPA) este utilizat pentru dizolvarea cheagurilor de sânge în infarctul miocardic acut și accidentele vasculare cerebrale. Această clasă de proteine contribuie la reducerea mortalității și a dizabilităților severe în cazurile de urgență.

6. Enzime terapeutice

Enzimele recombinante înlocuiesc funcțiile deficitare sau ajută în procese specifice. α-Dornaza reduce mucusul în fibroza chistică. Pegaspargaza este utilizată în tratamentul leucemiei limfoblastice acute.

7. Tratamentul bolilor inflamatorii și autoimune

Inhibitorii TNF (cum ar fi Adalimumab și Etanercept) reduc inflamația în artrita reumatoidă, boala Crohn și alte boli autoimune.

8. Fertilizare și sănătatea reproducerii

Gonadotropina corionică umană (hCG) stimulează ovulația în tratamentele de fertilitate și este folosită pentru susținerea sarcinii în primele stadii.

9. Terapia bolilor rare

Proteinele recombinante sunt vitale pentru tratarea bolilor orfane. Enzimele recombinante, precum α-glucozidaza (pentru boala Pompe) și idursulfaza (pentru sindromul Hunter), sunt utilizate pentru afecțiuni rare.

10. Aplicații ale cheratinei recombinante în medicină prin folosirea în calitate de:

- material bioactiv, ca matrice pentru regenerarea țesuturilor (piele, cartilaje);

- substituenți cutanați, pentru tratarea arsurilor și rănilor cronice;
- implant, produse biocompatibile și biodegradabile.

Avantajele proteinelor recombinante în farmaceutică sunt numeroase:

- specificitate terapeutică – acționează direct asupra cauzei moleculare a bolii;
- siguranță – reduc riscurile de contaminare cu agenți patogeni (ex., virusuri) comparativ cu produsele derivate din sânge;
- flexibilitate farmacologică – pot fi optimizate pentru proprietăți farmacocinetice și farmacodinamice superioare;
- reducerea reacțiilor adverse – versiunile îmbunătățite (ex., PEGilate) reduc imunogenitatea și frecvența administrării.

Proteinele recombinante reprezintă tratamente inovatoare care transformă îngrijirea medicală și îmbunătățesc semnificativ calitatea vieții pacienților.

Utilizarea proteinelor recombinante în industria cosmetică reprezintă o inovație semnificativă în domeniul industriei de frumusețe și îngrijire personală, având un impact notabil asupra eficienței produselor destinate pielii și părului. Proteinele recombinante sunt utilizate pentru a spori efectele terapeutice ale cosmeticelor, prin furnizarea de substanțe biologic active care pot acționa direct asupra celulelor și țesuturilor.

Principalele utilizări ale proteinelor recombinante în industria cosmetică:

1. Antioxidante și antiîmbătrânire

Proteinele recombinante pot fi utilizate pentru a combate semnele îmbătrânirii pielii. Superoxid dismutaza (SOD) recombinantă, un antioxidant puternic care protejează celulele pielii împotriva stresului oxidativ și previne deteriorarea cauzată de radicalii liberi. Se adaugă în creme și seruri pentru a preveni îmbătrânirea prematură a pielii. Colagenul recombinant, folosit pentru a stimula producția naturală de colagen în piele, contribuie la fermitatea și elasticitatea acesteia.

2. Hidrarea și regenerarea pielii

Proteinele recombinante pot ajuta la menținerea hidratării pielii și la regenerarea țesuturilor. Hormonul de creștere uman (hGH) este folosit în produse care stimulează regenerarea celulară și creșterea activității celulelor dermale. Acesta poate contribui la întinerirea pielii și la îmbunătățirea aspectului general al acesteia. Fibroblast growth factor (FGF) recombinant, proteine care favorizează regenerarea țesuturilor și repararea leziunilor pielii.

3. Reducerea inflamațiilor și protecția împotriva iritațiilor

Unele proteine recombinante pot avea efecte antiinflamatorii și protejează pielea sensibilă. Interferonii recombinanți (ex., interferonul alfa) sunt utilizați în

creme și loțiuni pentru a reduce inflamațiile și iritațiile pielii, fiind utili în tratarea afecțiunilor precum acneea sau rozaceea.

4. Îngrijirea părului

Proteinele recombinante sunt folosite pentru a îmbunătăți sănătatea părului și a scalpului. Cheratina recombinantă este folosită în șampoane și balsamuri pentru a întări și proteja firul de păr, reducând ruperea și promovând un păr mai strălucitor și mai sănătos. Factorii de creștere recombinanți (ex., FGF) pot stimula creșterea părului și pot preveni căderea acestuia prin revitalizarea foliculilor piloși.

5. Protecția solară

Unele proteine recombinante au capacitatea de a proteja pielea de efectele nocive ale radiațiilor UV. Molecule de protecție UV, obținute prin inginerie genetică, pot fi folosite în formulări cosmetice pentru a proteja pielea de radiațiile ultraviolete și pentru a preveni efectele negative ale expunerii prelungite la soare, cum ar fi arsurile solare și îmbătrânirea prematură. Melanocortinele sunt peptide sau proteine recombinante care stimulează producția de melanină în piele. Melanina este un pigment natural care protejează pielea de efectele radiațiilor UV. Melanocortinele pot fi utilizate în creme și loțiuni pentru a îmbunătăți protecția naturală a pielii împotriva soarelui. Superoxid dismutaza este o proteină antioxidantă care poate fi utilizată pentru a proteja pielea de stresul oxidativ cauzat de expunerea la UV. Aceasta descompune radicalii liberi produși în timpul expunerii la radiațiile UV și ajută la prevenirea îmbătrânirii premature a pielii și a deteriorării celulare.

6. Îngrijirea unghiilor

Proteinele recombinante pot fi folosite pentru îmbunătățirea sănătății unghiilor. Colagenul și cheratina recombinantă întăresc unghiile fragede, previn ruperea și stimulează creșterea sănătoasă a acestora.

7. Aplicații ale cheratinei recombinante în industria cosmetică

Cheratina recombinantă tinde să fie folosită în diverse domenii, precum îngrijirea personală, medicina și industria materialelor, oferind soluții mai sigure, sustenabile și eficiente.

Cheratina este un ingredient esențial în industria cosmetică, oferind beneficii semnificative pentru îngrijirea părului, pielii și unghiilor. Progresul în biotehnologie a extins utilizarea cheratinei și a variantelor sale derivate, oferind opțiuni sustenabile și eficiente pentru diverse tipuri de consumatori.

Cheratina recombinantă este folosită ca ingredient în produsele *leave-in* (șampoanelor sau măștilor) pentru întărirea și repararea/restabilirea firului de păr, este utilizată pentru reducerea frizului și netezirea părului.

Este folosită ca ingredient în produsele de îngrijire a unghiilor (de ex., lacuri), astfel îmbunătățește rezistența și aspectul unghiilor.

Este folosită ca ingredient în produsele antiîmbătrânire, în diferite formulări pentru piele care refac elasticitatea și stimulează regenerarea celulară, în creme și loțiuni pentru pielea uscată și aspră.

Totodată, cheratina este folosită pentru dezvoltarea materialelor ecologice, biodegradabile, în industria alimentară, în calitate de suplimente nutriționale, datorită aminoacizilor esențiali conținuți (metionină, cisteină) etc.

Beneficiile proteinelor recombinante în industria cosmetică:

- *siguranță crescută*, proteinele recombinante sunt produse în condiții controlate, eliminând riscurile asociate cu contaminarea sau reacțiile adverse ce pot apărea în cazul ingredientelor de origine animală sau vegetală;

- *eficiență îmbunătățită*, proteinele recombinante sunt adesea mai pure și mai eficiente decât versiunile naturale, având o biodisponibilitate mai mare;

- *personalizare*, tehnologia de inginerie genetică permite crearea unor proteine cu caracteristici specifice, adaptate nevoilor precise ale pielei sau părului.

Proteinele recombinante reprezintă un domeniu promițător în cosmetica modernă, oferind soluții inovatoare și eficiente pentru îngrijirea pielii și părului, precum și pentru tratarea diferitelor afecțiuni dermatologice. Acestea continuă să transforme industria cosmetică, având un impact major asupra dezvoltării produselor de frumusețe de înaltă performanță.

Enzimele produse prin biotehnologie sunt, de obicei, mai pure decât cele extrase din surse naturale, ceea ce le face sigure pentru utilizarea în aplicații medicale și industriale. Exemple de enzime digestive și funcția acestora sunt prezentate în Tabelul 9.1.

Tabelul 9.1. Exemple de enzime digestive, funcția, indicațiile clinice, sursa recombinantă și caracteristicile specifice ale acestora

Enzimă	Funcția principală	Indicații clinice	Sursa recombinantă	Caracteristici specifice	Solubilitate
Tripsina	Hidrolizează proteinele în peptide și aminoacizi	Tratamentul deficiențelor digestive, producție industrială	*E. coli, drojdii*	Rezistență la proteoliză, stabilitate crescută	Solubilă în apă
Chemotripsina	Hidrolizează legăturile peptidice la reziduurile aromatice	Supliment pentru deficiențe enzimatice, analize proteice	*Sisteme bacteriene sau celule eucariote*	Activitate proteolitică îmbunătățită	Moderat solubilă în apă

Pancreatina (amestec-de-enzime)	Digestia carbohidraților, lipidelor și a proteinelor	Tratamentul insuficienței pancreatice exocrine (ex., fibroză chistică, pancreatită cronică)	*Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae*	Este un amestec de amilaze, proteaze și lipaze	Solubilă în apă, insolubilă în alcool și eter
Pepsina	Hidrolizează proteinele la pH acid	Terapie pentru hipoclorhidrie	*Drojdii, mamifere*	Stabilitate în medii acide	Solubilă în apă, insolubilă în alcool
Amilaza	Degradează carbohidrații în glucide simple	Tratamentul insuficienței pancreatice	*Bacillus subtilis, drojdii*	Eficiență crescută la diverse valori ale pH-ului	Solubilă în apă, insolubilă în solvenți organici
Lipaza	Hidrolizează lipidele în acizi grași și glicerol	Pancreatită, insuficiență pancreatică	*Aspergillus niger, Candida sp.*	Termostabilitate crescută	Solubilă în apă
Dornaza alfa	Descompune ADN-ul din mucusul vâscos	Tratamentul fibrozei chistice	Celule ovariene de hamster	Specificitate ridicată pentru ADN extracelular	Solubilă în apă, insolubilă în solvenți organici

9.2. Proteine folosite în cosmetologie: colagenul, cheratina și cheratina hidrolizată, toxina botulinum

Colagenul este o proteină structurală esențială prezentă în piele, oase, tendoane și în alte țesuturi conjunctive, fiind responsabilă de rezistența și elasticitatea acestora. Este cea mai abundentă proteină din organismul uman și are un rol crucial în menținerea integrității structurale a țesuturilor. Colagenul, cea mai abundentă proteină din matricea extracelulară a celulelor animale, are un rol esențial în asigurarea suportului structural și în reglarea comportamentului celular. Până în prezent au fost identificate 29 de tipuri de colagen, dintre care tipurile I, II și III constituie peste 90% din totalul colagenului din corpul uman. Colagenul oferă rezistență la tracțiune și este o componentă principală a pielii, oaselor, cartilajelor și a țesuturilor conjunctive. Datorită biocompatibilității, biodegradabilității și imunogenității scăzute, colagenul a fost cercetat pe larg și utilizat ca biomaterial în domeniul ingineriei tisulare și al medicinei regenerative.

Cu toate acestea, majoritatea colagenului utilizat pentru aplicații biomedicale este încă derivat din surse animale, precum pielea, tendoanele și oasele bovinelor, porcilor etc. Colagenul de origine animală prezintă anumite dezavantaje inerente. Acesta manifestă variabilitate de la lot la lot în ceea ce privește cantitatea și calitatea, poate declanșa răspunsuri imunogene și implică riscul transmiterii de virusuri sau prioni de origine animală.

În ciuda succesului produselor de colagen de origine animală, cum ar fi Zyderm, dezvoltarea colagenului recombinant are ca obiectiv perfecționarea siguranței și eficacității tratamentelor pe bază de colagen. Obținuți prin tehnici complexe *in vitro*, colagenii recombinanți sunt proiectați să emuleze modificările posttranslaționale observate în colagenii naturali, precum hidroxilarea și glicozilarea, oferind astfel un grad ridicat de asemănare cu colagenul uman.

Colagenul uman recombinant, produs prin metode biotehnologice, poate depăși limitările asociate cu colagenul xenogenic sau alogenic. În ultimele decenii, cercetările asupra colagenului recombinant au realizat progrese semnificative în domeniile recombinării genetice, exprimării proteinelor și dezvoltării materialelor.

Formele de colagen în utilizările comerciale și biotehnologice:

Colagenul natural este extras din surse animale, cum ar fi pielea bovinelor, pești sau porcine. Este folosit în cosmetică, medicină și în industria alimentară.

Colagenul hidrolizat rezultă prin descompunerea colagenului în peptide mai mici, ușor absorbabile. Este utilizat în suplimente alimentare, produse anti-îmbătrânire și pentru sănătatea articulațiilor.

Colagenul recombinant este obținut prin inginerie genetică, folosind microorganisme precum bacteriile (*E. coli*) sau drojdiile modificate genetic pentru a produce colagen uman de tip specific.

Utilizări în cosmetică

Produse antiîmbătrânire – colagenul este utilizat pentru reducerea ridurilor și îmbunătățirea elasticității pielii.

Hidratare – colagenul și peptidele de colagen ajută la menținerea nivelului optim de hidratare a pielii.

Produse pentru păr și unghii – fortifică structura acestora și stimulează regenerarea.

Terapie injectabilă – colagenul injectabil este folosit pentru conturarea feței și reducerea semnelor de îmbătrânire.

Producerea biotehnologică a colagenului implică utilizarea organismelor modificate genetic pentru a sintetiza proteina colagenului în condiții controlate. În acest scop sunt folosite diferite tipuri de microorganisme.

Escherichia coli (*E. coli*) este frecvent utilizată ca gazdă în biologia sintetică datorită faptului că genomul său a fost complet secvențiat și bine studiat, ceea ce permite manipularea genetică convenabilă și previzibilă. În plus, *E. coli* prezintă o cinetică de creștere rapidă, poate fi cultivată în culturi de densitate mare și este scalabilă, fiind deja utilizată pentru producerea de insulină la scară industrială.

Deși organismele procariote, inclusiv *E. coli*, sintetizează colagen bacterian ce conține secvențe repetitive de tip *Gly-X-Y*, acest colagen diferă semnificativ de cel uman în ceea ce privește tipul și distribuția aminoacizilor, precum și structura acestuia. Din cauza lipsei mecanismelor de modificare posttraducțională în procariote, hidroxiprolina lipsește din colagenul bacterian. Această absență limitează utilizarea *E. coli* pentru producția de colagen uman recombinant, întrucât hidroxilarea este esențială pentru formarea colagenului nativ stabil termic.

Ca urmare, majoritatea studiilor privind colagenul produs în *E. coli* se concentrează fie pe secțiuni funcționale mici ale colagenului uman, fie pe colagen bacterian asemănător omului. Cercetările privind producția de colagen uman recombinant în *E. coli* sunt mai puțin avansate comparativ cu cele realizate în organismele eucariote, ceea ce evocă provocările și, totodată, oportunitățile existente în acest domeniu.

Drojdiile sunt frecvent utilizate în biologia sintetică datorită ușurinței manipulării genetice și costurilor relativ scăzute de întreținere. Printre cele mai utilizate specii se numără *Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)* și *Pichia pastoris (P. pastoris)*, folosite ca platforme pentru producția de colagen uman recombinant. Deoarece drojdiile nu dispun de prolil și lisil hidroxilaze native și nu pot efectua hidroxilări posttranslaționale, colagenul produs de acestea este nehidroxilat și termic instabil la 37ºC.

Pentru a remedia această limitare, prolil hidroxilazele umane sunt co-exprimate cu colagenul uman, permițând hidroxilarea prolinei. Expresia colagenului îmbunătățește stabilitatea și activitatea prolil hidroxilazelor, ceea ce a permis obținerea unui colagen triplu elicoidal de tip III, cu un nivel de hidroxilare aproape nativ, în *P. pastoris*. Totuși, hidroxilarea lizinei lipsește, iar randamentul obținut (~15 mg/L) este scăzut. Studii ulterioare efectuate au raportat îmbunătățirea randamentului de colagen triplu elicoidal până la 0,6 g/L prin cultivarea *P. pastoris* într-un bioreactor cu aport constant de oxigen.

Colagenii heterotrimerici sunt mai dificil de exprimat decât homotrimerii, deoarece necesită gene suplimentare. Cu toate acestea, colagenii heterotrimerici, precum colagenul de tip I, au aplicații mai extinse în comparație cu homotrimerii, precum colagenul de tip III, subliniind importanța dezvoltării unor metode eficiente de sinteză a heterotrimerilor. Pentru aceasta au fost optimizate strategii de clonare și expresie pentru subunitățile prolil hidroxilazelor, precum și pentru polipeptidele care formează colagenul de tip I (procolagen 1α1 și procolagen 1α2) în *P. pastoris*. Acest lucru a permis obținerea raportului de 2:1 caracteristic colagenului de tip I între lanțurile procolagen 1α1 și procolagen 1α2. Rezultate similare au fost obținute în *S. cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae a fost de asemenea utilizată pe scară largă pentru producerea de colagen recombinant. De exemplu, s-au proiectat *S. cerevisiae* pentru a produce colagen de tip III utilizând prolil hidroxilaze, dar s-a obținut doar 0,5% hidroxilare a prolinei, un nivel redus în comparație cu hidroxilarea colagenului uman nativ. Utilizând o strategie de clonare alternativă s-au obținut niveluri mai ridicate de hidroxilare a colagenului uman de tip III în *S. cerevisiae*, deși hidroxilarea a rămas sub nivelul colagenului nativ.

În timp ce majoritatea studiilor s-au concentrat pe atingerea gradelor native de hidroxilare a prolinei, unii cercetători au descoperit că regiunile N- și C- nu sunt necesare pentru formarea unei conformații triple elicoidale. Îndepărtarea acestor regiuni a crescut randamentul colagenului, sugerând că randamentul poate fi îmbunătățit prin proiecte genetice deliberate.

Biotehnologia vegetală s-a dezvoltat pentru a susține durabilitatea aprovizionării cu alimente, ca răspuns la creșterea populației mondiale și la efectele schimbărilor de mediu asupra randamentului agricol. Dezvoltarea unor instrumente avansate de inginerie genetică și cererea tot mai mare de biomateriale medicale au direcționat cercetarea spre plante transgenice care pot să producă biomateriale.

Astfel au fost realizate multiple studii asupra colagenului recombinant de origine vegetală, cu un accent deosebit pe producția de colagen de tip I utilizând plantele de tutun (*Nicotiana tabacum*). Deși plantele de tutun posedă prolil hidroxilază pentru hidroxilarea prolinei, activitatea acestei enzime este insuficientă pentru a atinge gradele native umane de hidroxilare. Astfel, a fost necesară modificarea genetică a plantelor pentru a exprima prolil hidroxilazele umane. În plus, a fost exprimată lisil hidroxilaza umană în tutun pentru hidroxilarea lizinei.

O diferență notabilă între transformarea genetică a *E. coli* și cea a plantelor este legată de dimensiunea materialului genetic. În timp ce eficiența transformării scade în *E. coli* pe măsură ce dimensiunea plasmidei crește, transformarea mediată de *Agrobacterium* permite introducerea unor secvențe genetice mai lungi în celulele vegetale. Acest lucru face posibilă exprimarea simultană a genelor pentru procolagen1α1, procolagen1α2, prolil hidroxilază și lisil hidroxilază în aceeași celulă. Pentru a optimiza acumularea colagenului, au fost utilizate peptidele semnal pentru a direcționa produsul spre compartimente subcelulare specifice, cum ar fi vacuola vegetală.

Cercetările au demonstrat că are loc hidroxilarea atât a prolinei, cât și a lizinei la niveluri similare cu cele ale colagenului uman de tip I. De asemenea, s-a stabilit că colagenul produs de tutun poate forma fibrile. Mai mult, alinierea fibrilelor de colagen este esențială pentru obținerea proprietăților mecanice dorite. Pentru a imita structura colagenului din tendonul uman, fibrilele au fost aliniate

prin aplicarea unor forțe de forfecare în timpul extrudării în faza cristalină lichidă a colagenului. Aceasta a reprezentat prima demonstrație a formării fibrilelor din colagen recombinant uman de lungime completă.

Pe lângă tutun, cercetătorii au utilizat porumbul ca gazdă alternativă pentru producerea de procolagen1α1 uman recombinant, demonstrând un conținut de hidroxiprolină comparabil cu cel al colagenului uman nativ. Deși tehnologia asociată porumbului nu a atins încă același nivel de maturitate ca cea a tutunului, acest studiu subliniază potențialul porumbului ca alternativă pentru producția de colagen recombinant.

Un avantaj semnificativ al colagenului derivat din plante constă în scalabilitatea acestora. Spre deosebire de producția în celule procariote sau eucariote, care necesită bioreactoare complexe și surse de nutrienți costisitoare, extinderea producției de colagen în plante se poate realiza simplu prin creșterea cantităților cultivate. Alternativ, plantele pot fi crescute sub formă de culturi celulare sau calusuri în bioreactoare, dacă este necesar.

Bioproducția de colagen recombinant se confruntă încă cu provocări semnificative, precum randamentul scăzut, costurile ridicate și incapacitatea de a reproduce pe deplin modificările posttranslaționale caracteristice colagenului nativ. Aceste limitări fac ca produsele actuale să fie costisitoare și să nu prezinte proprietăți biologice optime. În ciuda potențialului acestora, aceste probleme nerezolvate reduc atractivitatea colagenului recombinant în comparație cu colagenul de origine animală, care rămâne standardul în industrie.

Ca alternativă, sistemele de expresie fără celule reprezintă o opțiune promițătoare pentru obținerea producției și purificării la scară largă a colagenului uman. Recent, aceste sisteme, derivate din celule de mamifere cultivate, au devenit virale datorită capacității acestora de a realiza glicozilare și alte modificări posttranslaționale. Platformele de sinteză a proteinelor fără celule evoluează rapid, trecând de la sinteza rentabilă la scară mică la sisteme de producție la scară mare.

Progresele recente în tehnologiile de manipulare a ADN-ului, împreună cu scăderea costurilor pentru sinteza ADN-ului, reduc semnificativ durata și costurile proceselor de cercetare și dezvoltare. Acest lucru ar putea duce la prețuri mai accesibile și la o biomimetizare mai precisă a colagenului recombinant.

De asemenea, este esențial ca scalabilitatea să fie integrată în etapa de proiectare a constructelor de colagen sintetic. Acest lucru ar permite aplicarea tehnicilor de biofabricare pentru ca producerea economică la scară largă a colagenului recombinant să devină realitate.

Bioproducția oferă un colagen sigur, uniform și de înaltă calitate, eliminând riscurile asociate surselor animale.

Etapele principale de producere biotehnologică a colagenului sunt:

1. Identificarea și izolarea genelor colagenului – la această etapă se selectează gena umană sau animală responsabilă pentru producerea colagenului. Gena este izolată din ADN-ul original folosind tehnici de biologie moleculară, cum ar fi PCR (reacția de polimerizare în lanț).

2. Inserarea genei în vectori de expresie, cum ar fi un plasmid. Vectorul conține elemente necesare pentru a permite expresia genei, cum ar fi promotorii. Ulterior vectorul este introdus în microorganisme, cum ar fi *Escherichia coli*, drojdii (*Pichia pastoris*) sau celule de mamifere, care vor produce colagenul.

3. Transformarea organismelor gazdă – vectorii de expresie sunt introduși în celulele gazdă prin tehnici precum electroporația sau transducția. Celulele care au încorporat corect gena colagenului sunt selectate și cultivate.

4. Cultivarea microorganismelor modificate genetic – celulele gazdă sunt cultivate în bioreactoare cu medii nutritive optime. În timpul procesului de fermentare se monitorizează temperatura, pH-ul și oxigenul pentru a maximiza producția de colagen.

5. Recuperarea și purificarea colagenului – la această etapă celulele gazdă sunt lezate pentru a elibera colagenul produs.

Etapele de purificare implică: filtrarea, ultracentrifugarea, cromatografia (ex., schimb ionic sau gel-filtrare).

La etapa de purificare se elimină contaminanții și se obține colagen de calitate farmaceutică sau cosmetică.

6. Maturarea posttranslațională prin hidroxilare și glicozilare. Aceste modificări sunt esențiale pentru funcționalitatea și structura colagenului. Deci, procolagenul suferă multiple modificări posttraducționale înainte de a se maturiza în tropocolagen, care ulterior poate fi reticulat pentru a forma fibrile de colagen. Aceste modificări posttraducționale sunt esențiale pentru asigurarea asocierii corecte a celor trei molecule de procolagen monocatenar, care pot forma tropocolagen heterotrimeric sau homotrimeric. Doar tropocolagenul cu stabilitate termică se poate asocia pentru a forma fibrile de colagen, care se organizează ulterior în fibre de colagen. Un proces crucial în această stabilizare este hidroxilarea prolinelor la hidroxiprolină, care contribuie semnificativ la menținerea stabilității termice a triplu-elicei de procolagen. Deficiențele în acest proces pot conduce la afecțiuni severe, dintre care cea mai notabilă este scorbutul. Hidroxilarea lizinei la hidroxilizină este esențială pentru condensarea moleculelor de colagen în vederea formării unei fibrile rezistente la tensiune. Hidroxilizina servește și ca punct de atașare pentru glicozilare, proces fără de care fibrilele de colagen nu s-ar forma. Hidroxilarea lizinei și a prolinei este catalizată de enzimele

lisil-hidroxilază și prolil-4-hidroxilază, respectiv necesitând vitamina C ca cofactor. În absența acestuia, peptidele de colagen nu pot forma fibre și sunt degradate în interiorul celulei. Colagenul uman este hidroxilat în proporție de aproximativ 42–54%.

În unele cazuri, colagenul este asamblat în structuri fibrilare specifice.

7. Formulare și sterilizare

Colagenul purificat este formulat în produse finale (geluri, soluții, creme, fiole injectabile etc.), iar pentru utilizare în cosmetică, medicină sau cercetare este sterilizat.

Avantajele biotehnologiei colagenului:

- Elimină riscul de contaminare cu patogeni sau alergeni din sursele animale.
- Produce colagen cu specificații precise și structură controlată.
- Reduce impactul asupra biodiversității animale.

Aceste modificări subtile au condus la existența a 28 de tipuri diferite de colagen, dintre care majoritatea aparțin tipurilor I, II și III.

Colagenul de tip I este cel mai abundent tip de colagen din organismul uman și reprezintă o componentă structurală fundamentală a țesutului conjunctiv. Este prezent în piele, oase, tendoane, ligamente și cornee. Este format dintr-o structură triplu-elicoidală, alcătuită din două lanțuri alfa-1 (COL1A1) și un lanț alfa-2 (COL1A2), aranjate într-o configurație specifică.

Structura secvențială

La fel ca alte tipuri de colagen, colagenul de tip I urmează un model repetitiv tripeptidic: Gly-X-Y, unde X este frecvent prolină, iar Y este deseori hidroxiprolină sau hidroxilizină. Structura chimică grafică este prezentată în figura A.9.1.

Un fragment reprezentativ din lanțul α-1 al colagenului de tip I și II este prezentat în ec. (9.1):

Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp (9.1)

Structura completă a lanțurilor:

- lanțurile α-1 – reprezentat de secvențe repetitive mai lungi de tipul Gly-X-Y;
- lanțurile α-2 – este similar cu α-1, dar cu ușoare variații de secvență pentru funcționalitate.

Caracteristici ale colagenului de tip I:

- structura triplu-helicoidală oferă rezistență mecanică și elasticitate;
- bogat în aminoacizi glicină, prolină și hidroxiprolină, cu o proporție mai mică de hidroxilizină;

- cele trei catene polipeptidice (triplu-helix) sunt organizate într-o spirală rigidă, legată prin legături de hidrogen;
- lanțurile triplu-helix se autoasamblează în fibrile mai mari, stabilizate de legături încrucișate covalente.

Rolul în organism:

- conferă pielii elasticitate și rezistență la tracțiune;
- oferă oaselor un suport organic pentru depunerea sărurilor minerale;
- oferă tendoanelor și ligamentelor rezistență la întindere și flexibilitate;
- oferă corneei claritate și structură pentru transmiterea luminii.

Colagenul de tip II este o componentă structurală esențială a cartilajului hialin și a altor țesuturi conjunctive, fiind implicat în menținerea elasticității și rezistenței mecanice a articulațiilor. Acest tip de colagen este compus exclusiv din lanțuri α-1 care formează o structură triplu-helicoidală caracteristică.

Similar altor tipuri de colagen, colagenul de tip II are o secvență repetitivă de tip: Gly-X-Y, unde X este adesea prolină (Pro), iar Y este hidroxiprolină (Hyp) sau hidroxilizină (Hyl).

Caracteristici:

- structura triplu-helicoidală este constituită din trei lanțuri α-1 identice. Este bogat în glicină, prolină și hidroxiprolină, care conferă stabilitate structurii;
- spre deosebire de colagenul de tip I, fibrilele de colagen de tip II sunt mai fine și sunt optimizate pentru a suporta presiuni constante.
- spre deosebire de colagenul de tip I, fibrilele de colagen de tip II sunt dispersate în matricea extracelulară.

Rolul în organism:

- constituie aproximativ 50% din totalul proteinelor cartilajului și 85-90% din colagenul prezent;
- menține elasticitatea și rezistența mecanică;
- contribuie la formarea corpului vitros și a cartilajului elastic din urechea internă și ochi.

Colagenul de tip III este un component structural major al țesutului conjunctiv și este format predominant din fibre reticulare. Secvența lui primară urmează același model repetitiv caracteristic colagenului, având repetarea tripeptidică glicină-X-Y, cu X și Y fiind predominant prolina și hidroxiprolina.

Caracteristici ale colagenului de tip III:

- repetitivitatea Gly la fiecare al treilea aminoacid este esențială pentru formarea structurii triplu-helicoidale;
- are un conținut ridicat de Pro și Hyp care conferă rigiditate și stabilitate elicei triple;

- formează fibre fine și este asociat cu colagenul de tip I, contribuind la elasticitatea țesutului.

Aplicații:

Colagenul de tip III recombinant este utilizat în regenerarea pielii, vindecarea rănilor și în alte aplicații biotehnologice și medicale.

Proteine recombinante – cheratina

Cheratina este o proteină structurală fibroasă, prezentă în mod natural în păr, piele și unghii, fiind esențială pentru menținerea integrității, elasticității și rezistenței acestor structuri. În domeniul cosmetic, cheratina este utilizată pentru a repara, întări și îmbunătăți sănătatea părului și a pielii, fiind un ingredient important în produsele de îngrijire personală.

Cheratina utilizată în cosmetică provine în general din surse animale, precum lână, pene sau copite, dar există și variante sintetice și vegetale obținute prin biotehnologii moderne. Este principalul component al cuticulelor de păr și al stratului cornos al epidermei, oferind protecție împotriva agresiunilor mecanice, chimice și de mediu.

Cheratina are numerose proprietăți, precum: reparatoare și protectoare – ajută la refacerea cuticulei de păr deteriorate, formează un strat protector pe firul de păr sau pe piele, reducând pierderile de umiditate, leagă moleculele de apă, contribuind la menținerea hidratării naturale, îmbunătățește elasticitatea părului și a pielii, reducând ruperea și fragilitatea. Deoarece este similară cu proteinele naturale din corp, cheratina este bine tolerată și eficientă.

Tipuri de cheratină în cosmetice

- Cheratina hidrolizată – este obținută prin descompunerea cheratinei în fragmente mai mici pentru a fi mai ușor absorbită. Este utilizată frecvent în produse pentru repararea părului deteriorat.
- Cheratina solubilă – poate fi dizolvată în apă, fiind mai ușor integrată în formulele cosmetice.

  Ideală pentru tratamente *leave-in* (folosită fără clătire) și seruri pentru păr.
- Cheratina nativă – este intactă din punct de vedere structural și este mai potrivită pentru aplicări locale, însă are o absorbție redusă.
- Cheratina vegetală – alternativă vegană, obținută din proteine vegetale (grâu, soia, orez). Are proprietăți similare cu cheratina animală, dar cu biodisponibilitate ușor diferită.
- Cheratina cu aminoacizi adăugați – formulată pentru a include aminoacizi esențiali (cistină, metionină) pentru regenerarea și întărirea părului.

Cheratina recombinantă, similar celei naturale, este o proteină fibroasă, dar cu anumite particularități legate de structura chimică, determinate de procesul de sinteză biotehnologică (Fig. A.9.2).

1. Secvența primară (secvența aminoacizilor)

Secvența de aminoacizi a cheratinei recombinante este similară cheratinei native, dar poate fi modificată pentru a îmbunătăți stabilitatea, solubilitatea sau eficiența în utilizările industriale. Secvența aminoacizilor poate fi obținută prin inginerie genetică, iar microorganismele (de obicei *E. coli, Pichia pastoris*) sau celulele de mamifere sunt modificate genetic pentru a produce cheratină recombinantă cu o secvență specifică. Secvența repetitivă caracteristică cheratinei este (a–b–c–d–e–f–g), unde a și d sunt de obicei aminoacizi hidrofobi care favorizează formarea structurii de α-helix și stabilizarea fibrelor de cheratină.

2. Secvența secundară

Cheratina este o proteină α-helix sau β-pilată, în funcție de tipul specific de cheratină. Structura secundară depinde de secvența aminoacizilor și de interacțiunile chimice dintre aceștia. Aranjarea în α-helix este o caracteristică-cheie a cheratinei naturale și este esențială pentru proprietățile sale mecanice, cum ar fi rezistența la tracțiune și elasticitatea. În cheratina recombinantă, secvențele aminoacizilor pot fi modificate în funcție de aplicațiile dorite (de exemplu, îmbunătățirea stabilității termice sau mecanice).

3. Secvența terțiară

Interacțiunile hidrofobe dintre aminoacizi sunt cruciale în stabilizarea structurii terțiare a cheratinei. Aceste interacțiuni permit formarea unor straturi fibroase și contribuie la rigiditatea cheratinei. Punțile disulfidice între cisteină și alte grupe tiol contribuie semnificativ la stabilitatea structurală a cheratinei. Aceste punți covalente sunt importante pentru formarea unor fibre stabile. În cheratina recombinantă, punțile disulfidice pot fi reglate prin condițiile de cultură sau prin modificarea genetică a secvenței aminoacizilor.

4. Secvența cuaternară

Cheratina se organizează în fibre și filamente, care sunt constituite din subunități mai mici. Aceste fibre sunt antrenate în structuri helicoidale sau super-helicoidale datorită interacțiunii între diverse molecule de cheratină. În cheratina recombinantă acest aranjament poate fi influențat de procesul de producție, fiind mai puțin stabil în stadiile inițiale, dar stabilizat prin tehnici de procesare și condiții de purificare.

Modificări posttranslaționale

Cheratina recombinantă nu poate efectua toate modificările posttranslaționale specifice cheratinei naturale (cum ar fi modificările complexe de

glicozilare și hidroxilare), ceea ce poate afecta structura finală a proteinei. Unele procese biotehnologice pot include expresia de enzime specifice pentru a simula aceste modificări, de exemplu, folosind prolil hidroxilaze pentru a adăuga grupuri hidroxil la prolină, ameliorând stabilitatea cheratinei.

Proprietăți chimice specifice

- Cheratina recombinantă poate prezenta un comportament diferit în funcție de pH-ul mediului, fiind o proteină relativ acidă sau bazică.
- Cheratina este mai puțin solubilă în soluții apoase decât alte proteine, dar în forma sa recombinantă solubilitatea poate fi reglată prin condițiile de cultură și prin modificări genetice.

Deși cheratina recombinantă își păstrează multe dintre caracteristicile structurale ale cheratinei naturale, există diferențe semnificative în ceea ce privește modificările posttranslaționale și stabilitatea structurală, ceea ce face ca cheratina recombinantă să aibă, în unele cazuri, o performanță mai scăzută în aplicațiile care necesită o cheratină extrem de stabilă, cum ar fi în formarea de filamente sau în utilizarea medicală.

Astfel, cheratina recombinantă este o proteină cu o structură chimică similară cu cea a cheratinei naturale, dar cu anumite diferențe generate de metodele de producție și de condițiile de inginerie genetică, care pot influența atât stabilitatea, cât și proprietățile sale funcționale. Aceste diferențe sunt importante pentru utilizările în cosmetică, medicină și în alte aplicații industriale.

Obținerea cheratinei recombinante include câteva etape principale:

1. Identificarea genei. Izolarea genelor responsabile de sinteza cheratinei în organismul sursă (uman, animal, păsări). Cel mai frecvent sunt izolate genele pentru cheratinele de tip I și II, care formează filamentele intermediare.

2. Sinteza și clonarea genelor. Gena cheratinei este inserată într-un vector plasmidic, care ulterior este introdus într-un organism gazdă. În calitate de gazdă pot fi: *E. coli*, pentru expresie rapidă și costuri reduse, dar fără modificări posttranslaționale; drojdiile (*Pichia pastoris*) permit modificări posttranslaționale limitate; celule de mamifere asigură glicozilarea și alte modificări complexe.

3. Fermentarea. Organismele gazdă sunt cultivate în bioreactoare, unde în procesele de fermentare produc cheratina sub formă de proteine solubile sau incluse în corpuri de incluziune.

4. Purificarea. După terminarea etapei de fermentare soluția nativă este supusă procesului de purificare. Se utilizează tehnici de purificare precum cromatografia pe coloană sau centrifugarea pentru a separa cheratina recombinantă de alte proteine.

Proprietățile cheratinei recombinante:

- rezistență mecanică ridicată;
- elasticitate, oferă flexibilitate materialelor în care este utilizată;
- biocompatibilitate, cheratina recombinantă este sigură pentru utilizarea în aplicații cosmetice și medicale;
- solubilitate ajustabilă, prin modificarea condițiilor de producție, cheratina poate fi obținută într-o formă solubilă, utilizabilă în formule cosmetice;
- funcționalitate chimică diversă, grupele tiolice reactive (cisteină) din cheratină permit formarea legăturilor disulfurice, contribuind la stabilitatea proteinelor.

Proteine recombinante – toxina botulinică A (Botox)

Toxina botulinică A (cunoscută sub numele de *Botox*) este o proteină neurotoxică produsă de bacteria *Clostridium botulinum*. Ea este una dintre cele mai puternice toxine cunoscute și este utilizată în scopuri terapeutice și cosmetice datorită capacității sale de a inhiba semnalele nervoase, paralizând temporar mușchii. Forma recombinantă a toxinei botulinice A este utilizată pe scară largă în medicina estetică, dar și în tratamentele pentru diverse afecțiuni neurologice. Actualmente sunt cunoscute șapte tipuri principale de toxină botulinică, denumite de la A la G (A, B, C_1, C_2, D, E, F și G). Ocazional pot fi identificate noi tipuri de toxină. Tipurile A și B sunt cele care pot provoca maladii oamenilor și sunt utilizate în scopuri comerciale și medicale. Tipurile C–G sunt mai puțin frecvente; tipurile E și F la fel pot provoca maladii oamenilor, iar celelalte tipuri cauzează boli la alte specii de animale.

Structura proteică

- Toxina botulinică de tip A este o proteină cu o masă moleculară de aproximativ 150 kDa. Aceasta este formată dintr-o unitate cu masă moleculară mare (*H*) și o unitate cu masă moleculară mică (*L*) conectate printr-o legătură disulfurică (Fig. A.9.3).
- Unitatea *H* are rolul de a se lega de receptorii membranelor celulelor nervoase și de a media intrarea unității ușoare (*L*) în citoplasmă.
- Unitatea *L* este responsabilă de activitatea enzimei, care inhibă eliberarea neurotransmițătorului acetilcolină, cauzând paralizia musculară temporară.

Mecanismul de acțiune

Toxina botulinică A acționează prin blocarea eliberării de acetilcolină la nivelul sinapsei neuromusculare. Acetilcolina este un neurotransmițător necesar în transmiterea semnalelor nervoase de la neuronii motori către mușchii scheletici. Fără acetilcolină, mușchii nu mai primesc semnalul de contracție și rămân relaxați,

ceea ce produce efectul de paralizie temporară. Acest mecanism este utilizat atât în scopuri estetice (pentru reducerea ridurilor), cât și terapeutice (pentru tratarea spasmelor musculare și altor afecțiuni neurologice).

Toxina botulinică de tip B (Myobloc) este utilizată în cosmetică și tratamentele estetice pentru reducerea ridurilor și a semnelor de îmbătrânire. Deși este mai puțin frecvent utilizată decât toxina botulinică de tip A (Botox), aceasta are un mecanism similar de acțiune, dar cu unele diferențe în modul în care influențează activitatea musculară. Toxina botulinică B se leagă la terminațiile nervoase motorii, inhibând eliberarea acetilcolinei. Această inhibiție blochează transmiterea semnalului nervos la nivelul mușchilor, rezultând într-o paralizie temporară a acestora.

Toxina botulinică de tip A și B este produsă prin biotehnologie, printr-un proces de *clonare moleculară* a genei care codifică toxina și exprimarea acesteia în microorganisme, cum ar fi *Escherichia coli* sau *Clostridium botulinum* modificate genetic. Procesul de producție implică purificarea proteinei și asigurarea siguranței toxice și eficienței pentru utilizarea umană.

Utilizări ale toxinei botulinice A și B recombinante

Toxina botulinica A are numeroase aplicații practice, precum:

1. Medicina estetică

Cel mai cunoscut utilizator al toxinei botulinice A este medicina estetică, pentru tratarea ridurilor faciale, în special a celor de pe frunte, între sprâncene și în colțurile ochilor (laba gâștei). Injecțiile cu toxină botulinică A relaxează mușchii care formează aceste riduri, oferind un aspect mai neted și mai tânăr al pielii.

2. Medicina generală

Toxina botulinică A este utilizată pentru tratamentele de spasm muscular și distonie, care sunt tulburări în care mușchii se contractă involuntar și pot provoca dureri și disfuncții. Exemple includ blefarospasmul (spasmul pleoapelor), spasticitatea cervicală și distonia generalizată.

Toxina botulinică A este aprobată pentru utilizarea în tratamentul migrenelor cronice, reducând frecvența și severitatea atacurilor de migrenă.

Este utilizată pentru a trata hiperhidroza axilară, o afecțiune caracterizată prin transpirație excesivă, prin blocarea semnalelor nervoase care stimulează glandele sudoripare.

În anumite cazuri, toxina botulinică A poate fi utilizată pentru a trata incontinența urinară asociată cu hiperactivitatea vezicii urinare, prin injectarea toxinei direct în mușchii vezicii urinare pentru a reduce contracțiile involuntare.

Toxina botulinică B poate fi utilizată pentru a reduce ridurile faciale, inclusiv ridurile din jurul ochilor (riduri de expresie) și frunte. Aceasta este utilizată în mod similar cu Botox, dar acționează mai rapid și poate fi o opțiune pentru pacienții care nu reacționează la toxina botulinică de tip A. Deși mai frecvent tratată cu toxina A, toxina botulinică B poate fi utilizată în cazuri de transpirație excesivă (hiperhidroză) atunci când alte opțiuni nu sunt eficiente. Poate fi utilizată pentru a trata anumite asimetrii faciale, inclusiv corectarea mișcărilor musculare necontrolate care pot duce la aspecte inestetice.

Avantajele toxinei botulinice B față de A

De obicei, efectele toxinei botulinice B sunt mai reduse în comparație cu toxina botulinică A, ceea ce poate fi un avantaj în anumite tratamente estetice care necesită ajustări rapide. Unii pacienți pot dezvolta o rezistență la toxina botulinică A, iar toxina botulinică B poate fi utilizată ca alternativă eficientă. Cu toate acestea, toxina botulinică B este utilizată mai rar în cosmetică în comparație cu Botox, dar poate fi o opțiune valoroasă pentru anumite cazuri.

9.3. Biotehnologia producerii insulinei: materii prime, etape de prefermentare, biosinteză, izolare și purificare

Insulina este un hormon proteic, cu o masă moleculară de 5808 Da, esențial în reglarea metabolismului hidraților de carbon și al altor substanțe din organism, fiind produsă de pancreas, mai exact de celulele *β*- ale insulelor *Langerhans*. Rolul principal al insulinei este de a regla nivelul de glucoză din sânge, facilitând absorbția acesteia în celule pentru a fi utilizată ca sursă de energie. Un deficit de insulină sau absența răspunsurilor celulare adecvate la insulina disponibilă poate duce la diabet zaharat de tip 1 sau 2.

Insulina și glucagonul sunt hormoni produși de pancreas care reglează glicemia (nivelul de glucoză din sânge). Insulina stimulează polimerizarea glucozei în glicogen (proces numit glicogeneză), determinând scăderea glicemiei (hipoglicemie – micșorarea concentrației de glucoză în sânge). De asemenea, insulina promovează absorbția glucozei în celule și utilizarea acesteia ca sursă de energie.

Glucagonul catalizează reacția opusă, stimulând degradarea glicogenului la glucoză (proces numit glicogenoliză) și creșterea glicemiei (hiperglicemie – creșterea concentrației de glucoză în sânge). Glucagonul stimulează și producția de glucoză în ficat prin gluconeogeneză (sinteza de glucoză din precursori non-carbohidrați).

Insulina este compusă din două catene polipeptidice (***Bicatenară)***: catena A, formată din 21 de aminoacizi, și catena B, formată din 30 de aminoacizi.

Insulina prezintă două punți disulfurice intercatenare și o punte disulfurică la nivelul catenei A. Glucagonul este monocatenar, conține 29 fragmente de aminoacizi, aminoacidul N-terminal este histidină și aminoacidul C-terminal este treonină (Fig. A.9.4).

Proinsulina, precursorul inactiv al insulinei, conține 74 de aminoacizi, are o masă moleculară de aproximativ 5808 Da și un punct izoelectric de 5,5. Proinsulina este relativ inactivă din punct de vedere biologic. După scindarea proteolitică a acesteia în două locuri specifice se formează catenele A și B ale insulinei active, precum și peptida C, care este biologic inactivă.

Conexiunea structurală antiparalelă dintre C-terminalul catenei A și N-terminalul catenei B contribuie la formarea insulinei active. Proinsulina, insulina și peptida C sunt stocate în granulele secretorii ale celulelor *β*- din insulele *Langerhans* și sunt eliberate ca răspuns la stimulii glicemici.

Un pancreas adult sănătos conține aproximativ 200 de unități de insulină stocată, iar secreția zilnică de insulină în sistemul circulator la persoanele sănătoase variază între 30 și 50 de unități.

Diabetul zaharat este o afecțiune caracterizată prin disfuncții legate de sinteza, secreția sau de utilizarea incorectă a insulinei de către organism, ceea ce induce hiperglicemie în sânge și urină.

Diabetul zaharat de tip I este o formă autoimună a maladiei, în care pancreasul nu mai produce insulină din cauza distrugerii celulelor *β*- ale insulelor *Langerhans*. Această distrugere poate fi cauzată de factori genetici, infecții virale sau boli autoimune. Tratamentul constă în administrarea de insulină prin injecții subcutanate sau dispozitive de livrare continuă, cum ar fi pompele de insulină.

Diabetul zaharat de tip II este asociat în principal cu stilul de viață, cum ar fi obezitatea, dieta nesănătoasă și sedentarismul. În această formă de diabet, pancreasul produce insulină, dar în cantități insuficiente sau organismul devine rezistent la efectele acesteia. În etapele inițiale, tratamentul include modificarea stilului de viață și utilizarea medicamentelor care stimulează producerea de insulină sau îmbunătățesc sensibilitatea la insulină. În etapele avansate poate fi necesară administrarea insulinei.

În anul 2012 se estima că aproximativ 400 de milioane de oameni sufereau de diabet zaharat la nivel mondial, dintre care mai puțin de 10% erau diagnosticați cu diabet zaharat de tip I.

Înainte de descoperirea insulinei în 1921, pacienții cu diabet zaharat aveau o speranță de viață redusă. Cea mai eficientă terapie disponibilă la acea vreme era o dietă strictă, cu restricții severe asupra consumului de carbohidrați. Această abordare putea prelungi viața pacienților cu câțiva ani, dar nu trata maladia. Din

păcate, aceste diete extreme, de doar 450 de calorii pe zi, duceau adesea la înfometare severă și la deces.

În 1910, Sir Edward Albert Sharpey-Schafer a emis ipoteza că diabetul zaharat este cauzat de lipsa unui singur hormon produs de pancreas. Denumirea „insulină" provine din cuvântul latin *insula*, care înseamnă „insulă", făcând referire la insulele *Langerhans*, structuri ale pancreasului care secretă acest hormon.

În 1921, Frederick Banting, un tânăr chirurg, și colaboratorul său Charles Best au reușit să extragă insulina din pancreasul câinilor. Substanța rezultată era un „nămol gros și brun", fără a fi rafinată, dar avea potențialul de a salva vieți. Leonard Thompson, un băiat de 14 ani aflat într-un spital din Toronto, a devenit în ianuarie 1922 prima persoană care a primit o injecție de insulină. În mai puțin de 24 de ore nivelul său periculos de ridicat al glicemiei a scăzut aproape de normal, marcând un progres remarcabil în tratarea diabetului.

Pentru această descoperire revoluționară, Banting și John Macleod au fost distinși în 1923 cu Premiul Nobel pentru Medicină. Producția de insulină a devenit posibilă la scară industrială datorită companiei farmaceutice Eli Lilly, care a început fabricarea acesteia în masă.

De-a lungul deceniilor, cercetătorii au dezvoltat insuline cu acțiune prelungită, iar Novo Nordisk a introdus prima astfel de insulină în 1936. Insulinele derivate de la bovine și porcine au fost utilizate pe scară largă, salvând milioane de vieți, dar nu erau ideale, deoarece unele persoane dezvoltau reacții alergice la aceste preparate.

Progresul ingineriei genetice, început odată cu descoperirea clonării ADN-ului de către Stanley Cohen și Herbert Boyer, a permis transferul genelor între specii diferite. Această tehnologie a deschis calea pentru producerea proteinelor recombinante cu utilizări medicinale, inclusiv a insulinei.

În 1978, bacteria *Escherichia coli* a fost utilizată pentru a produce prima insulină sintetică „umană" prin modificări genetice. În 1982, Eli Lilly a lansat pe piață prima insulină biosintetică umană, sub denumirea comercială Humulin, aprobată de FDA pentru utilizare în tratamentul diabetului zaharat. Începând cu anul 1982 a început producerea insulinei folosind *Escherichia coli* și *Saccharomyces cerevisiae* modificate genetic. În anul 2010 au fost produse peste 100 tone de insulină.

Insulina utilizată în prezent în terapie:

- Insulina (emp) – obținută prin hidroliza enzimatică a insulinei extrase din pancreasul porcinelor. Este cunoscută și ca insulină semisintetică.
- Insulina (crb) – produsă prin combinarea chimică a catenelor A și B, care sunt sintetizate prin biosinteza efectuată de bacterii modificate genetic.

- Insulina (prb) – obținută din proinsulină, un precursor al insulinei, produsă prin biosinteza realizată de bacterii modificate genetic.
- Insulina (pyr) – produsă dintr-o peptidă precursor, obținută prin biosinteza realizată de drojdii modificate genetic.

Analogi comerciali ai insulinei

Insulina Lispro (Humalog) – este o variantă de insulină umană în care aminoacizii lizină (Lys) și prolină (Pro) sunt repoziționați. În loc de secvența naturală Pro28-Lys29 din lanțul B al insulinei umane, Lispro are secvența inversată, Lys28-Pro29. Această modificare determină o acțiune rapidă a insulinei, făcând-o utilă pentru administrare imediat înainte de masă. Insulina Lispro este produsă prin fermentare, folosind microorganisme modificate genetic prin tehnologia ADN-ului recombinant. Acțiune rapidă, vârf de acțiune la 30-90 de minute și o durată de acțiune de 3-5 ore. *Indicație* – este utilizată pentru controlul glicemiei în timpul meselor și pentru a reduce hiperglicemia postprandială.

Insulina Glargine (Lantus, Toujeo) – acest tip de insulină este obținută prin modificarea genetică a bacteriilor *E. coli* (tulpina K12). Capătul C-terminal al catenei B a fost extins cu două fragmente de arginină (agr31arg32), iar aminoacidul asparagina (Asn), de la capătul C-terminal al catenei A, a fost înlocuit cu glicină (gly21). Acest tip de insulină are o acțiune prelungită. Aceste modificări structurale determină un punct izoelectric apropiat de un pH neutru, ceea ce duce la o disociere întârziată a structurii hexamerice a insulinei după injectarea subcutanată. Acțiune prelungită, fără vârf semnificativ, cu o durată de acțiune de până la 24 de ore. *Indicație* – este utilizată pentru controlul glicemiei de bază pe termen lung, fiind o alegere frecventă pentru tratamentul diabetului de tip 1 și de tip 2.

Degludec (Tresiba) – în această insulină, aminoacidul Thr30 din catena B este substituit cu acid glutamic (Glu) legat printr-o legătură amidică (numită și acid hexadecanoil, AH). Această modificare structurală face ca insulina degludec să se disocieze mult mai lent, având o acțiune prelungită. Astfel, secvența aminoacidică a insulinei umane, Lys29Thr30, devine Lys29GluAH (degludec). Are o durată de acțiune de până la 42 de ore, fără vârf semnificativ, oferind flexibilitate în administrare. *Indicație* – este folosită pentru controlul glicemiei pe termen lung, la pacienții cu diabet zaharat de tip 1 și de tip 2.

Insulina Aspart (NovoRapid, Fiasp) – insulină cu acțiune rapidă, în care aminoacidul Pro este substituit prin Asp în poziția 28 a catenei B. Acționează rapid, cu vârf la 1-3 ore și o durată de acțiune de 3-5 ore. *Indicație* – folosită pentru controlul glicemiei la pacienții cu diabet zaharat, în special în timpul meselor.

Insulina Glulisine (Apidra) – este o insulină cu acțiune rapidă. Această insulină conține modificări în pozițiile 3 și 29 ale catenei B, care facilitează o

absorbție rapidă. Este caracterizată printr-o acțiune rapidă, cu vârf la 1-2 ore și o durată de acțiune de aproximativ 4-5 ore. *Indicație* – este folosită pentru controlul glicemiei postprandiale.

Insulina Detemir (Levemir) – este o insulină cu acțiune prelungită, în care a fost substituit un aminoacid din catena B și atașat un acid gras (acilare) pentru a-i conferi o durată lungă de acțiune. Se caracterizează printr-o acțiune lentă și constantă, cu vârf la 6-8 ore și o durată de acțiune de aproximativ 12-24 de ore. *Indicație* – este utilizată pentru controlul glicemiei de bază, oferind un control pe termen lung al glicemiei.

Insulina NPH (Humulin N, Novolin N) – este o insulină cu acțiune intermediară. Pentru obținerea acesteia insulina umană este amestecată cu protamina, ceea ce permite o eliberare mai lentă și o durată medie de acțiune. Se caracterizează printr-o acțiune intermediară, cu vârf la 4-8 ore și o durată de acțiune de 12-16 ore. *Indicație* – este utilizată pentru controlul glicemiei pe termen mediu, adesea administrată o dată sau de două ori pe zi.

Materii prime folosite la producerea biotehnologică a insulinei

Insulina poate fi produsă prin diferite procese biotehnologice, care variază în funcție de tipul microorganismelor utilizate, precum și de metodele de izolare și purificare. În prezent, cele mai utilizate procese sunt cele care implică *E. coli* și *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. A.9.5).

Compoziția mediului nutritiv utilizat în producerea insulinei cu ajutorul bacteriilor *Escherichia coli* trebuie optimizat pentru susținerea creșterii bacteriilor și producerea eficientă a insulinei. Mediul nutritiv trebuie să furnizeze surse de carbon, azot, minerale, vitamine și alți factori de creștere necesari pentru metabolismul bacterian și sinteza proteică. Un exemplu de compoziție a unui mediu de cultură standard utilizat în procesul de fermentare la scară industrială pentru producerea insulinei cu ajutorul *E. coli* este prezentat în tabelul 9.2.

Tabelul 9.2. Compoziția mediului nutritiv standard utilizat în procesul de fermentare la scară industrială pentru producerea insulinei cu ajutorul *E. coli*

Materia primă	Concentrație, g/L	Rol
Surse de carbon		
Glucoză ($C_6H_{12}O_6$)	20-30	Sursa principală de carbon pentru metabolismul bacteriilor
Lactoză	10-20	Uneori utilizată ca sursă suplimentară de carbon, în special pentru inducerea expresiei genelor
Surse de azot		
Peptonă	10-15	Sursa principală de azot, aminoacizi și proteine care sunt

		folosite de bacterii pentru creștere și producția de insulină
Extract de drojdie	5-10	Surse suplimentare de aminoacizi, vitamine și minerale
Amoniu (NH_4Cl sau $(NH_4)_2SO_4$)	1-3	Surse de azot anorganic pentru sinteza proteinelor și creșterea bacteriană
Săruri minerale		
Sulfat de magneziu ($MgSO_4$)	0,2-0,5	Esențial pentru enzimele de metabolism și stabilitatea membranelor celulare
Fosfat de potasiu (K_2HPO_4)	1-3	Stabilizează pH-ul mediului și susține metabolismul energetic
Fosfat de sodiu (NaH_2PO_4)	1-3	Contribuie la menținerea pH-ului și susținerea metabolismului celular
Clorură de sodiu (NaCl)	1-3	Menține echilibrul osmotic al mediului de cultură
Vitamine		
Vitamina B_1 (Tiamină)	0,01-0,10 mg/L	Cofactor pentru enzimele implicate în metabolismul carbonului
Vitamina B_2 (Riboflavină)	0,01-0,10 mg/L	Cofactor pentru reacțiile de oxido-reducere
Biotina (vitamina H sau B_7)	0,01-0,1 mg/L	Susține metabolismul celular
Alți factori de creștere		
Amestec de aminoacizi (*L*-arginină, *L*-glutamină, *L*-leucină)	1-2	Susțin metabolismul bacteriilor și sinteza proteică
Inducători (pentru expresia genetică)		
IPTG (Izopropil-*β*-*D*-tiogalactopiranozid)	0,1-1,0 mM	Induce expresia genei de insulină în *E. coli*
Agenți de tamponare		
Acetat de sodiu (CH_3COONa)	10-15	Contribuie la menținerea pH-ului optim de creștere a bacteriilor și exprimarea genelor
Menținerea pH-ului		
Acid clorhidric (HCl)	După necesitate, pentru a regla pH-ul	Reglarea pH-ului în intervalul optim pentru *E. coli* (pH 6-7)

Glucoza este principalul substrat energetic, iar lactoza poate fi folosită pentru inducerea expresiei proteinei de interes (în cazul în care insulina este exprimată sub controlul unui promotor reglat de lactoză). Peptonele și extractul de drojdie sunt folosite pentru a furniza aminoacizi și proteine necesare bacteriilor. Sărurile de amoniul (NH_4Cl) oferă azot anorganic. Sărurile minerale sunt necesare

pentru susținerea activității enzimatice și a integrității celulare. Vitaminele sunt necesare pentru procesele metabolice ale celulelor. Agenții de inducție sunt utilizați pentru activarea genelor care codifică insulina, în cazurile în care există un sistem de expresie bazat pe inducere.

În timpul procesului de fermentare este important să se mențină un pH optim pentru creșterea bacteriilor și activitatea enzimatică, care variază între 6 și 7.

Producerea insulinei prin intermediul *Escherichia coli* implică mai multe etape biotehnologice, de la introducerea genei care codifică insulina până la purificarea și formularea produsului final; un exemplu de flux tehnologic este prezentat în figura A.9.6.

1. *Izolarea genei care codifică insulina*

La această etapă se izolează secvența genetică care codifică insulina umană din ADN-ul uman folosind tehnici de clonare moleculară. Aceasta include utilizarea de enzime de restricție pentru a izola ADN-ul în secvențe specifice. Gena care codifică insulina este introdusă într-un plasmid, un fragment mic de ADN care poate fi ușor manipulat și introdus în *E. coli*.

2. *Clonarea genei în E. coli*

Plasmidul care conține gena insulinei este introdus în *E. coli* printr-un proces numit transformare. Aceasta presupune tratamente chimice sau electrice care permit bacteriilor să absoarbă plasmidul. *E. coli* modificate genetic sunt cultivate într-un mediu nutritiv care conține substanțe necesare pentru creșterea bacteriilor și exprimarea genei de insulină.

3. *Inducerea expresiei proteinei*

În această etapă, un compus chimic (de exemplu, IPTG) se adaugă în cultura bacteriană pentru a activa expresia genei de insulină. Acesta controlează momentul în care *E. coli* începe să producă insulina recombinantă. După adăugarea IPTG-ului, *E. coli* începe să producă insulină în cantități mari. Proteina produsă este de obicei exprimată sub formă de precursor, care necesită procese suplimentare pentru a deveni activă.

4. *Izolarea și extragerea insulinei*

După ce *E. coli* a produs insulină, bacteriile sunt supuse unui proces de liză celulară (descompunere) pentru a elibera proteinele produse, inclusiv insulina. Insulina este recuperată din suspensie prin diferite metode, inclusiv centrifugare.

5. *Refacerea insulinei active*

La început, insulina produsă este într-o formă inactivă, numită proinsulină. Aceasta trebuie să fie procesată pentru a deveni activă. Procesul include scindarea legăturilor peptidice care leagă lanțurile A și B ale moleculei de insulină și

eliminarea peptidului C. În mod frecvent, se folosesc enzime ca tripsina sau alte proteaze pentru a facilita această conversie.

6. *Purificarea insulinei*

Insulina obținută este purificată prin metode cromatografice care au la bază separarea proteinelor după dimensiune, sarcină, afinitate sau gel de filtrare. Prin purificarea insulinei are loc înlăturarea diferitor contaminanți, inclusiv proteine. Gradul de puritate a insulinei este monitorizat riguros, astfel încât acesta să corespundă standardelor de calitate prevăzute în acest sens.

7. *Formularea și ambalarea*

După purificare, insulina poate fi formulată sub diferite forme farmaceutice, cum ar fi soluții sau suspensii pentru injectare. Înainte de a fi ambalată și distribuită, insulina este supusă unor teste riguroase de siguranță și eficiență. Pentru utilizarea medicală insulina este ambalată în fiole sau cartușe.

Schema tehnologică de obținere a insulinei pe cale biotehnologică prin intermediul *E. coli* este prezentată în figura 9.2. Procesul de fermentare are loc în bioreactoare cu o capacitate de 40–60 m^3 (de exemplu, reactorul 2, Fig. 9.2), folosind culturi de *E. coli* modificate genetic.

În cazul folosirii tulpinii *E. coli K12*, procesul de fermentare se desfășoară în bioreactor cu capacitatea de 40 m^3, timp de 30 de ore, la temperatura de 37,0ºC.

Pe parcursul procesului de fermentare se monitorizează parametrii pH-ului, gradul de aerare (pO_2), temperatura, conținutul de glucoză, gradul de agitare etc.

E. coli utilizată în biosinteză conține plasmide modificate genetic, care integrează genele necesare pentru sinteza insulinei. Expresia genelor implicate în biosinteza insulinei este activată de substanțe chimice specifice, numite promotori. De exemplu, promotorul lac, derivat din operonul lac al bacteriilor *E. coli*, este un promotor inducibil utilizat frecvent în procesele de expresie genetică. Inductorul utilizat este izopropil *β-D*-1-tiogalactopiranozidă (IPTG), un analog nehidrolizabil al lactozei, care se leagă de represorul LacI și inhibă acțiunea acestuia, permițând astfel exprimarea genelor de interes. Este adesea folosit pentru producerea proteinelor, inclusiv a insulinei.

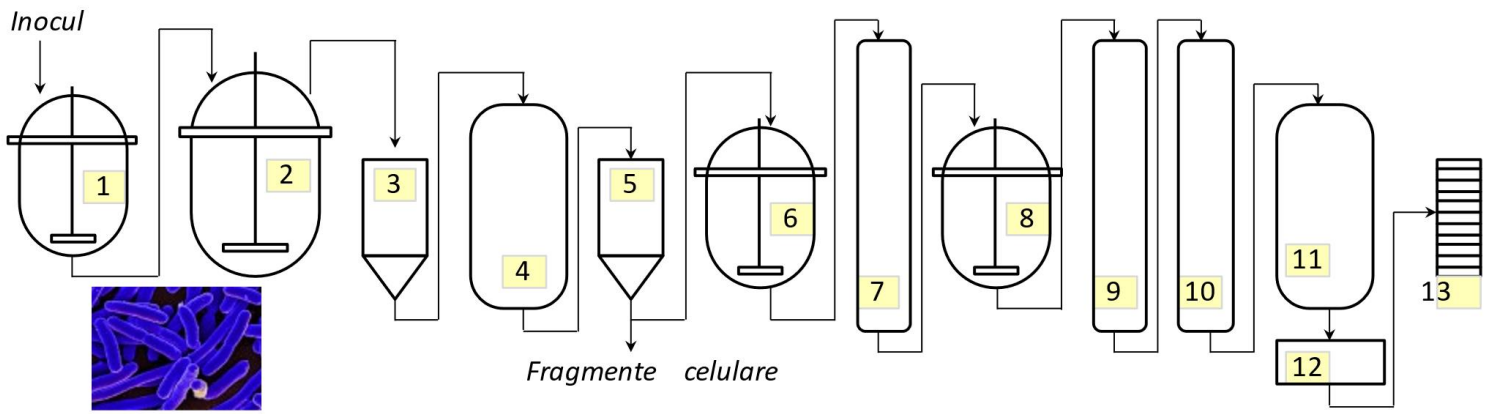


Figura 9.2. Schema tehnologică de obținere a insulinei pe cale biotehnologică prin intermediul *Escherichia coli*

1 – bioreactor pentru inocul; 2 – fermentator; 3 – centrifugă ; 4 – omogenizator de înaltă presiune; 5 – centrifugă; 6 – rezervor pentru denaturarea proteică; 7 – coloană cromatografică; 8 – reactor cu carboxipeptidaza B; 9 – coloană cromatografică de schimbători de ioni; 10 – coloană HPLC; 11 – rezervor pentru cristalizarea insulinei; 12 – filtru; 13 – liofilizator.

Inducerea expresiei genelor de biosinteză a insulinei are loc la o anumită densitate a biomasei. Procesul de fermentare se desfășoară la o densitate celulară înaltă și la un aport important de oxigen. Aportul de glucoză trebuie adaptat astfel încât să nu se formeze acetatul, un produs secundar al biosintezei. O agitare eficientă asigură îndepărtarea căldurii care se formează în timpul procesului de fermentare. *E. coli K12* modificată genetic poate produce până la 40% din masa sa de proinsulină. Într-un proces care durează 30 de ore se obțin 2,5 g de insulină umană per m³ de biomasă. Dacă fermentarea are loc într-un reactor cu capacitatea de 40 m³, se obțin 100 g de insulină. Procesul de fermentare pentru producerea insulinei folosind *Escherichia coli K12* modificate genetic durează de obicei între 24 și 48 de ore, în funcție de condițiile de cultură și de tipul de fermentator utilizat.

Inițial *E. coli K12* se inoculează pentru multiplicare în bioreactorul (**1**) (Fig. 9.2), într-un mediu de cultură optimizat, care include surse de carbon (de obicei glucoză), azot, minerale și alți nutrienți. De asemenea, temperatura este reglată la aproximativ 37ºC, iar oxigenul este monitorizat pentru a asigura o creștere sănătoasă a bacteriilor și pO_2 trebuie să fie între 30 și 40% din saturația maximă a oxigenului. Această etapă durează între 20 și 24 de ore.

După atingerea unei densități celulare adecvate, inoculul se trece în biorectarul **(2)**, unde are loc procesul de fermentare, care durează 8-12 ore. La această etapă se adaugă un agent de inducție (de obicei IPTG) pentru a activa expresia genelor care codifică insulina. În această perioadă bacteriile produc proinsulina. După inducerea expresiei, proinsulina continuă să se acumuleze în celulele bacteriene sau în mediul de cultură, până la încheierea procesului de fermentare.

Prin urmare, întregul proces de fermentare pentru producerea insulinei de *E. coli K12* durează aproximativ 30-48 de ore.

La finalul procesului de fermentare bioamestecul este concentrat, apoi centrifugat în centrifuga **(3)**. Ulterior, celulele separate sunt lezate în omogenizatorul de înaltă presiune sub presiune, proces în urma căruia se eliberează corpii de incluziune în unitatea **(4)**. Fragmentele celulare se separă de corpii de incluziune prin centrifugare în unitatea **(5)**, iar aceștia se solubilizează în prezența unor agenți de denaturare proteică în unitatea **(6)**. Are loc scindarea legăturilor disulfurice (-S-S-) și formarea grupelor tiol, conform ecuației:

$$\text{R-S-S-} + 2[\text{H}] \rightarrow \text{R-SH} + \text{HS-R} \qquad (9.2)$$

Această proinsulină conține catenele proteice A, B, C și PS. Dintre acestea, doar catenele A și B sunt specifice insulinei umane. Schematic acest proces este prezentat în figura A.9.7.

Restabilirea punților disulfurice se face în prezența O_2 la un pH de 10,9 (Fig. A.9.8(a)). În următoarea etapă, catenele proteice suplimentare sunt eliminate prin scindare (clivare) enzimatică. În prezența tripsinei, se scindează regiunea C și PS la nivelul fragmentelor aminoacizilor Lys-Arg și Glu-Arg figura A.9.8(b).

Intermediarul obținut se concentrează și se purifică prin cromatografia ionică în coloana **(7)**. Aceasta permite separarea unor derivați ai insulinei. După reacția cu tripsina, produsul se tratează cu carboxipeptidaza B în reactorul **(8)** sau **(6)**, care scindează fragmentele aminoacizilor bazici terminali, precum Arg sau Lys, rămași după reacția cu tripsina. Astfel, se obține insulina umană (Fig. A.9.8(c)).

Insulina obținută după clivajul enzimatic cu carboxipeptidaza B se purifică inițial prin cromatografia de schimb ionic în coloana (**9**), apoi prin cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversă (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) în unitatea (**10**). După ultima purificare, insulina este cristalizată în rezervorul (**11**), trecută prin filtrul (**12**) și liofilizată în (**13**). Tehnica de liofilizare constă în congelarea insulinei și uscarea acesteia la presiune redusă. În acest proces, apa congelată din insulină este sublimată (gheața trece direct în vapori) și este aspirată la presiune redusă.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați proteinele recombinante în funcție de structură și proprietățile biologice.
2. Caracterizați proteinele recombinante folosite în industria farmaceutică și cosmetică.
3. Explicați diferența dintre proteinele native și cele recombinante.
4. Prezentați structura, biosinteza și proprietățile proteinelor recombinante de interes farmaceutic și/sau cosmetic.
5. Descrieți aplicațiile colagenului și ale cheratinei în cosmetologie și influența lor asupra sănătății pielii și a părului.
6. Descrieți etapele de producere a toxinei botulinum.
7. Descrieți etapele, materiile prime și parametrii tehnici ai proceselor biotehnologice de biosinteză a insulinei recombinante.
8. Propuneți schema tehnologică de producere a insulinei.
9. Propuneți metode de separare și purificare a insulinei recombinante.
10. Argumentați importanța producerii insulinei pe cale biotehnologică.

BIBLIOGRAFIE

1. PHAM, P.V. Medical Biotechnology. In: *Omics Technologies and Bio-Engineering*, 2018, pp. 449–469. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804659-3.00019-1.
2. GÜNTHER, A., RUPPERT, C. Anticoagulants. In: *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, 2006, pp. 115–128. https://doi.org/10.1016/b0-12-370879-6/00028-4.
3. WANG, L., JIANG, R., SUN, X.L. Recombinant Thrombomodulin of Different Domains for Pharmaceutical, Biomedical, and Cell Transplantation Applications. In: *Medicinal Research Reviews*, 2013, 34(3), pp. 479–502. https://doi.org/10.1002/med.21294.
4. KRIEGER, M., KAY, L.M., STROUD, R.M. Structure and specific binding of trypsin: Comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. In: *Journal of Molecular Biology*, 1974, 83(2), pp. 209–230. https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90388-x.
5. ZHOU, N., LIU, Y.D., ZHANG, Y., GU, T. W., PENG, L.H. Pharmacological Functions, Synthesis, and Delivery Progress for Collagen as Biodrug and Biomaterial. In: *Pharmaceutics*, 2023, 15(5), 1443. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051443.
6. WANG, T., LEW, J., PREMKUMAR, J., POH, C.L., WIN NAING, M. Production of recombinant collagen: state of the art and challenges. In: *Engineering Biology*, 2017, 1(1), pp. 18–23. https://doi.org/10.1049/enb.2017.0003.
7. ZHANG, W., FAN, Y. Methods to Synthesize and Assemble Recombinant Keratins. In: *Methods Mol. Biol.*, 2021, pp. 105-112, 2347. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1574-4_10.
8. FEROZ, S., MUHAMMAD, N., RANAYAKE, J., DIAS, G. Keratin - Based materials for biomedical applications. In: *Bioactive Materials*, 2020, 5(3), pp. 496–509. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007.
9. ALYAS, J., RAFIQ, A., AMIR, H., KHAN, S., SULTANA, T., ALI, A., HAMEED, A., AHMAD, I., KAZMI, A., SAJID, T., AHMAD, A. Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production. In: *Biomedical Research and Therapy*, 2021, 8(9), pp. 4540-4561. https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i9.692.
10. GOVENDER, K., NAICKER, T., LIN, J., BAIJNATH, S., CHUTURGOON, A. A., ABDUL, N. S., GOVENDER, T. A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in Escherichia coli (*E. coli*). In: *AMB Express*, 2020, 10(1). https://doi.org/10.1186/s13568-020-00969-w.
11. RIGGS, A.D. Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin. In: *Endocrine Reviews*, 2021, 42(3), pp. 374–380, https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa029.

10. BIOTEHNOLOGIA VITAMINELOR

10.1. Vitamine: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică și/sau cosmetică
10.2. Biosinteza vitaminelor B și C
10.3. Biotehnologia vitaminelor C, B_2 și B_{12}: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Abilități
Studentul:
- clasifică vitaminele;
- compară vitaminele după structură și proprietățile biologice;
- explică importanța vitaminelor în medicamente și în produsele cosmetice;
- prezintă etapele de biosinteză a vitaminelor B și C;
- elaborează schema tehnologică și explică etapele și parametrii tehnici ai unui proces biotehnologic de producere a vitaminelor C, B_2 și B_{12}.

10.1. Vitamine: clasificare, structură, proprietăți chimice, utilizare farmaceutică și/sau cosmetică

Vitaminele sunt substanțe chimice complexe, esențiale pentru funcționarea normală a organismului uman. Organismul nu poate sintetiza vitaminele, motiv pentru care acestea trebuie obținute din alimentație. Ele se găsesc în majoritatea alimentelor de proveniență naturală și sunt indispensabile pentru creșterea, menținerea vitalității și starea generală de bine a organismului.
În funcție de solubilitate, vitaminele se împart în două categorii:

- *liposolubile* (solubile în grăsimi): precum vitamina A (inclusiv provitamina A – carotenul, care se transformă în vitamina A în organism), vitamina D, vitamina E, vitamina K;
- *hidrosolubile* (solubile în apă): vitamina C, vitaminele din complexul B etc.

Aceste substanțe nu sunt distruse în procesul digestiv, fiind absorbite în forma lor naturală. Datorită acestui fapt, toate vitaminele sunt eficiente atunci când sunt administrate pe cale orală.

Clasificarea vitaminelor hidrosolubile, liposolubile și rolul lor în industria farmaceutică și cosmetică sunt prezentate în tabelul A.10.1.

Vitaminele pot fi bioacumulate în organism într-o anumită măsură. De exemplu, vitaminele liposolubile sunt bioacumulate în ficat și în țesutul adipos subcutanat. Vitaminele hidrosolubile practic nu se acumulează. Multe dintre vitamine sunt necesare în cantități foarte mici și au un rol esențial ca cofactori în

majoritatea reacțiilor chimice din organism. Deși nu sunt surse de energie, ele sunt esențiale pentru funcționarea normală a organismului. Multe reacții celulare sunt catalizate de enzime, iar fiecare tip de enzimă este responsabilă pentru desfășurarea unor reacții chimice specifice. Funcționarea unor enzime necesită cofactori, cum ar fi vitaminele și mineralele. Dacă o vitamină lipsește, funcționarea enzimei respective poate fi afectată, iar reacțiile chimice în care este implicată nu vor putea fi îndeplinite corespunzător. Vitaminele își exercită efectul în cantități foarte mici. Prin urmare, necesarul total zilnic este, de obicei, redus. Cantitatea zilnică de vitamine necesară unei persoane variază în funcție de rata metabolismului său. Astfel, persoanele care efectuează munci grele, femeile gravide sau care alăptează și copiii în creștere au nevoie de o cantitate mai mare de vitamine. În general, o persoană cu un efort obișnuit poate obține suficiente vitamine dintr-o dietă echilibrată și variată. Vitaminele sunt parțial distruse și parțial eliminate de organism, dar suplinite cu alimentele.

Din totalitatea vitaminelor pe cale biotehnologică sunt obținute: B_2, B_7, B_{12}, K_2, E; formulele de structură sunt prezentate în figura 10.1.

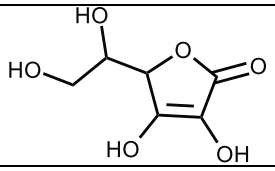
Vitamina B_2 (Riboflavina) – obținută prin fermentare utilizând microorganisme precum *Ashbya gossypii* sau bacterii din genul *Bacillus*.

Vitamina B_{12} (Cobalamina) – produsă prin fermentare folosind bacterii specifice, cum ar fi *Pseudomonas denitrificans* sau *Propionibacterium freudenreichii*. Ciclul corinic legat de un ion central de cobalt.

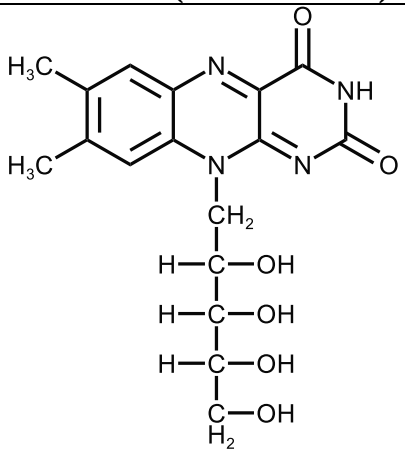
Vitamina C (Acid ascorbic) – fabricată printr-un proces biotehnologic modern bazat pe bacterii precum *Gluconobacter oxydans* pentru conversia glucozei în acid 2-keto-*L*-gulonic (intermediar principal). Vitamina C este o lactonă ciclică cu proprietăți antioxidante.

Vitamina K_2 (Menachinona) – obținută prin fermentare cu ajutorul bacteriilor din genul *Bacillus* sau *Lactococcus*. Este o chinonă cu lanțuri laterale poliprenilice (Fig. 10.1), liposolubilă, stabilă la încălzire, dar sensibilă la lumină și la medii alcaline. Activitatea vitaminei K este legată de carboxilarea dependentă de vitamina K a proteinelor implicate în coagularea sângelui.

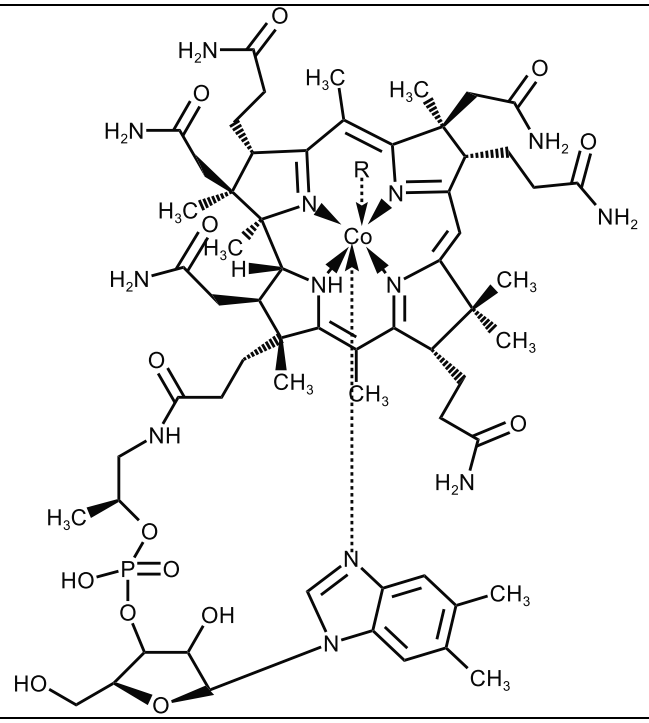
Vitamina E (α-tocoferol) – deși în mare parte provine din surse naturale, poate fi produsă biotehnologic folosind microorganisme modificate genetic. α-tocoferolul este un compus cu un nucleu de cromanol și o lianță isoprenoică (un lanț de 16 atomi de carbon). Este un antioxidant liposolubil, ceea ce înseamnă că se dizolvă în grăsimi și uleiuri. Conține o grupă fenolică cu proprietăți antioxidante, ce are un rol crucial în protecția împotriva radicalilor liberi.



Vitamina C (Acidul ascorbic)



Vitamina B_2 (Riboflavina)



Vitamina B_{12} (Cobalamina)

Izoformele Cobalaminei

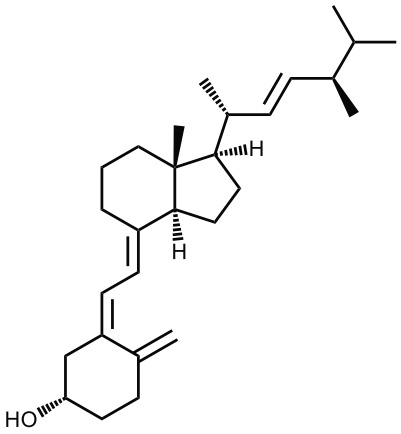
R = CN (cianocobalamină)

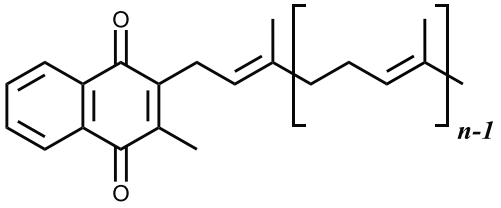
R = OH (hidroxicobalamină)

R = H_2O (aquacobalamină)

R = CH_4 (metilcobalamină)

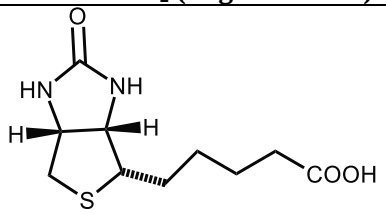
R = $C_{10}H_{13}N_5O_3$ (dezoxiadenozilcobalamină)

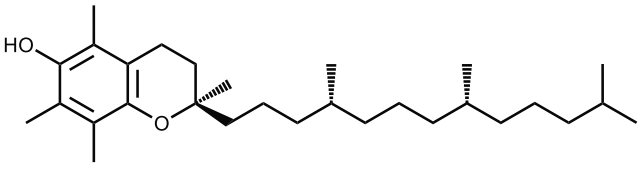




Vitamina D_2 (Ergocalciferol)

Vitamina K_2 (Menachinona)





Vitamina B_7 (Biotina)

Vitamina E (α-tocoferol)

Figura 10.1. Formulele de structură a unor vitamine obținute biotehnologic

Vitamina D_2 – obținută prin expunerea ergosterolului din drojdii la radiații ultraviolete. Vitamina D_2, cunoscută și sub denumirea de ergocalciferol, este una dintre formele de vitamina D, esențială pentru sănătatea oaselor și a sistemului imunitar. Vitamina D_2 este un sterol derivat din ergosterol; structura chimică a acestuia include un lanț de carbon cu patru cicluri de carbon și un grup hidroxil (-OH) în poziția 3, precum și o grupă metil în poziția 10. Vitamina D_2 este sintetizată de organismele vegetale și fungi, în special sub acțiunea luminii ultraviolete. Cele mai importante surse naturale de vitamina D_2 sunt ciupercile expuse la lumina UV, precum *Shiitake, Maitake, Champignon* etc.

Vitamina B_7 (Biotina) – fabricată prin procese de fermentare utilizând microorganisme precum *Escherichia coli* sau *Bacillus subtilis*. Biotina este o vitamină hidrosolubilă din complexul B, cunoscută și sub denumirea de vitamina B_7 sau vitamina H. Este un compus heterociclic format din două inele principale (un inel ureido și unul tiofenic) legate printr-un lanț lateral de acidul valeric. Este ușor solubilă în apă și alcool, insolubilă în solvenți organici nepolari.

10.2. Biosinteza vitaminelor C și B

Studiile medicale realizate de James Lind și ulterior de Albert Szent-Györgyi au demonstrat că scorbutul este cauzat de lipsa unui factor nutritiv esențial în dieta umană. Acest factor, identificat ulterior, a fost numit factor antiscorbutic și este cunoscut astăzi sub denumirea de vitamina C (acid ascorbic). În 1928, Albert Szent-Györgyi a izolat acidul ascorbic (AA) din glandele suprarenale, numindu-l inițial acid hexuronic. Iar în 1933 Norman Haworth a dedus și confirmat formula chimică a acidului ascorbic. În anii 1933-1934 nu doar Norman Haworth și Edmund Hirst, dar și chimistul polonez Tadeus Reichstein au reușit să obțină acid ascorbic (AA) în cantități mari, ceea ce a făcut posibil ca AA să devină prima vitamină produsă pe cale sintetică.

Producerea industrială a vitaminei C (acid ascorbic) se realizează prin metode biotehnologice și chimice integrate. Aceste tehnologii sunt bazate pe transformarea glucozei sau zaharozei în acid ascorbic prin procese care combină fermentarea microbiană și reacțiile chimice. Cele mai utilizate metode includ procedeul Reichstein și procesele complet fermentative.

1. Procedeul Reichstein

Această metodă, dezvoltată în anii 1930, implică o combinație de fermentare microbiană și sinteză chimică. Procedeul *Reichstein* implică o succesiune de reacții chimice, urmate de o etapă biochimică, și este utilizat, parțial, și în prezent pentru sinteza acidului ascorbic (AA). Este utilizat pe scară largă datorită fiabilității și purității produsului final.

Etapele de biosinteză a AA prin metoda *Reichstein* sunt prezentate în figura 10.2.

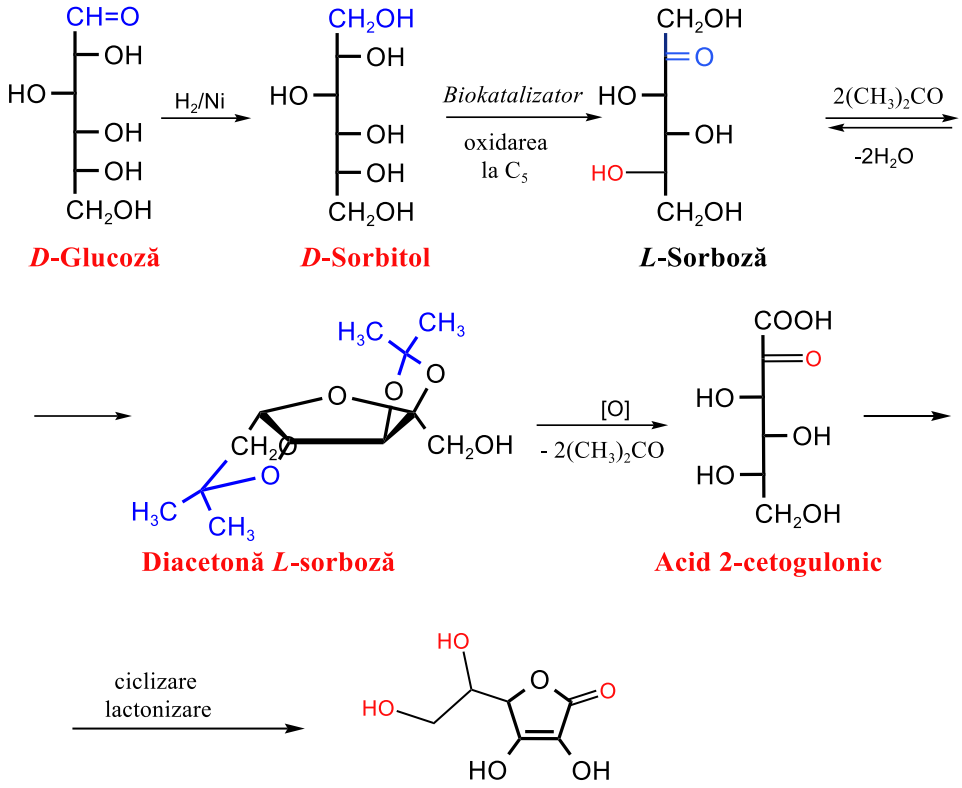


Figura 10.2. Etapele de sinteză integrată a acidului *L*-ascorbic prin metoda *Reichstein*

În acest procedeu în calitate de materie primă se folosește glucoza. În prima etapă are loc hidrogenarea/reducerea *D*-glucozei în *D*-sorbitol. Glucoza este supusă unei hidrogenări catalitice (în prezența nichelului Raney) pentru a obține sorbitol.

În etapa a doua, fermentativă, sorbitolul este transformat în *L*-sorboză prin fermentare microbiană utilizând bacterii din genul *Gluconobacter*. Această etapă biotehnologică este esențială pentru a asigura stereospecificitatea specifică acestei molecule. În următoarea etapă, *L*-sorboza este acetilată parțial pentru a proteja anumite grupe hidroxil de oxidare. Ulterior diacetona *L*-sorboză este oxidată până la acid 2-cetogulonic, un precursor-cheie al acidului ascorbic.

În ultima etapă, acidul 2-cetogulonic este supus unei reacții chimice de ciclizare și lactonizare, rezultate cu formarea acidului *L*-ascorbic (vitamina C).

Avantajele metodei Reichstein

- Metoda *Reichstein* a fost una dintre primele metode industriale eficiente de producere a vitaminei C la scară largă industrială.

- Metoda oferă un randament global de aproximativ 60%, ceea ce o face competitivă în producerea acidului *L*-ascorbic.
- Utilizează glucoza ca materie primă, o resursă relativ ieftină și ușor disponibilă.
- Este un proces standardizat, utilizat pe scară largă în industria chimică și farmaceutică.
- Include o etapă microbiologică, ceea ce reduce parțial necesitatea unor reacții chimice complexe.

Dezavantajele metodei Reichstein

- Metoda implică mai multe etape chimice, ceea ce crește complexitatea procesului și costurile operaționale.
- Producția generează deșeuri chimice care necesită gestionare corespunzătoare pentru a preveni poluarea mediului.
- Reacțiile chimice implicate necesită condiții specifice (catalizator, temperatură, presiune), ceea ce determină un consum ridicat de energie.
- Deși eficientă pentru perioada în care a fost dezvoltată, randamentul global de 60% este considerat moderat în comparație cu metodele biotehnologice moderne.
- Metodele moderne, complet biotehnologice, bazate pe ingineria genetică și biocatalizatori, pot avea un randament mai mare și un impact ecologic mai redus.

2. Procesul de biosinteză a AA care include 2 etape de fermentare

Această metodă utilizează microorganisme modificate genetic pentru a transforma glucoza în acid *L*-ascorbic folosind două etape de fermentare. Ea este mai ecologică și mai eficientă din punct de vedere economic. Etapele de biosinteză a AA prin această metodă sunt prezentate în figura 10.3.

În acest procedeu prima etapă este similară metodei *Reichstein*: *D*-glucoza este supusă unei hidrogenări catalitice (în prezența nichelului Raney) pentru a obține *D*-sorbitol. În a doua etapă sunt folosite *Gluconobacter oxydans* pentru a transforma *D*-sorbitolul în *L*-sorboză. În următoarea etapă, *L*-sorboza este convertită în acid 2-cetogulonic (2-KGA), prin fermentare în prezența culturilor de bacterii *K. vulgare* și *Bacillus spp.* (Fig. A.10.1).

Ulterior, 2-KLG se supune procesului de esterificare cu metanol în prezența acidului sulfuric. Ca rezultat se formează 2-cetogulonatul de metil. Acesta, prin hidroliză alcalină în prezența hidrogenocabonatului de sodiu, se transformă ulterior în sare monosodică a vitaminei C. În ultima etapă sarea obținută se tratează cu acid sulfuric și se obține acidul ascorbic. Etapele de biosinteză a vitaminei C prin acest procedeu sunt prezentate în figura 10.3.

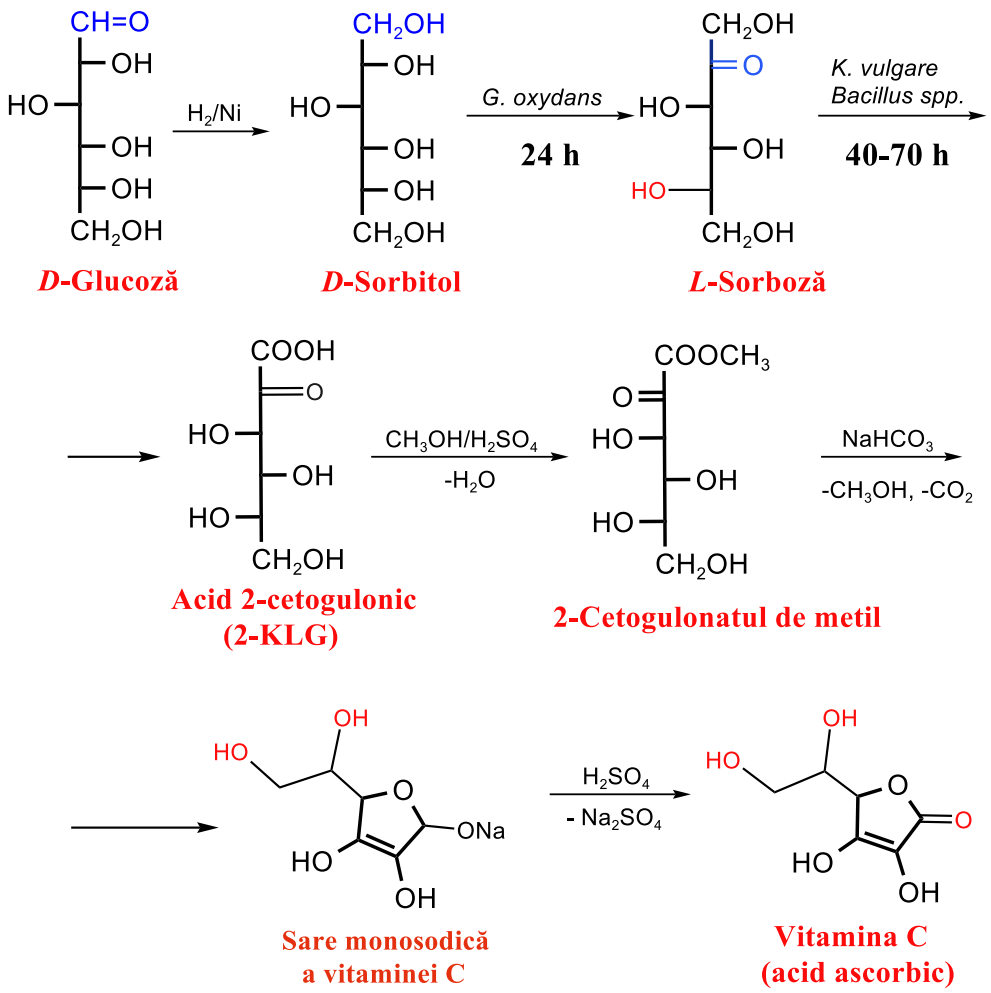


Figura 10.3. Etapele de sinteză a acidului ascorbic prin metoda care implică două etape de fermentare

Avantajele și dezavantajele obținerii AA prin metoda care implică două etape de fermentare în comparație cu metoda *Reichstein* sunt prezentate în tabelul A.10.2.

Biosinteza vitaminei B_2

Biosinteza vitaminei B_2 implică convergența a două căi metabolice principale:

- calea purinelor, care utilizează o moleculă de GTP (guanozin-trifosfat);
- calea pentozelor, care implică două molecule de tetruloză-4-fosfat.

Cele două procese metabolice converg la etapa de sinteză a precursorului 6,7-dimetil-8-ribitilumazină. Acest precursor este esențial în biosinteza riboflavinei, fiind intermediarul-cheie în formarea inelului izoaloxazinic al vitaminei B_2. O moleculă de GTP interacționează cu două molecule de tetruloză-4-fosfat și

generează o moleculă de vitamina B_2; schematic acest proces este reprezentat în figura 10.4.

Prima etapă include transformarea GTP în 2,5-diamino-6(1-*D*-ribozilamino)pirimidin-4(3*H*)-onă-5'-fosfat, prin hidroliza a două fragmente fostat și a unui fragment formiat de la atomul C_8 al inelului imidazolic. Enzima care catalizează această reacție se numește GTP ciclohidrolaza II. În a doua etapă, prin reducerea 2,5-diamino-6(1-*D*-ribozilamino)pirimidin-4(3*H*)-on-5'-fosfatului are loc deciclizarea cu formarea 2,5-diamino-6(1-*D*-ribitolamino)pirimidin-4(3*H*)-on-5'-fosfatului. În etapa a treia, prin hidroliza 2,5-diamino-6(1-*D*-ribitolamino)pirimidin-4(3*H*)-on-5'-fosfatului, se formează 5-diamino-6(1-*D*-ribitolamino)pirimidin-2,4(3*H*)-diona. Reacția este reprezentată prin indicarea intermediarului enolic. În etapa a patra, 5-diamino-6(1-*D*-ribitolamino)pirimidin-2,4(3*H*)-diona este hidrolizată la 5-amino-6-(*D*-ribitolamino)uracil. În etapa a cincea, 5-amino-6-(*D*-ribitolamino)uracilul rezultat din calea purinelor (calea GTP), prin reacția cu 3,4-dihidroxibutan-2-on-4-fosfatul (obținut prin calea pentozelor), formează 6,7-dimetil-8-*D*-ribitolumazina. Ecuațiile acestor reacții chimice sunt prezentate în figura 10.5.

Ecuația reacției de condensare a 6,7-dimetil-8-*D*-ribitolumazinei presupune 7 etape (Fig. 10.6). Ca rezultat, se obține vitamina B_2 (riboflavina). Această reacție de condensare implică un proces enzimatic. Ecuația reacției de condensare a 6,7-dimetil-8-*D*-ribitolumazinei presupune mai multe etape, în care intermediarii enolici și grupele funcționale ale compușilor chimici interacționează pentru a forma structura finală a riboflavinei.

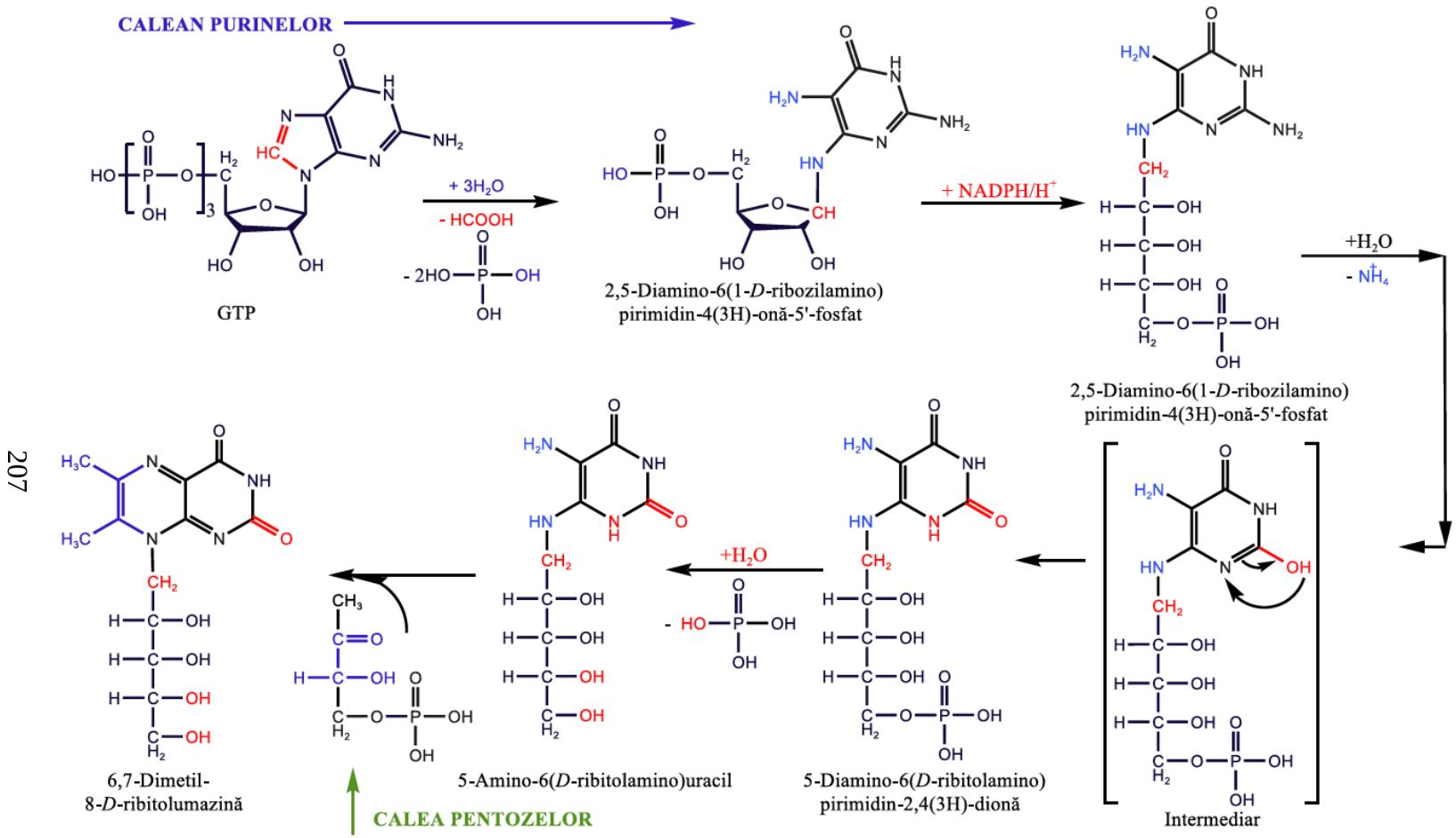


Figura 10.4. Etapele de biosinteză a 6,7-dimetil-8-*D*-ribitolumazinei

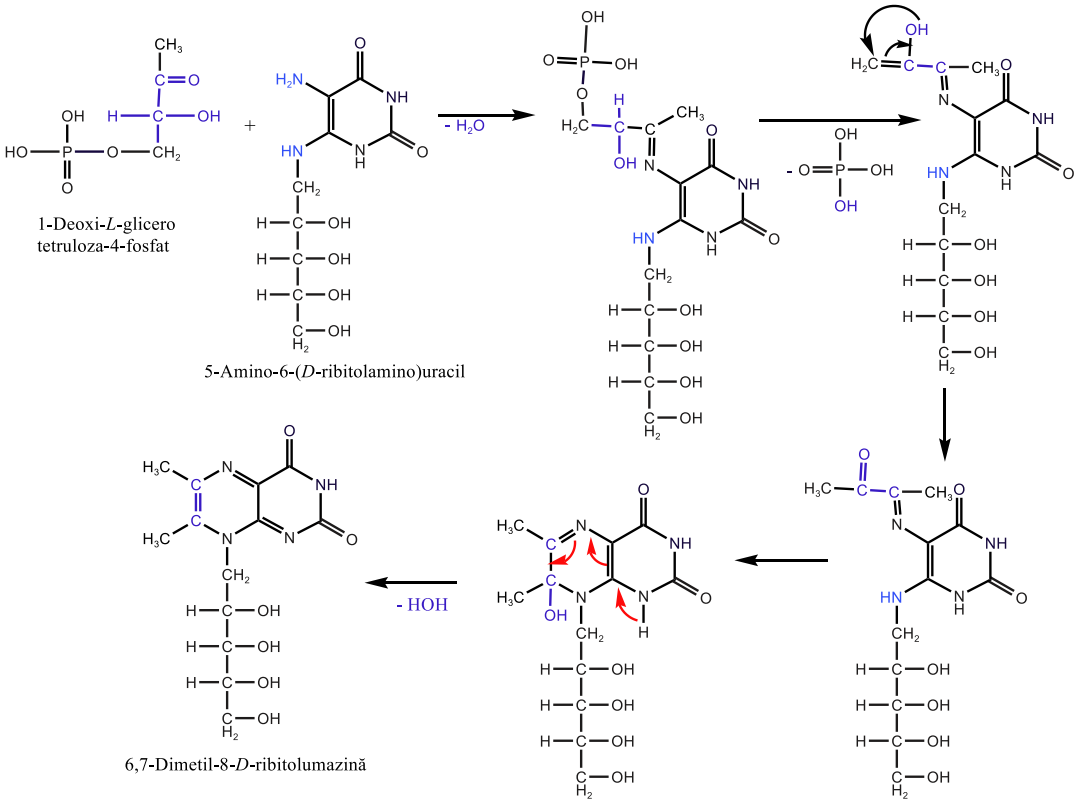


Figura 10.5. Mecanismul desfășurat de biosinteză a 6,7-dimetil-8-*D*-ribitolumazinei

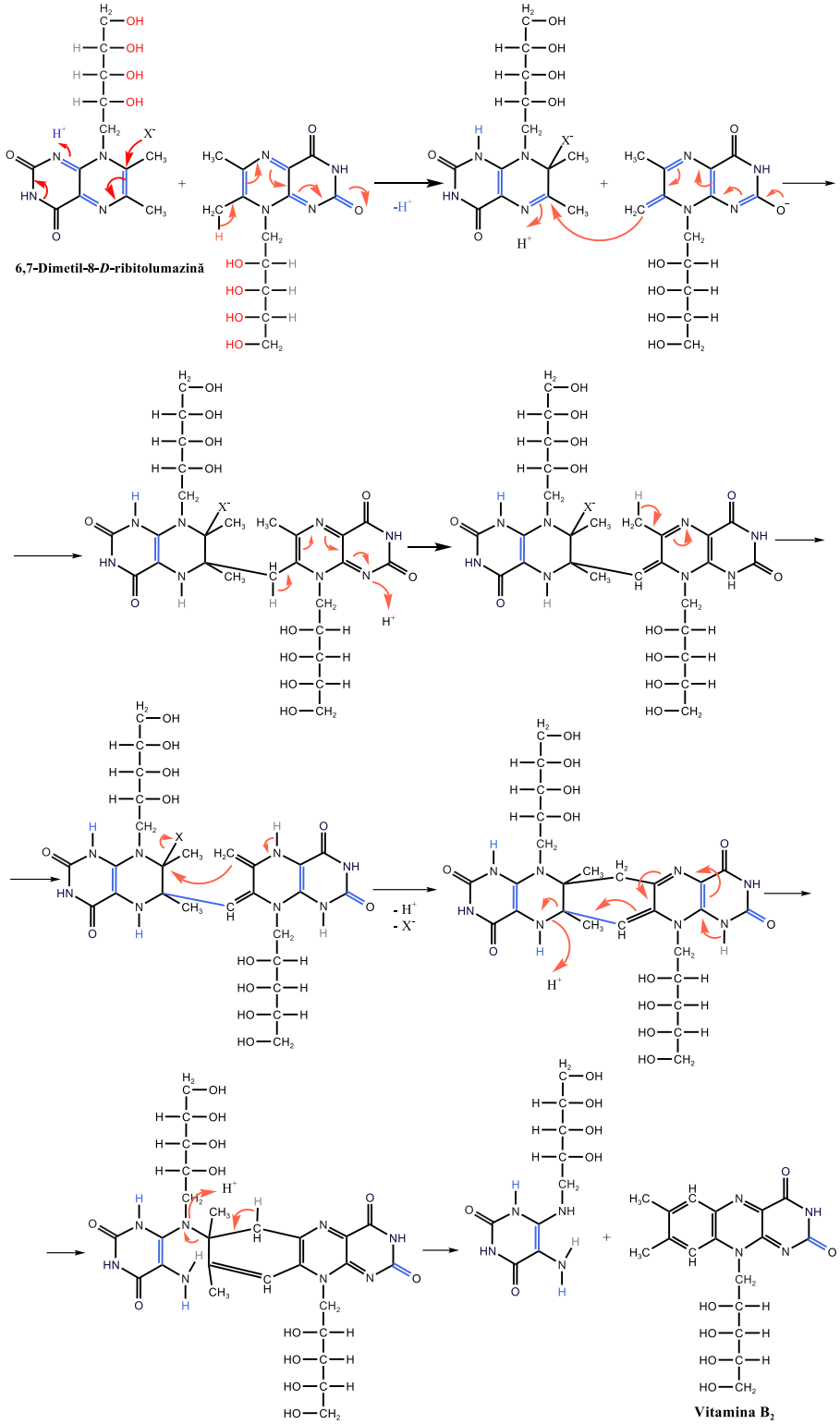


Figura 10.6. Mecanismul reacției de condensare a 6,7-dimetil-8-*D*-ribitolumazinei cu obținerea vitaminei B_2

10.3. Biotehnologia vitaminelor C, B_2 și B_{12}: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Biotehnologia de producere a vitaminei C

În procesul biotehnologic de obținere a vitaminei C (acid ascorbic), materia primă principală este *D*-glucoza sau *D*-sorbitolul, care sunt utilizate ca surse de carbon. Compoziția exactă a mediului nutritiv poate varia în funcție de microorganismul utilizat (ex., *Gluconobacter oxidans*) și de etapa procesului (fermentare pentru obținerea acidului 2-ceto-*L*-gulonic sau conversia acestuia în acid ascorbic). Un exemplu de compoziție a mediului nutritiv recalculat la un litru este prezentat în tabelul 10.1.

Tabelul 10.1. Compoziția mediului nutritiv în procesul de producere a vitaminei C

Component	**Concentrație (g/L)**	**Rol în proces**
Glucoză	50,00-100,00	Substrat principal, sursă de carbon pentru procesul de fermentare
Uree sau sulfat de amoniu	2,00-4,00	Sursă de azot pentru creșterea microorganismelor
Fosfat de potasiu (K_2HPO_4)	1,00-2,00	Tampon pH necesar pentru stabilitatea mediului
Sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,50-1,00	Cofactor enzimatic pentru creșterea microorganismelor
Clorură de sodiu (NaCl)	0,50-1,00	Ion necesar pentru funcționarea optimă a celulelor
Sulfat feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,01-0,05	Sursă de fier necesar în sinteza enzimelor redox
Extract de drojdie	5,00-10,00	Sursă de vitamine și factori de creștere
Citrat de sodiu	1,00-2,00	Stabilizator de ioni metalici și tampon pH
Apă distilată	Completare până la 1 L	Mediul de bază pentru dizolvarea nutrienților

În procesul de producere a vitaminei C prin procesul biotehnologic este esențială menținerea pH-ului optim între 5,5 și 6,5 și temperatura de 30-35ºC pentru creșterea eficientă a microorganismelor.

Schema biotehnologică de obținere a vitaminei C prin metoda cu implicarea a două etape de fermentare este prezentată în figura 10.7. Soluția de *D*-glucoză este injectată într-o coloană care conține catalizatorul Ni Renay staționar. Soluția de glucoză și H_2 este recirculată continuu pe catalizator până la definitivarea reacției. La anumite intervale de timp, *D*-sorbitolul este extras și purificat prin coloane

schimbătoare de ioni. Soluția purificată este concentrată prin evaporare până la un conținut de 50-80%. Conversia *D*-sorbitolului se efectuează în bioreactoare air-lift. Conversia se poate efectua cu sau fără adăugare de substrat în timpul fermentării.

A. Fermentarea fără adăugare de mediu (fermentare în lot). În acest caz, concentrația finală de *L*-sorboză este de 20-25%, timpul de fermentare este de 18-24 de ore, iar productivitatea este de 12-13 g/L/oră. Temperatura este de 32ºC, pH-ul este în jur de 7, iar viteza de oxigenare este de 300-500 mmol/L/oră.

Deși acest tip de fermentare este ușor de monitorizat, există unele dezavantaje, precum necesitatea de a spăla, steriliza și inocula bioreactorul după fiecare ciclu, ceea ce reduce eficiența procesului.

B. Fermentarea *D*-sorbitolului prin adăugare de mediu (fermentare continuă). În concentrații mari, *D*-sorbitolul blochează activitatea *Gluconobacter oxydans*. Pentru a rezolva această problemă, în bioreactorul air-lift se adaugă continuu *D*-sorbitol. Astfel, se adaugă mediu cu o viteză de 0,36 L/oră, ce conține 600 g/L de sorbitol. Acest lucru determină o productivitate de 17,7 g/L/oră și o concentrație de sorboză de 320 g/L. În etapa finală, bioamestecul se filtrează, concentrează și se sterilizează. Conversia *L*-sorbozei se efectuează în fermentatorul air-lift, fără adăugare de mediu în timpul fermentării. Fermentarea are loc în prezența a două culturi de bacterii *K. vulgare* și *Bacillus spp*. Fermentarea se desfășoară la temperatura de 29ºC, iar pH-ul se menține la 7, prin adăugare de NaOH. Concentrația inițială de *L*-sorboză este de 10 g/L, iar apoi, la un anumit moment, în intervalul 10-30 de ore, se adaugă o cantitate mare de *L*-sorboză obținută în etapa anterioară. Transferul de oxigen (O_2) se efectuează cu o viteză de 100 mmol/L/oră, suficient pentru a asigura creșterea co-culturii și conversia *L*-sorbozei. Fermentarea durează de obicei 40-65 de ore, iar concentrația finală de 2-KLG este de 90-110 g/L.

Precursorul 2-KLG se formează sub formă de sare sodică, amestecat cu alte substanțe, precum proteine, acizi nucleici, aminoacizi și săruri anorganice. Bioamestecul se tratează termic sau se ajustează pH-ul astfel încât impuritățile, precum moleculele proteice, să precipite. Acestea se separă prin centrifugare. Ulterior, soluția se purifică prin ultrafiltrare și prin coloane schimbătoare de ioni. În acest caz, 2-KLG se esterifică cu metanol în prezența acidului sulfuric, formând 2-cetogulonatul de metil. Acesta, prin hidroliză alcalină în prezența bicarbonatului de sodiu, se transformă în sarea monosodică a vitaminei C, care ulterior tratată cu acid sulfuric trece în vitamina C.

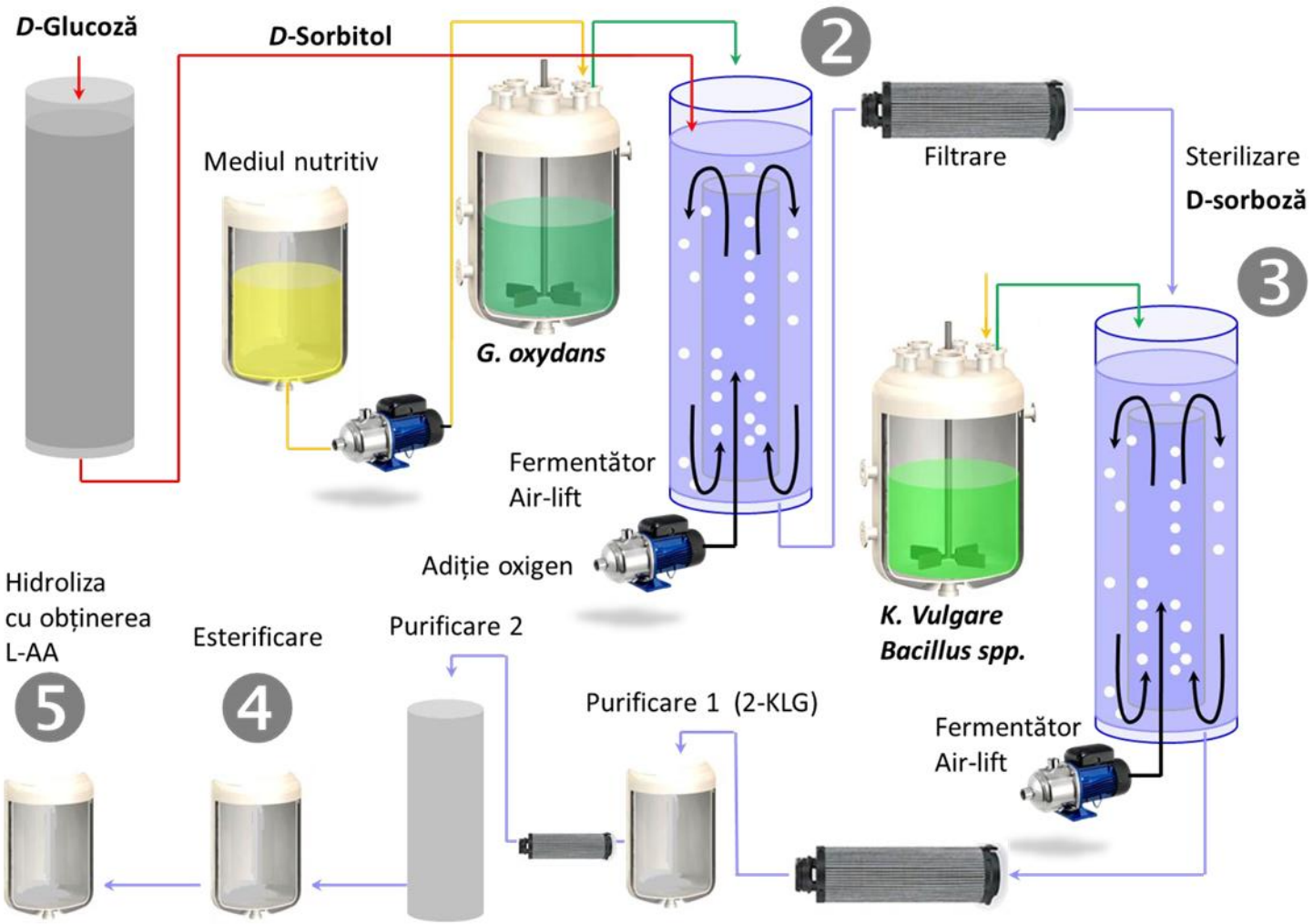


Figura 10.7. Etapele tehnologice de obținere a vitaminei C prin metoda cu implicare a două etape de fermentare

Biotehnologia vitaminei B_2

Microorganismele producătoare de vitamina B_2 pot fi clasificate în trei categorii în funcție de concentrația de vitamina B_2 produsă: 10 mg/L, 600 mg/L și 10 g/L. Curent în biosinteza vitaminei B_2 se folosesc *B. subtilus* și *A. Gossypii* care produc 10 g/L de vitamină.

Sursa de carbon la producerea vitaminei B_2 poate fi glucoza sau extractul de porumb. Glucoza poate fi înlocuită cu zaharoză sau maltoză. Mediul nutritiv conține aminoacizi (de exemplu, metionină, glicină), vitamine (biotină, tiamină), extract de drojdie, peptone și, în anumite cazuri, purine și săruri (de exemplu, $MgSO_4$, K_2HPO_4).

De regulă, sursa de carbon și mediul nutritiv sunt sterilizate separat prin tratament termic la temperaturi ridicate, utilizând timp scurt de expunere (140–150ºC pentru aproximativ 10 secunde) (Fig. 10.8).

În unele cazuri, componentele mediului nutritiv pot fi sterilizate separat. De exemplu, peptonele și extractul de drojdie pot fi sterilizate distinct de soluția apoasă de săruri. Această metodă de sterilizare separată este necesară pentru a preveni reacțiile chimice care pot avea loc între componentele mediului nutritiv la temperaturi înalte, cum ar fi procesele de condensare, deshidratare sau izomerizare. Un exemplu de compoziție a mediului nutritiv, recalculat la un litru, este prezentat în tabelul 10.2.

Tabelul 10.2. Compoziția mediului nutritiv în procesul de producere a vitaminei B_2

Component	**Concentrație (g/L)**	**Rolul în proces**
Glucoză	50,00-100,00	Substrat principal, sursă de carbon pentru fermentare
Uree sau sulfat de amoniu	2,00-4,00	Sursă de azot pentru creșterea microorganismelor
Fosfat de potasiu (K_2HPO_4)	1,00-2,00	Tampon pH necesar pentru stabilitatea mediului
Sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,50-1,00	Cofactor enzimatic pentru creșterea microorganismelor
Clorură de sodiu (NaCl)	0,50-1,00	Ion necesar pentru funcționarea optimă a celulelor
Sulfat feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,01-0,05	Sursă de fier necesar în sinteza enzimelor redox
Extract de drojdie	5,00-10,00	Sursă de vitamine și factori de creștere
Citrat de sodiu	1,00-2,00	Stabilizator de ioni metalici și tampon pH
Apă distilată	Completare până la 1 L	Mediul de bază pentru dizolvarea nutrienților

Analog altor procese de fermentare, microorganismele (*Ashbya gossypii* sau *Bacillus subtilis*) sunt cultivate inițial în bioreactoare pentru a atinge o anumită masă celulară, apoi sunt introduse în fermentatorul de regim; schema tehnologică a procesului este prezentată în figura 10.8.

Procesul de fermentare cu *Ashbya gossypii*. Fermentarea este aerobă și utilizează ulei vegetal ca sursă de carbon. Procesul are loc în fermentatoare de mare capacitate, în condiții strict controlate la o temperatură de 27–30ºC, cu o viteză minimă de aerare de 1 volum de aer per unitate de volum de bioamestec pe minut (0,25 vvm), pH-ul inițial este de 6,5. Durata procesului de fermentare este de 120–140 de ore (5–7 zile), iar productivitatea vitaminei B_2 (riboflavină) este de aproximativ 15 g/L. Tehnologiile mai recente permit reducerea duratei procesului la 3 zile și productivitatea crescută până la 20 g/L.

După terminarea procesului de fermentare are loc separarea prin filtrare a soluției native, care conține riboflavina ca metabolit extracelulur, de biomasă. Ulterior în unitatea **(2)** riboflavina este precipitată din soluția filtrată prin ajustarea pH-ului sau adăugarea unor agenți chimici specifici. Astfel are loc concentrarea riboflavinei și formarea cristalelor. În următoarea etapă se separă cristalele de riboflavină prin decantare, care se colectează în unitatea **(3)**. Cristalele obținute sunt supuse procesului de uscare cu aer cald în unitatea **(4)**. Dacă este necesar, riboflavina poate fi supusă procesului de recristalizare.

Praful stabil și uscat de riboflavină are o culoare galben-portocalie intensă, datorită structurii sale chimice care include un nucleu izoaloxazinic responsabil de absorbția luminii. Această culoare distinctivă face ca riboflavina să fie identificată ușor și este adesea utilizată și în calitate de colorant alimentar (E101). Culoarea ei devine mai pronunțată în medii acide și se poate estompa la expunerea prelungită la lumină sau căldură intensă.

Riboflavina purificată este ambalată în recipiente etanșe, de culoarea chihlimbarului, protejată de lumină și umiditate pentru a preveni degradarea. Produsul este stocat în condiții de temperatură și umiditate controlată.

Această metodă biotehnologică este eficientă și ecologică, datorită utilizării resurselor regenerabile și a capacității ridicate de producție a *Ashbya gossypii*.

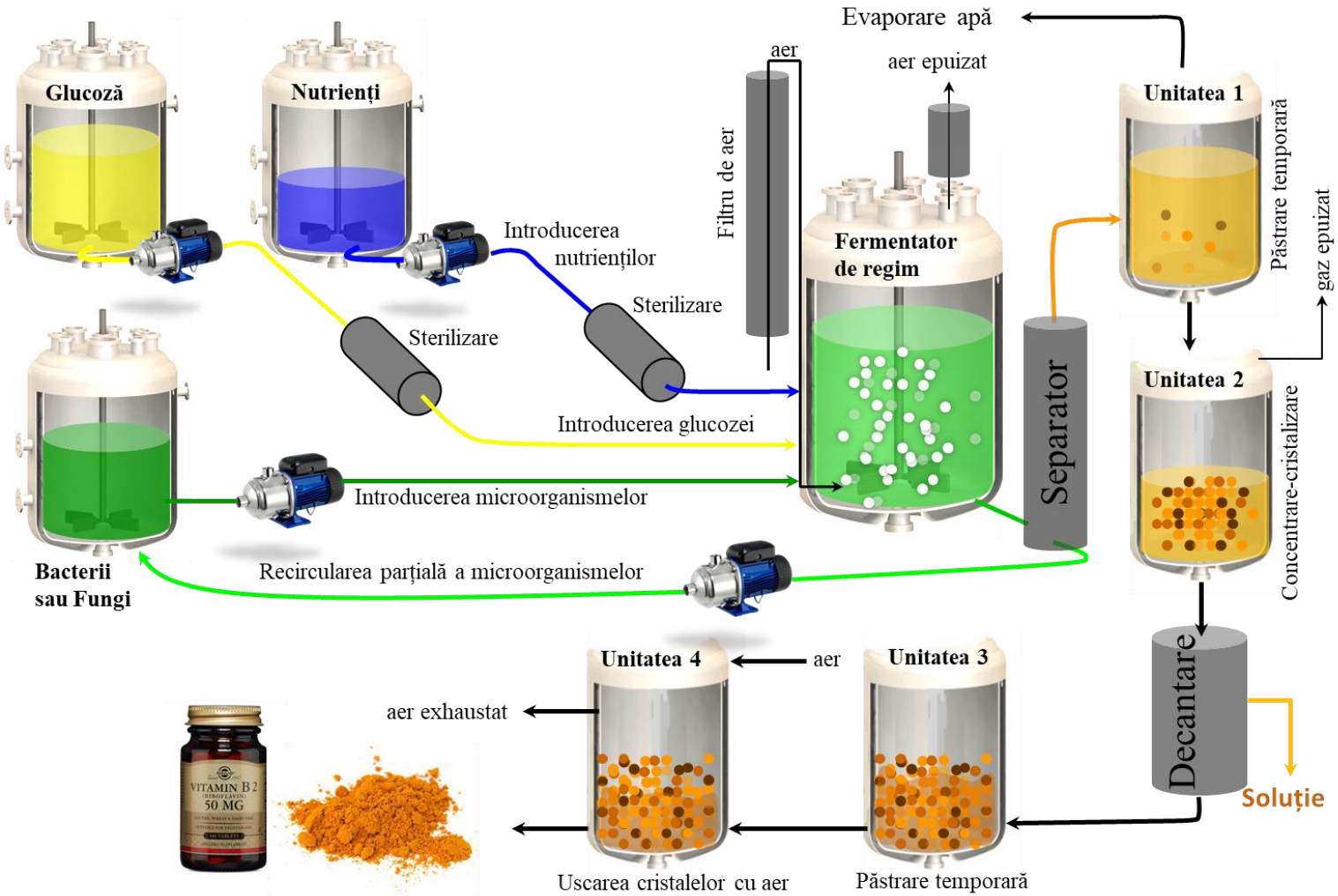


Figura 10.8. Etapele tehnologice de obținere a vitaminei B_2

Biotehnologia vitaminei B_{12}

Biosinteza vitaminei B_{12} este una dintre cele mai complexe căi metabolice cunoscute, dar nu este complet elucidată. Vitamina B_{12} este produsă exclusiv prin fermentare. Bacteriile producătoare de vitamina B_{12} includ *Pseudomonas denitrificans* și *Propionibacterium*.

Procesul de producere a vitaminei B_{12} în prezența bacteriilor *Propionibacterium* poate implica utilizarea speciilor *Propionibacterium shermanii* (ATCC 6707) sau *Propionibacterium freudenreichii* (ATCC 13673). Schema tehnologică a acestui proces este prezentată în figura 10.9. Inițial bacteriile se inoculează într-un recipient de 2 L. Compoziția mediului cu volumul de 400 mL include: triptonă – 20 g/L, extract de drojdii – 10 g/L, suc de tomate filtrat – 200 mL/L, pH-ul este ajustat la 7,2. Incubarea are loc timp de 2 zile, la 30ºC, fără agitare. Inoculul obținut este transferat în fermentatorul intermediar cu un volum de 30 L. Volumul mediului constituie 10 L și are următoarea compoziție: extract de porumb – 20 g/L, glucoză – 90 g/L. Valoarea pH-ului se ajustează la valoarea 6,5 (prin adăugare de NH_4OH), temperatura este de 30ºC și fără aerare. Incubarea se realizează timp de 24 de ore.

Fermentarea principală are loc în fermentatorul de regim cu capacitatea de 500 L. Volumul mediului în fermentator este de 340 L, glucoza se sterilizează separat (40 min la 120ºC); ulterior în el se inoculează 7 L de biomasă obținută în etapa precedentă în fermentatorul intermediar. Compoziția optimă a mediului nutritiv în fermentatorul de regim, recalculat la un litru, este prezentată în tabelul 10.3.

Tabelul 10.3. Compoziția mediului nutritiv în fermentatorul de regim pentru producerea biotehnologică a vitaminei B_{12} cu ajutorul *Propionibacterium*

Componentul	**Conținutul**
Glucoză	120,0 g
Melasă de porumb	80,0 mL
Glicină	5,0 g
NH_4NO_3	3,0 g
$MgSO_4 \cdot 5H_2O$	0,5 g
Na_2MoO_4	10,0 mg
Pantotenat de calciu	5,0 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0 mg
Dimetilbenzimidazol	20,0 g
Apă	până la 1,0 L

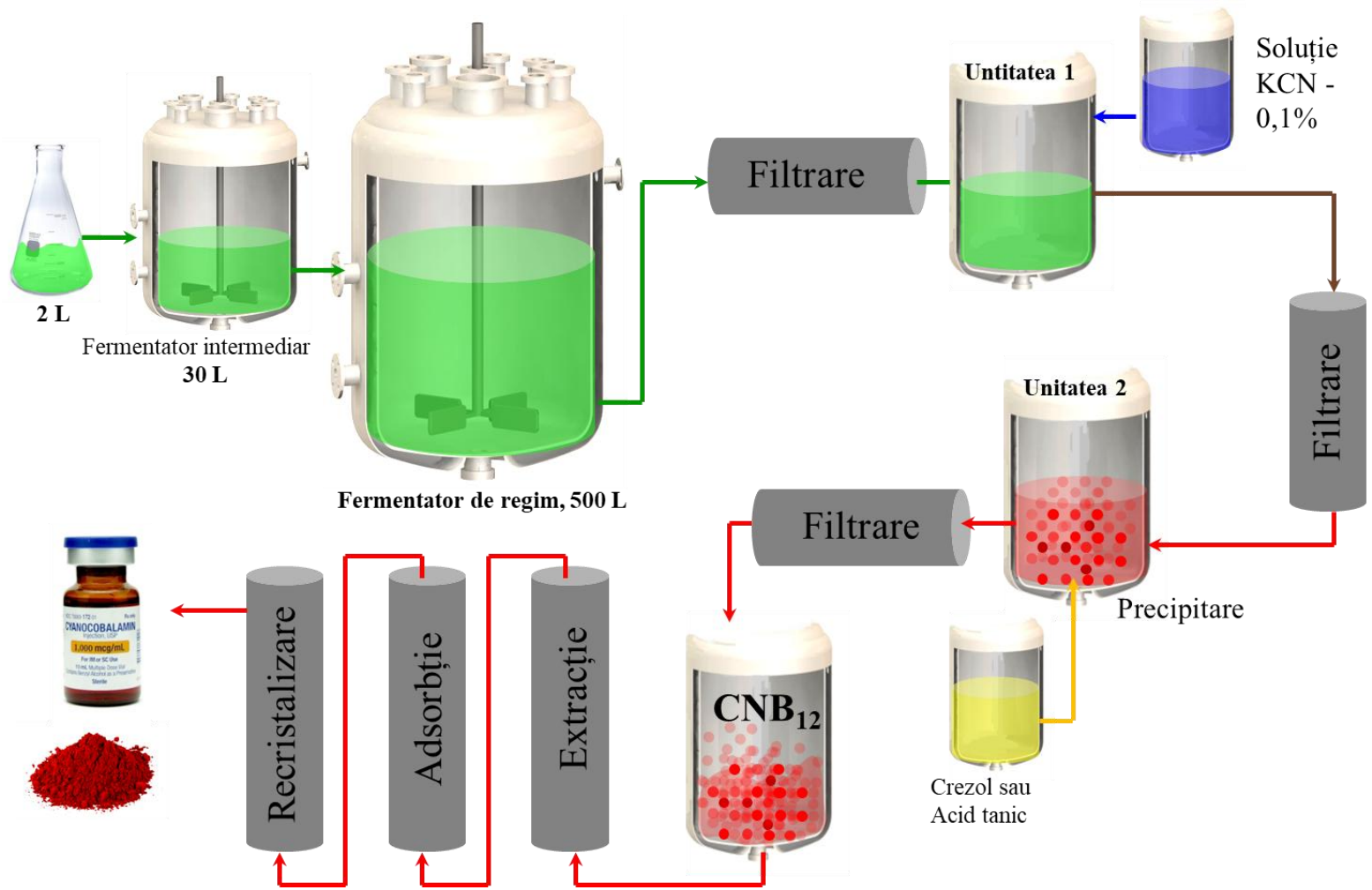


Figura 10.9. Etapele tehnologice de obținere a vitaminei B_{12}

În prezența oxigenului, biosinteza vitaminei B_{12} are loc cu randamente mici, de aceea procesul are loc în două etape. În primele 3 zile fermentarea este anaerobă, în această perioadă bacteriile cresc și produc cobamidă și acid propionic (acid propionic 10% din volumul bioamestecului). Valoarea pH-ului se menține la valoarea 7 prin adăugare de NH_4OH. În următoarele 1-3 zile biosinteza are loc la agitare și aerare, 2 m^3 aer/(m^3 mediu·oră). În această etapă are loc biosinteza 5,6-dimetilbenzimidazolului (5,6-DBI), o componentă esențială a cobalaminei (vitamina B_{12}). În biosinteza vitaminei B_{12}, 5,6-DBI este un precursor-cheie care se leagă de nucleotidul cobalaminic, formând nucleotidul cobamamidic. Suplimentarea cu 5,6-DBI în procesul de fermentare accelerează procesul de producere a vitaminei B_{12}.

În prezența oxigenului, biosinteza vitaminei B_{12} are loc cu randamente mici, motiv pentru care procesul se desfășoară în două etape.

1. **Etapa anaerobă**

Primele 3 zile ale fermentării sunt anaerobe. În această perioadă bacteriile cresc și produc cobamidă și acid propionic (acidul propionic constituie 10% din volumul bioamestecului). Valoarea pH-ului se menține constantă la 7 prin adăugarea de NH_4OH.

2. **Etapa aerobă**

În următoarele 1–3 zile biosinteza se desfășoară cu agitare și aerare, la un debit de aer de **2 m^3 aer/(m^3 mediu·oră)**. În această etapă se produce **5,6-dimetilbenzimidazol (5,6-DBI)**, care este consumat în procesul de sinteză a vitaminei B_{12}. Adăugarea unei cantități suplimentare de **5,6-DBI** în această etapă crește productivitatea vitaminei B_{12} și reduce timpul necesar fermentării.

Pe de altă parte, procesul de producere a vitaminei B_{12} poate avea loc și cu participarea bacteriilor *Pseudomonas denitrificans* (MB 2436).

Acest procedeu se desfășoară conform aceleiași scheme tehnologice descrise anterior (Fig. 10.9). Totuși, în acest caz, fermentatorul de regim are un volum de 120 m^3. În mediul de fermentare se adaugă suplimentar nitrat de cobalt (II) în concentrații de 40–200 mg/L. De asemenea, în mediu se introduce betaină sau colină, care contribuie la creșterea productivității vitaminei B_{12} prin stimularea reacțiilor de sinteză a acidului aminolevulinic, promovarea reacțiilor de metilare și favorizarea sintezei acidului *L*-glutamic, glicinei și metioninei. Betaina și colina influențează pozitiv permeabilitatea membranei celulare, facilitând astfel transportul substanțelor. Similar cazului anterior, adăugarea de 5,6-DBI îmbunătățește productivitatea vitaminei B_{12}, favorizând ultima etapă a procesului biosintetic. În plus, acidul *L*-glutamic accelerează creșterea bacteriilor

Pseudomonas denitrificans. Compoziția detaliată a mediului nutritiv, recalculat la un litru, pentru acest proces este prezentată în tabelul 10.4.

Tabelul 10.4. Compoziția mediului nutritiv în fermentatorul de regim pentru producerea biotehnologică a vitaminei B_{12} cu *Pseudomonas denitrificans*

Componentul	Conținutul
Melasă din sfeclă de zahăr	105,00 g
Zaharoză	15,00 g
Bină	3,00 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,50 g
$MgSO_4$	0,20 g
$ZnSO_4$	0,08 g
5,6-DBI	0,02 g
Apă	până la 1,00 L

În procesul de fermentare se utilizează melasa din sfeclă de zahăr, care conține o cantitate semnificativă de glutamat și betainină. La concentrații ridicate de betainină are loc inhibarea diviziunii celulare. Prin urmare, betaina este adăugată continuu în bioreactor, astfel încât concentrația ei să nu depășească 5–7 g/L.

În cazul bacteriilor *Pseudomonas*, spre deosebire de *Propionibacterium*, producerea vitaminei B_{12} are loc în timpul creșterii microorganismelor. Procesul de fermentare este integral aerob.

Procesul de fermentare poate dura între 2 și 6 zile. Fermentarea are loc la un pH de 7 și la o temperatură de 30ºC. Bioamestecul este aerat pe toată durata procesului. Cu toate acestea, aerarea prea intensă poate inhiba creșterea microorganismelor și astfel reduce randamentul în B_{12}.

Productivitatea vitaminei B_{12} poate ajunge la aproximativ 200 mg/L. Conținutul de oxigen dizolvat în mediul de fermentare este de: 8-10% în primele 49 de ore, 2-5% între 49 și 106 ore, 2% între 107 și 168 de ore.

Procesarea vitaminei B_{12} implică mai multe etape, care pot varia în funcție de unitatea de producție. Cele mai des utilizate etape sunt prezentate în figura 10.9.

Inițial, bioamestecul este filtrat, iar biomasa ajunge în unitatea **(1)**, unde are loc liza celulară la o temperatură de 80-120ºC timp de 10-30 minute, la un pH de 6,5-8,5. În soluție se dizolvă diferite forme ale vitaminei B_{12}. Ulterior, vitaminele B_{12} sunt transformate în cianocobalamină (CNB_{12}) prin tratare termică, în prezența nitritului de sodiu, cu o soluție de 0,1% KCN. După filtrare, soluția de CNB_{12} ajunge în unitatea **(2)**, unde este precipitată prin adăugarea de *o*-crezol sau acid tanic. Ulterior, cristalele de CNB_{12} sunt filtrate. Puritatea vitaminei B_{12} astfel obținute este de 80% și poate fi utilizată ca supliment pentru hrana animalelor. Pentru utilizarea farmaceutică, vitamina B_{12} este purificată prin extracție, adsorbție

și recristalizare. În extracție, cristalele din unitatea **(3)** sunt dizolvate în tetraclorură de carbon, iar după adăugarea de butanol sunt extrase cu apă. Din fracțiile apoase vitamina B_{12} se extrage repetat cu tetraclorură de carbon sau cu alt solvent organic. Purificarea cromatografică include purificarea pe coloane cu schimbători de ioni, pe coloane cu oxid de aluminiu și adsorbția impurităților hidrofobe pe coloane cu cărbune activ. După purificarea cromatografică, vitamina B_{12} este purificată prin recristalizări repetate din solvenți organici.

Ado-B_{12} și Metil-B_{12} sunt izolate direct din bioamestec. Vitaminele B_{12} transformate în timpul extracției în X-B_{12} (X = Cl^-, SO_4^{2-} sau NO_3^-) în coloanele cu schimbători de ioni OH^- (Amberlite IRA 400) se transformă în HO-B_{12}.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați vitaminele și descrieți proprietățile chimice principale.
2. Descrieți rolul farmaceutic și cosmetic al vitaminelor în diferite produse.
3. Prezentați etapele de biosinteză a unor vitamine din grupa B.
4. Propuneți mecanismele de biosinteză a vitaminei C.
5. Descrieți compoziția mediului nutritiv și materiile prime utilizate în producerea biotehnologică a vitaminelor C, B_2 și B_{12}.
6. Propuneți fluxul tehnologic de producere biotehnologică a vitaminelor C, B_2 și B_{12}.
7. Descrieți și explicați etapele de fermentare la producerea biotehnologică a vitaminelor C, B_2 și B_{12}.
8. Propuneți metode de izolare și purificare a vitaminelor C, B_2 și B_{12} la scară industrială.
9. Explicați diferențele tehnologice dintre producerea biotehnologică a vitaminelor B_2 și C.
10. Propuneți metode de optimizare a etapelor de producere biotehnologică a vitaminelor C, B_2 și B_{12} în scopul creșterii productivității acestora.

BIBLIOGRAFIE

1. IORDACHE, P.M. *Biotehnologia obținerii vitaminei B_2*. Bacău: Rovimed, 2012. 90 p. ISBN 9786065832749.
2. ROJE, S. Vitamin B biosynthesis in plants. In: *Phytochemistry*, 2007, 68(14), pp. 1904–1921. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.03.038.
3. GU, Q., LI, P. Biosynthesis of Vitamins by Probiotic Bacteria. In: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*., 2016. https://doi.org/10.5772/63117.
4. IRFAN, M., AALIA, M., SAEED, A. Current Trends in the Biosynthesis of Vitamins. In: Hashmi, M.Z., Saeed, A., Musharraf, S.G., Shuhong, W. (eds) In:

Recent Advances in Industrial Biochemistry. *Springer, Cham.*, 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-031-50989-6_11.
5. TIAN, Y.S., DENG, Y.D., ZHANG, W.H. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of vitamin C from *D*-glucose. In: *Biotechnol Biofuels*, 2022, 15, 86. https://doi.org/10.1186/s13068-022-02184-0.
6. HANCOCK, R.D., VIOLA, R. Biotechnological approaches for *L*-ascorbic acid production. In: *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(7), pp. 299–305. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01991-1.
7. SUSA, F., PISANO, R. Advances in Ascorbic Acid (Vitamin C) Manufacturing: Green Extraction Techniques from Natural Sources. In: *Processes*, 2023, 11(11), 3167. https://doi.org/10.3390/pr11113167.
8. ZHOU, J., DU, G., CHEN, J. Metabolic Engineering of Microorganisms for Vitamin C Production. In: *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*, 2012, pp. 241–259. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5_12.
9. YANG, W., XU, H. Industrial Fermentation of Vitamin C. In: *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, 2016, pp. 161–192. https://doi.org/10.1002/9783527681754.ch7.
10. AVERIANOVA, L.A., BALABANOVA, L.A., SON, O.M., PODVOLOTSKAYA, A.B., TEKUTYEVA, L.A. Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828.
11. LIU, S., HU, W., WANG, Z. et al. Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. In: *Microbial Cell Factories*, 2020, 19, 31. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7.
12. YOU, J., PAN, X., YANG, C., DU, Y., OSIRE, T., YANG, T., RAO, Z. Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. In: *Metabolic Engineering*, 2021, 68, pp. 46–58. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.08.009.
13. SCHWECHHEIMER, S.K., PARK, E.Y., REVUELTA, J.L., BECKER, J., WITTMANN, C. Biotechnology of riboflavin. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5), pp. 2107–2119. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7256-z.
14. CALVILLO, Á., PELLICER, T., CARNICER, M., PLANAS, A. Bioprocess Strategies for Vitamin B_{12} Production by Microbial Fermentation and Its Market Applications. In: *Bioengineering (Basel)*, 2022, 9(8), 365. https://doi.org/10.3390/bioengineering9080365.
15. FANG, H., KANG, J., ZHANG, D. Microbial production of vitamin B_{12}: a review and future perspectives. In: *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1). https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y.
16. ABDEL-BAKI, R.M.M., AHMED, M.N., BARAKAT, O.S. et al. Enhanced vitamin B_{12} production by isolated *Bacillus* strains with the application of response surface methodology. In: *BMC Biotechnol.*, 2024, 24, 90. https://doi.org/10.1186/s12896-024-00919-5.

11. BIOTEHNOLOGIA AROMELOR COSMETICE

11.1. Arome cosmetice: clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică
11.2. Biosinteza eugenolului, 2-feniletanolului, vanilinei și a *γ*-decalactonei
11.3. Biotehnologia 2-feniletanolului: materii prime, biosinteză, izolare și purificare

Abilități
Studentul:
- enumeră substanțele parfumerice obținute pe cale biotehnologică;
- scrie și explică ecuațiile de biosinteză a eugenolului, 2-feniletanolului, vanilinei și a *γ*-decalactonei;
- elaborează schema tehnologică și descrie etapele și parametrii tehnici ai procesului biotehnologic de producere a 2-feniletanolului;

11.1. Arome cosmetice: clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică

Aromele cosmetice obținute prin procese biotehnologice reprezintă o alternativă sustenabilă a metodelor tradiționale de extracție din plante sau prin sinteză chimică. Ele sunt folosite pe scară largă în industria parfumurilor, cosmeticelor și produselor de îngrijire personală datorită purității ridicate și impactului redus asupra mediului.

Aromele cosmetice de origine biotehnologică sunt compuși aromatici produși prin intermediul microorganismelor (bacterii, drojdii, fungi) sau enzimelor, utilizând materii prime regenerabile, precum glucoza, glicerolul sau uleiurile esențiale ca substrat.

După compoziția chimică aromele cosmetice se clasifică în:
- alcooli aromatici (ex., 2-feniletanol)
- esteri (ex., acetat de geranil)
- cetone (ex., ionone)
- terpene (ex., linalool, geraniol).

O clasificare mai detaliată a aromelor cosmetice obținute pe cale biotehnologică este prezentată în tabelul A.11.1.

Produsele obținute prin procese biotehnologice sunt în general foarte pure, fără contaminanți prezenți în metodele de sinteză chimică. Aromele rezultate au un profil organoleptic complex și rafinat. Conform legislației UE și FDA, aromele obținute prin biotehnologie pot fi etichetate drept „naturale”. Majoritatea

compușilor sunt ușor degradabili, ceea ce reduce impactul asupra mediului. Sunt utilizate în diverse produse cosmetice (parfumuri, creme, șampoane etc.).

Biotehnologia aromelor cosmetice reprezintă o direcție promițătoare pentru dezvoltarea produselor sustenabile, ecologice și inovative, având un impact semnificativ asupra calității produselor cosmetice moderne.

11.2. Biosinteza eugenolului, 2-feniletanolului, vanilinei și a *γ*-decalactonei

Biosinteza eugenolului

Eugenolul este un compus organic, un derivat alilic al guaiacolului. Este un compus incolor sau slab gălbui, aromatic și uleios, și se regăsește în uleiurile volatile din anumite specii vegetale, precum: cuișoare, scorțișoară, busuioc și dafin. Denumirea compusului provine de la denumirea științifică a plantei din care se obțin cuișoarele, *Eugenia caryophyllata* (care este în prezent denumită *Syzygium aromaticum*).

Eugenolul este utilizat pe scară largă în industria farmaceutică, cosmetică, parfumerică și alimentară datorită proprietăților sale antimicrobiene, parfumante și antioxidante.

Biosinteza eugenolului începe cu aminoacidul *L*-tirozină (*L*-Tyr) (Fig. 11.1), care este transformat în acid *p*-cumaric în prezența enzimei tirozin amoniac liaza (TAL). Acidul *p*-cumaric este ulterior hidroxilat în acid cafeic prin acțiunea enzimei *p*-cumarat 3-hidroxilază care necesită oxigen și NADPH.

Acidul cafeic este metilat în prezența *S*-adenozil metioninei (SAM), formând acid ferulic. Acesta este convertit la acid feruloil-CoA de către enzima 4-hidroxicinamoil-CoA ligaza (4CL).

În continuare, acidul feruloil-CoA este redus la aldehidă coniferilică (aldehida 4-hidroxi 3-metoxicinamică) de către cinamoil-CoA reductaza (CCR), care este apoi redusă suplimentar la alcool coniferilic de enzimele cinamil-alcool dehidrogenază (CAD) sau sinapil-alcool dehidrogenază (SAD). Alcoolul coniferilic este transformat într-un ester în prezența acetil-CoA, formând acetat de coniferil. În etapa finală, acetatul de coniferil este convertit în eugenol cu ajutorul enzimei eugenol sintetaza 1, utilizând NADPH ca donator de electroni.

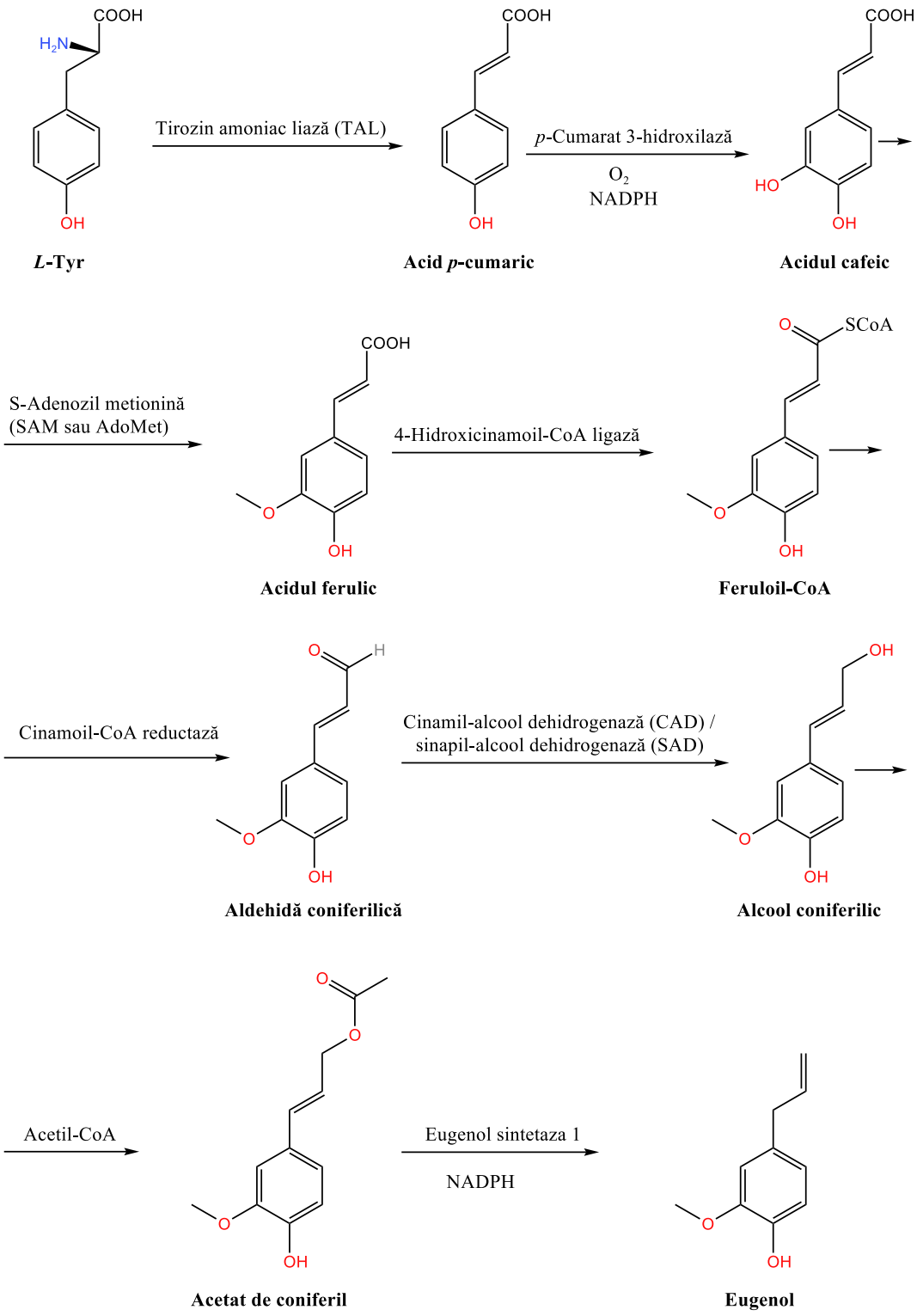


Figura 11.1. Mecanismul de biosinteză a eugenolului

Biosinteza 2-feniletanolului

Datorită mirosului plăcut de trandafir și proprietăților sale antibacteriene, 2-feniletanolul (2-PE) este un compus de mare valoare utilizat pe scară largă în industria cosmetică, alimentară și a aromelor. Actualmente, cea mai mare parte a producției mondiale de 2-PE (mai mult de 10.000 de tone pe an) se realizează prin utilizarea metodelor chimice care implică reactivi toxici, cum ar fi benzenul și oxidul de stiren, precum și condițiile dure de producție (>300ºC) și cantități mici prin metode biotehnologice. De aceea, este importantă înlocuirea acestui proces cu o alternativă biotehnologică. Diverse drojdii de tip sălbatic, inclusiv *Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus* și *Yarrowia lipolytica,* au capacitatea de biosinteză a 2-PE. Până în prezent au fost raportate mai multe căi de biosinteză pentru producția de 2-PE, inclusiv calea *Ehrlich,* calea fermentării cu precursor, bioconversie enzimatică, biosinteza *de novo*. Deoarece aceste căi pornesc de la *L*-fenilalanină (*L*-Phe) sau fenilpiruvat (PPA), randamentele ridicate sunt de obicei obținute prin biotransformarea *L*-Phe adăugată exogen, care reprezintă o abordare mai eficientă, dar cu un cost ridicat.

Biosinteza 2-feniletanolului (2-PE) din *L*-fenilalanină (*L*-Phe) prin calea *Ehrlich* (Fig. 11.2) este un proces metabolic specific, întâlnit în mai multe microorganisme, care implică trei etape principale, precum transaminarea, decarboxilarea și reducerea intermediarului fenilpiruvat. Acest proces este realizat în principal de drojdii, precum *Saccharomyces cerevisiae,* și este valorificat industrial pentru obținerea 2-PE utilizat ca aromă sau ingredient în parfumuri.

În prima etapă, *L*-fenilalanina este transaminată de o aminotransferază, generând acidul fenilpiruvic. În etapa a doua, acidul fenilpiruvic este decarboxilat de către o decarboxilază, formând aldehida fenilacetică. În ultima etapă, aldehida fenilacetică este redusă la 2-PE de către o dehidrogenază, în prezența NADPH.

Deoarece *L*-Phe este o materie primă relativ costisitoare, producția directă de 2-PE din carbohidrați, care este o materie primă ieftină și regenerabilă, reprezintă o alternativă atractivă.

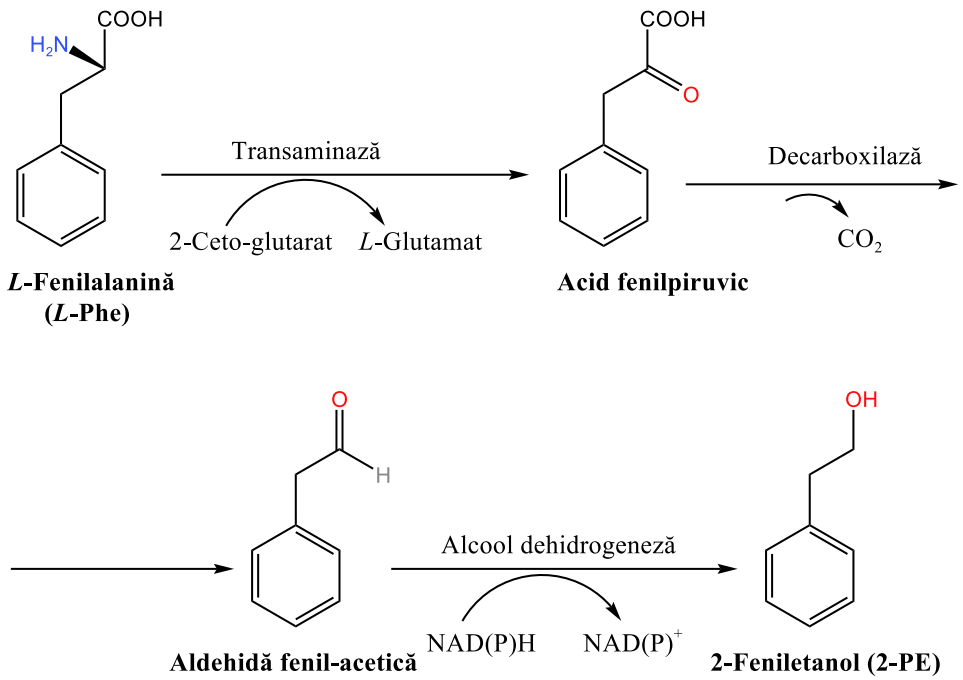


Figura 11.2. Biosinteza 2-feniletanolului (2-PE) din *L*-fenilalanină (*L*-Phe) prin calea *Ehrlich*

Biosinteza 2-feniletanolului (2-FE) pe calea biosintezei *de novo* implică mai multe etape enzimatice având ca punct de plecare ciclul *shikimat*. Această cale transformă glucoza sau alte surse de carbon în 2-FE (Fig. A.11.1). În biosinteza *de novo*, glucoza sau alte glucide sunt transformate în precursori aromatici prin calea shikimat, iar aceștia sunt ulterior procesați printr-o serie de reacții enzimatice pentru a produce 2-feniletanolul. Acest proces este important pentru producția durabilă de 2-FE fără a utiliza aminoacidul *L*-fenilalanină exogen. Inițial are loc formarea acidului corismic (calea *shikimatului*, Fig. A.11.2), aceasta este calea principală pentru sinteza precursorilor aromatici. Pentru aceasta, printr-un proces de glicoliză, glucoza este transformată în fosfoenolpiruvat (PEP) și eritrozo-4-fosfat. Ulterior, prin condensarea enzimatică PEP și eritrozo-4-fosfat în prezența enzimei 3-deoxi-arabinoheptulozat-7-fosfat sintaza (DAHP sintaza), se formează acidul 3-dehidrochinic, care este transformat succesiv în acid corismic. La etapa următoare are loc sinteza acidului fenilpiruvic. Inițial are loc transformarea acidului corismic în acid prefenic, reacție catalizată de enzima corismat mutaza. Ulterior, acidul prefenic este convertit în acid fenilpiruvic printr-o reacție catalizată de aromat dehidrogenaza. În etapa finală are loc biosinteza 2-feniletanolului (calea *Ehrlich* integrată în biosinteza *de novo*).

Enzima aminotransferaza transformă acidul fenilpiruvic în *L*-fenilalanină. *L*-fenilalanina este transformată în acid fenilpiruvic prin reacția catalizată de *L*-fenilalanin-amoniac liaza (PAL). Acidul fenilpiruvic este transformat prin decarboxilare în aldehida fenilacetică sub acțiunea fenilpiruvat decarboxilazei. În ultima etapă aldehida fenilacetică este redusă la 2-feniletanol prin fenilacetaldehid-dehidrogenază, utilizând NADPH ca sursă de donor de electroni.

Deși sinteza chimică domină încă producția globală de 2-PE, metodele biotehnologice sunt în creștere rapidă, reflectând tendințele sustenabile și orientarea către produse naturale.

Biosinteza vanilinei

Vanilina este un compus organic natural extras din boabele de vanilie aparținând familiei *Orchidaceae* și este un agent aromatizant popular utilizat pe scară largă la nivel global. Datorită aromei caracteristice de boabe de vanilie și a parfumului puternic cu note lactice, vanilina este un ingredient important în industria alimentară, a băuturilor, cosmeticelor și a produselor farmaceutice.

Cererea globală de vanilină depășește 15.000 de tone anual, însă doar aproximativ 2.000 de tone de vanilină naturală sunt extrase în fiecare an. În consecință, cea mai mare parte a vanilinei utilizate industrial este sintetizată chimic din diverse materii prime. Vanilina naturală derivată din păstăile de vanilie are un cost ridicat, variind între 1.200 și 4.000 USD per kilogram, în timp ce vanilina sintetică costă mai puțin de 15 USD per kilogram.

Deși metoda chimică de producere a vanilinei are costuri reduse, aceasta prezintă dezavantaje, precum probleme legate de poluare și lipsa selectivității substratului, care limitează atractivitatea acestei metode. În plus, vanilina sintetizată este considerată artificială și, prin urmare, utilizarea ei este strict reglementată în industria alimentară și farmaceutică conform legislației UE.

Ca alternativă, producția biotehnologică de vanilină, considerată „identică cu cea naturală", prezintă un interes semnificativ. Aceasta implică de obicei metode precum transformarea microbiană, sinteza enzimatică, fermentarea directă, toate utilizând o varietate de materii prime. În literatura de specialitate sunt cunoscute diverse microorganisme care pot să producă vanilină, precum *Saccharomyces cerevisiae, Corynebacterium glutamicum, Aspergillus niger, Pycnoporus cinnabarinus, Escherichia coli recombinantă* etc.

Una dintre cea mai rentabilă metodă este biosinteza *de novo* (Fig. 11.3), din surse simple de carbon, cum ar fi glucoza, deoarece aceste surse sunt mult mai ieftine și mai ușor disponibile.

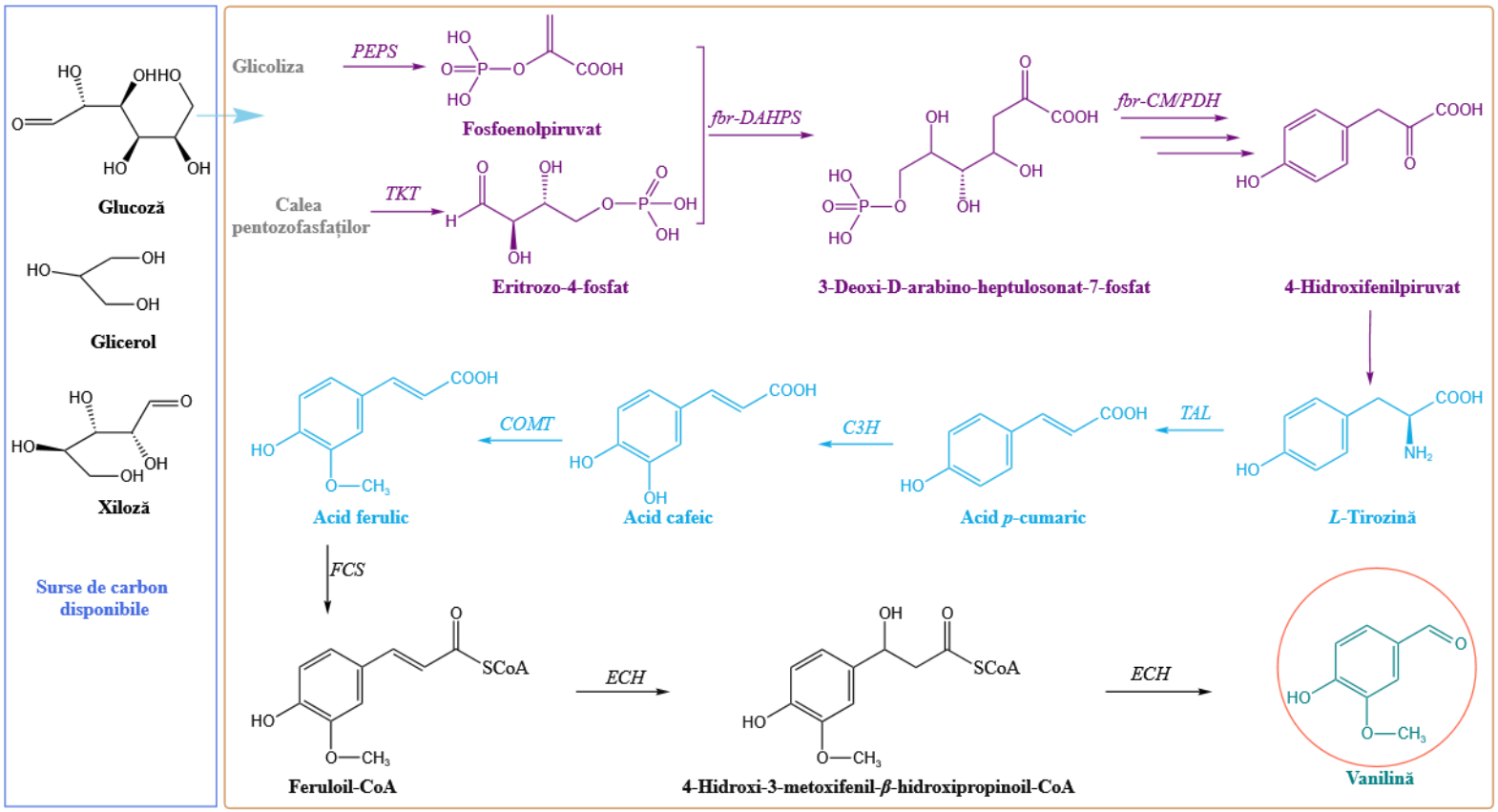


Figura 11.3. Mecanismul schematic de biosinteză a vanilinei în microorganisme modificate genetic

TyrR – proteină reglatoare; PEPS – fosfoenolpiruvat sintetază; TKT – transketolază; fbr-DAHPS – fbr-3-deoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat sintază; fbr-CM/PDH – fbr-chorismat mutază/prefenat dehidrogenază; TAL – tirozin amoniac-lază; C3H – 4-cumarat 3-hidroxilază; COMT – cafeat O-metiltransferază; FCS – trans-feruloil-CoA sintetază; ECH – enoil-CoA hidratază/aldolază.

Biosinteza *de novo* a vanilinei din surse de carbon simple, precum glucoza, xiloza și glicerolul, reprezintă o metodă biotehnologică avansată care implică ingineria metabolică a microorganismelor, de obicei bacterii precum *Escherichia coli* sau drojdii precum *Saccharomyces cerevisiae*. Această metodă utilizează surse de carbon ieftine și abundente ca substrat pentru producerea vanilinei, prin reconstrucția și optimizarea căilor metabolice naturale și artificiale.

Metoda dată începe cu reconstrucția căii aromatice comune, responsabile pentru sinteza *L*-tirozinei (Fig. 11.3, partea violetă), un precursor esențial pentru biosinteza vanilinei. În această etapă, glicoliza și ciclul pentozofosfat furnizează precursorii fosfoenolpiruvat (PEP) și eritroza-4-fosfat (E4P). Acești precursori sunt transformați prin condensare în 3-deoxi-*D*-arabino-heptulozonat-7-fosfat, care ulterior este convertit în 4-hidroxifenilpiruvat. Acesta ulterior este transformat în *L*-tirozină prin activitatea enzimelor specifice.

În etapa următoare *L*-tirozina este transformată în acid ferulic prin reacții enzimatice (Fig. 11.3, secvența în albastru deschis). Tirozin amoniac-liaza (TAL) convertește *L*-tirozina în acid *p*-cumaric. Ulterior acidul *p*-cumaric este transformat în acid cafeic sub acțiunea 4-cumarat 3-hidroxilazei (C3H). Cafeat *O*-metiltransferaza (COMT) metilează acidul cafeic, generând acid ferulic.

În ultima etapă acidul ferulic este transformat în vanilină prin trei etape enzimatice (Fig. 11.3, secvența din partea de jos, colorată în negru). Inițial, feruloil-CoA sintetaza (FCS) activează acidul ferulic sub formă de feruloil-CoA. Apoi enoil-CoA hidrataza/aldolaza (ECH) reduce feruloil-CoA la 4-hidroxi-3-metoxifenil-*β*-hidroxipropinoil-CoA, iar ulterior la vanilină.

O altă metodă de producere biotehnologică a vanilinei este sinteza enzimatică. Această metodă implică utilizarea enzimelor specifice pentru a converti precursorii chimici, precum acidul ferulic, eugenol, izoeugenol etc., în vanilină. Aceasta este o metodă biotehnologică eficientă și ecologică, fiind o alternativă importantă a sintezei chimice. Procesul poate fi realizat într-un bioreactor utilizând enzime libere sau imobilizate.

Eugenolul, un compus aromatic extras din uleiuri esențiale (ex., cuișoare, scorțișoară), este utilizat ca precursor în sinteza enzimatică a vanilinei. Această metodă implică mai multe etape de biotransformare catalizate de enzime care convertesc eugenolul în vanilină într-un mod eficient și ecologic (Fig. 11.4).

În prima etapă are loc obținerea aldehidei coniferalice, pentru aceasta eugenolul este hidrolizat la alcool coniferilic prin intermediul alcool hidrolazei. Ulterior, în prezența coniferil alcool dehidrogenazei, acesta este oxidat la aldehida coniferilică prin intermediul unei reacții de dehidrogenare.

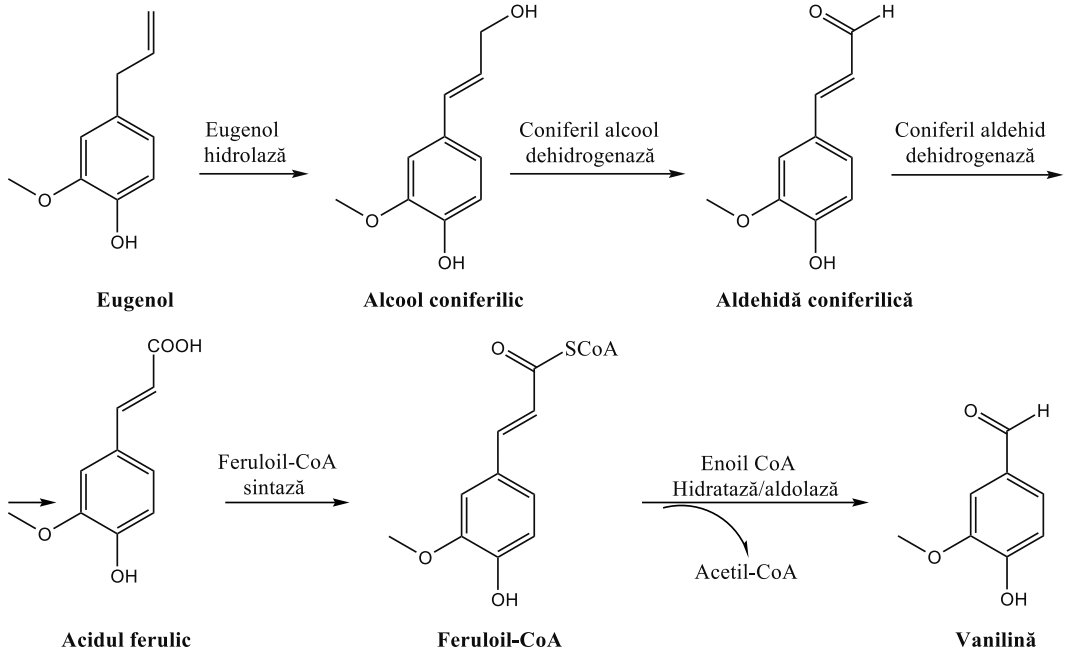


Figura 11.4. Biosinteza enzimatică a vanilinei din eugenol

În etapa a doua, aldehida coniferilică este oxidată la acid ferulic prin intermediul unei reacții de dehidrogenare, în prezența coniferil aldehid dehidrogenazei. În ultima etapă are loc activarea acidului coniferilic prin intermediul feruloil-CoA sintazei în feruloil-CoA, care este ulterior redus la vanilină prin intermediul enoil CoA hidratazei/aldolazei.

Metodele enzimatice prezintă avantaje: selectivitate ridicată (enzimele implicate catalizează reacții specifice, reducând formarea produselor secundare), proces ecologic (nu necesită utilizarea solvenților toxici), compatibilitate industrială (procesul poate fi integrat cu alte fluxuri tehnologice datorită flexibilității materiei prime). Totodată, aceste metode prezintă un număr important de dezavantaje: enzime costisitoare (necesitatea unor enzime de înaltă calitate crește costurile procesului), randament variabil (concentrațiile mari de vanilină inhibă enzimele, iar reacțiile incomplete pot reduce eficiența procesului), necesitatea unui control strict al condițiilor (pH-ul, temperatura și concentrația substratului trebuie monitorizate pentru a preveni inhibarea reacției).

Biosinteza γ-decalactonei

γ-Decalactona ($C_{10}H_{18}O_2$) este un ester intramolecular al acidului 4-hidroxidecanoic. Este un lichid uleios, incolor, caracterizat printr-o notă intensă, cremoasă de piersici, perceptibilă chiar și la concentrații foarte scăzute –

aproximativ 88 mg/L în soluții apoase. Aplicația principală a γ-decalactonei constă în crearea compozițiilor de parfum cu note de piersici, mango, căpșuni și ciocolată.

Deși γ-decalactona este o componentă naturală a parfumului multor fructe, extracția sau distilarea acesteia din surse naturale nu este profitabilă din cauza conținutului scăzut. Prin urmare, producția actuală de γ-decalactonă se bazează în principal pe metode chimice sau biotehnologice.

Metodele chimice prezintă dezavantaje precum sinteza în mai multe etape și lipsa selectivității. În schimb, metodele biotehnologice, deși mai puțin eficiente, sunt selective. Aceste metode biotehnologice pentru sinteza γ-decalactonei se bazează în principal pe procesele de degradare oxidativă a acizilor grași, care au loc în peroxizomii drojdiilor.

Studiile anterioare privind biosinteza γ-decalactonei au condus la selectarea mai multor specii de drojdii care pot să catalizeze procesele de **β-oxidare** și de reducere a legăturilor duble nesaturate din acidul ricinoleic. Dintre microorganismele care sintetizează γ-decalactona din acidul ricinoleic sau esterii săi se disting următoarele specii de drojdii: *Candida tropicalis, Pichia pastoris, Sporobolus salmonicolor, Rhodotorula glutinis* și *Yarrowia lipolytica*.

Sinteza biotehnologică a γ-decalactonei (GDL) se bazează pe biotransformarea acidului ricinoleic sau a derivaților săi în prezența microorganismelor. În scopuri economice, se utilizează în mod obișnuit uleiul de ricin (lat. *Oleum ricini*), obținut din semințele plantei de ricin (*Ricinus communis*), în care acidul ricinoleic constituie aproximativ 80% din trigliceride. Inițial uleiul de ricin este procesat pentru a izola acidul ricinoleic sau esterii acestuia (de ex., esteri metilici), apoi este introdus în mediul de fermentare, care conține specii de drojdii ce pot să oxideze și să ciclizeze substratul (Fig. 11.5).

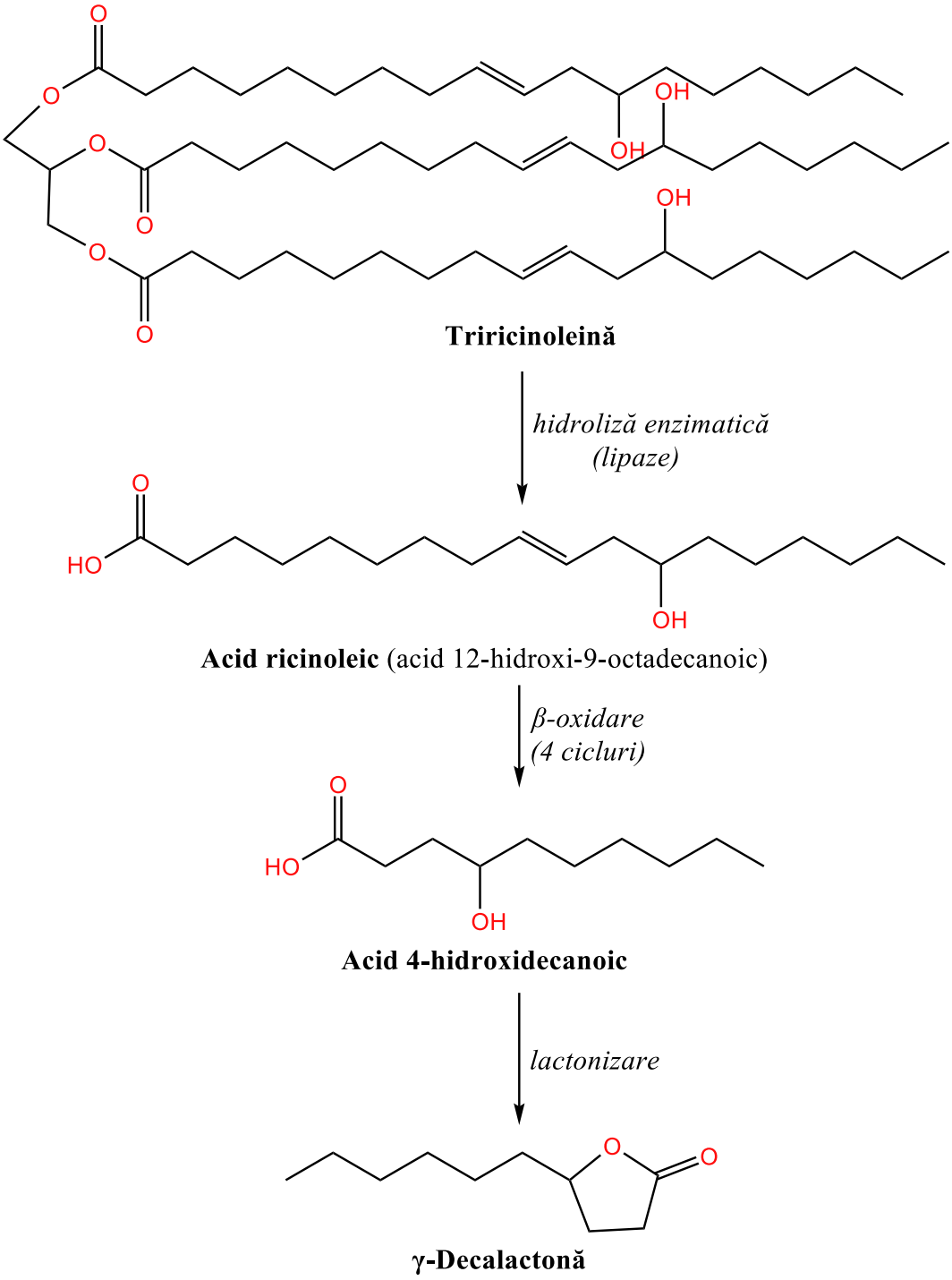


Figura 11.5. Ecuațiile reacțiilor de biosinteză a *γ*-decalactonei din ulei de ricin

Degradarea lipidelor începe cu activitatea lipazelor extracelulare, care hidrolizează triacilglicerolii în acizi grași liberi. Procesul de *β*-oxidare are loc în peroxizomii microorganismelor, unde acizii grași sunt scindați treptat în unități de doi atomi de carbon (acetil-CoA).

Acidul ricinoleic trece prin patru cicluri de *β*-oxidare, în timpul cărora sunt eliminate fragmente a câte doi atomi de carbon. Acest proces decurge sub acțiunea enzimelor: *Acil-CoA oxidaza* – catalizează prima etapă de dehidrogenare a acidului gras, *2-Enoil-CoA hidrataza* – introduce o grupare hidroxil, *3-Hidroxiacil-CoA dehidrogenaza* – oxidează intermediarii hidroxilici și *Cetoacil-CoA tiolaza* – scindează lanțul acil-CoA pentru a elimina unitățile de acetil-CoA. După patru cicluri de *β*-oxidare, lanțul acidului ricinoleic este redus la acid 4-hidroxidecanoic, un precursor al *γ*-decalactonei. În mediu acid (pH 2,0) și la încălzire (80-100ºC), printr-o reacție de esterificare și lactonizare intramoleculară, acidul 4-hidroxidecanoic este transformat în *γ*-decalactona.

Producerea *γ*-decalactonei prin metode biotehnologice are numeroase avantaje: se obține un produs „identic natural” care se folosește pe larg în industria alimentară și cosmetică, enantiospecific, se evită multiplele etape chimice și deșeurile toxice. Dintre principalele dezavantaje pot fi enumerate: randamentul relativ scăzut comparativ cu sinteza chimică, necesitatea unui control strict al condițiilor de fermentare.

11.3. Biotehnologia 2-feniletanolului: materii prime, biosinteză, izolare și purificare

2-Feniletanolul (2-FE) este un alcool aromatic, cunoscut pentru mirosul său intens, cu note de trandafir. Mirosul plăcut îl face foarte apreciat în diverse sectoare industriale, inclusiv cosmetice, farmaceutice și în industria alimentară și a băuturilor. De exemplu, este utilizat ca ingredient în parfumuri, șampoane și săpunuri. Proprietățile sale antibacteriene și antifungice îl fac un aditiv valoros, deoarece nu doar conferă un parfum atractiv, dar și protejează produsele de contaminarea microbiană, prevenind astfel deteriorarea acestora.

2-FE are o valoare de piață remarcabilă. În 2021, producția anuală globală de 2-FE a depășit 10.000 de tone. Pe de altă parte, 2-FE se găsește în mod natural și este extras, în mod tradițional, din uleiurile esențiale ale multor flori, inclusiv iasomie, zambile, crin și trandafiri. Cu toate acestea, concentrația scăzută de 2-FE în flori face ca procesul de extracție să fie costisitor și complex, alături de impactul negativ asupra mediului cauzat de eliminarea deșeurilor. Disponibilitatea 2-FE natural în flori este influențată de fluctuațiile sezoniere și de susceptibilitatea la boli și dăunători, ceea ce constrânge și mai mult furnizarea de 2-FE natural. Acești

factori contribuie la creșterea prețului 2-FE natural, care ajunge de obicei la aproximativ 1000 USD/kg și este susceptibil să crească în continuare odată cu majorarea cererii.

În prezent, cea mai mare parte a 2-FE este produsă prin sinteză chimică, non-ecologică. Calitatea produsului obținut prin metoda chimică nu este suficientă, ceea ce restrânge gama de aplicații a acestuia. Deoarece produsele de fermentare sunt considerate naturale conform legislației europene și americane atunci când sunt obținute din substraturi naturale, metodele biotehnologice, în special fermentațiile microbiene, reprezintă alternative promițătoare pentru producerea 2-FE natural din plante. Producția de bioproduse cu valoare adăugată prin fermentarea microorganismelor (fungii, bacterii) este o tendință importantă în sectorul biotehnologic. În mod special, utilizarea subproduselor agroindustriale ca substraturi în aceste procese biotehnologice atrage un interes considerabil. Prețul estimat al 2-FE produs prin metoda biotehnologică este de aproximativ 220 USD/kg, care este de 4-5 ori mai mic decât cel obținut prin extracția din plante.

2-PE poate fi sintetizat de mai multe specii de drojdii, inclusiv *Yarrowia lipolytica, Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus, Pichia fermentans, Candida glycerinogenes, Zygosaccharomyces rouxii* etc. *Y. lipolytica* poate metaboliza o gamă largă de substraturi, inclusiv glucoza, fructoza și glicerolul, dar nu și zaharoza. Unul dintre avantajele majore ale acestei specii este faptul că poate atinge densități mari de celule fără acumulare de etanol în condiții aerobe. În drojdii, 2-FE poate fi sintetizat prin catabolismul aminoacizilor utilizând două căi distincte, precum bioconversia *L*-Phe prin calea *Ehrlich* și biosinteza *de novo,* pornind de la monozaharide, prin calea *shikimatului*. Costul ridicat și disponibilitatea limitată a *L*-Phe reprezintă factori restrictivi pentru producția industrială de 2-FE prin calea *Ehrlich*. Acest lucru face ca biosinteza *de novo* să fie o alternativă mai economică. Pentru a crește eficiența biosintezei *de novo* care are randamente scăzute sunt utilizate strategiile de inginerie genetică, prin intensificarea fluxurilor metabolice din calea *shikimatului*.

Reieșind din cele expuse, la nivel industrial, pentru producerea 2-FE prin biotehnologie este utilizată predominant metoda prin biosinteza *de novo*. Aceasta implică utilizarea microorganismelor modificate genetic, precum specii de *Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus* sau specii de *Escherichia coli, Y. Lipolytica,* care pot metaboliza surse simple de carbon (cum ar fi glucoza, xiloza sau glicerolul) pentru a produce 2-FE prin căi metabolice specifice. Procesul de producție al 2-FE este influențat semnificativ de compoziția mediului de cultură și de condițiile de funcționare a reactorului. Acești factori determină creșterea microbiană și activarea căilor metabolice implicate în biosinteza 2-FE, influențând

astfel productivitatea procesului și relevanța economică a acestuia. În ceea ce privește compoziția mediului de cultură, sursele de azot, nutrienții esențiali și sursele de carbon reprezintă factori critici pentru optimizarea producției de 2-FE. De asemenea, parametrii de fermentare, cum ar fi pH-ul, temperatura și aerarea, au un rol crucial în îmbunătățirea randamentului și stabilității procesului. Numeroase studii au fost efectuate pentru a identifica cele mai atractive din punct de vedere economic căi de biosinteză, pentru producerea industrială a 2-FE. Pentru aceasta, în calitate de sursă de carbon în procesul de fermentare sunt folosite numeroase deșeuri agroalimentare, precum melasa, extractul de porumb, coji de orez, fibre de soia, fibre de orez, cozi de sparanghel, coji de portocală, coji de banană, tescovină de măr verde, tescovină de măr roșu etc. Compoziția tipică a mediului nutritiv, recalculată la un litru, la producerea biotehnologică a 2-feniletanolului prin metoda biosintezei *de novo* cu *Yarrowia lipolytica* este prezentată în tabelul 11.1.

Tabelul 11.1. Compoziția mediului nutritiv pentru producerea biotehnologică a 2-FE prin metoda biosinteza *de novo* cu *Yarrowia lipolytica*

Mediu	**Component**	**Concentrația optimă, g/L**	**Rolul în mediu**
de inoculare	Melasă	30,00	sursă de carbon principală
	Extract de drojdie	5,00	sursă de vitamine și nutrienți
	Uree	1,00	sursă de azot
	KH_2PO_4	2,00	reglator de pH și furnizează fosfați
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50	cofactor enzimatic
	NaCl	0,10	menține echilibrul osmotic
	Apă	până la un litru	mediu pentru dizolvare
de fermentare	Melasă	50,00	sursă principală de carbon
	Extract de drojdie	5,00	sursă de aminoacizi, vitamine, oligoelemente
	Uree sau $(NH_4)_2SO_4$	1,50	sursă de azot
	KH_2PO_4 / K_2HPO_4	1,00	sursă de fosfor și tampon pH
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50	sursă de magneziu și sulf
	$ZnSO_4$	0,01	oligoelement
	$MnSO_4$	0,01	oligoelement
	$FeSO_4$	0,01	oligoelement
	$CuSO_4$	0,01	oligoelement
	NaOH / H_3PO_4	Ajustat la pH 6,00	reglator de pH
	Vitamine B	0,01	factori de creștere
	Apă	până la un litru	mediu pentru dizolvare

Mediul utilizat pentru pregătirea inoculului trebuie să susțină creșterea optimă a celulelor și să asigure o densitate celulară ridicată. Un produs secundar

important al procesului de rafinare a zahărului este melasa de sfeclă de zahăr, care este bogată în zaharoză (≈39% din carbohidrați), glucoză (≈16%) și fructoză (≈17%), ceea ce o face o sursă de carbon potrivită pentru creșterea microbiană. Pe lângă carbohidrați, melasa mai conține urme de compuși de azot și micronutrienți, inclusiv vitamine și minerale, cum ar fi calciu, magneziu, sodiu și potasiu.

Pentru producerea biotehnologică a 2-FE (Fig. 11.6), inițial se pregătește mediul de cultură cu compoziția prezentată în tabelul 11.1. Mediul de inoculare se pregătește în rezervorul **(1)**, iar mediul pentru fermentare în rezervorul **(2)**. Melasa care se păstrează în rezervorul **(3)** se dozează în omogenizatorul **(4)** cu ajutorul dozatorului **(5)**, unde se dozează și extractul de drojdii cu ajutorul dozatorului **(6)**. Cu ajutorul soluțiilor de H_3PO_4 (vasul **(8)**) și NaOH (vasul **(9)**) se ajustează valoarea pH-ului la 5,5-6,0, cu ajutorul dozatorului **(7)**. Mediul de inoculare se sterilizează în coloane de sterilizare **(10)**, în flux continuu la temperaturi ridicate (130–140ºC, care se mențin cu ajutorul încălzitorului **(11)**) timp de 15–30 de secunde, urmat de răcire rapidă (≈30–40ºC, cu ajutorul refrigerentului). Această metodă minimizează deteriorarea componentelor sensibile din mediul de cultură (de exemplu, vitaminele) și evită caramelizarea zaharurilor din melasă și denaturarea proteinelor (din extractul de drojdii). Mediul de inoculare sterilizat este trecut în bioreactorul de inoculare cu agitare mecanică **(12)**, cu volumul de 5 m^3, unde se inoculează cultura pură de *Y. lipolytica* modificată genetic, la temperatura de 28-30ºC, agitare continuă de 150-200 rpm și aerare de 1,5-2,0 vvm, pH-ul 5,5-6,0, timp de 16-24 de ore. Transferul culturii din bioreactorul de inoculare în bioreactorul de fermentare se face după atingerea densității celulare 10^7-10^8 CFU/mL. Mediul pentru fermentare (vasul **(2)**), cu compoziția prezentată în tabelul 11.1, este la fel sterilizat în coloanele de sterilizare și se transferă în bioreactorul de fermentare **(13)**, care are volumul de 50 m^3, unde se ajustează automat valoarea pH-ului la 5,5-6,0 pentru a rămâne în acest interval pe durata fermentării (pentru a menține activitatea optimă a enzimelor implicate). Deoarece fungii *Y. lipolytica* sunt microorganisme aerobe, aerarea (1,5-2,0 vvm) și agitarea (200-400 rpm) se face pe toată durata procesului de fermentare, pentru a preveni acumularea de etanol în bioamestec. Aerul admis în bioreactoare se sterilizează prin două filtre, cu care sunt echipate fiecare bioreactor.

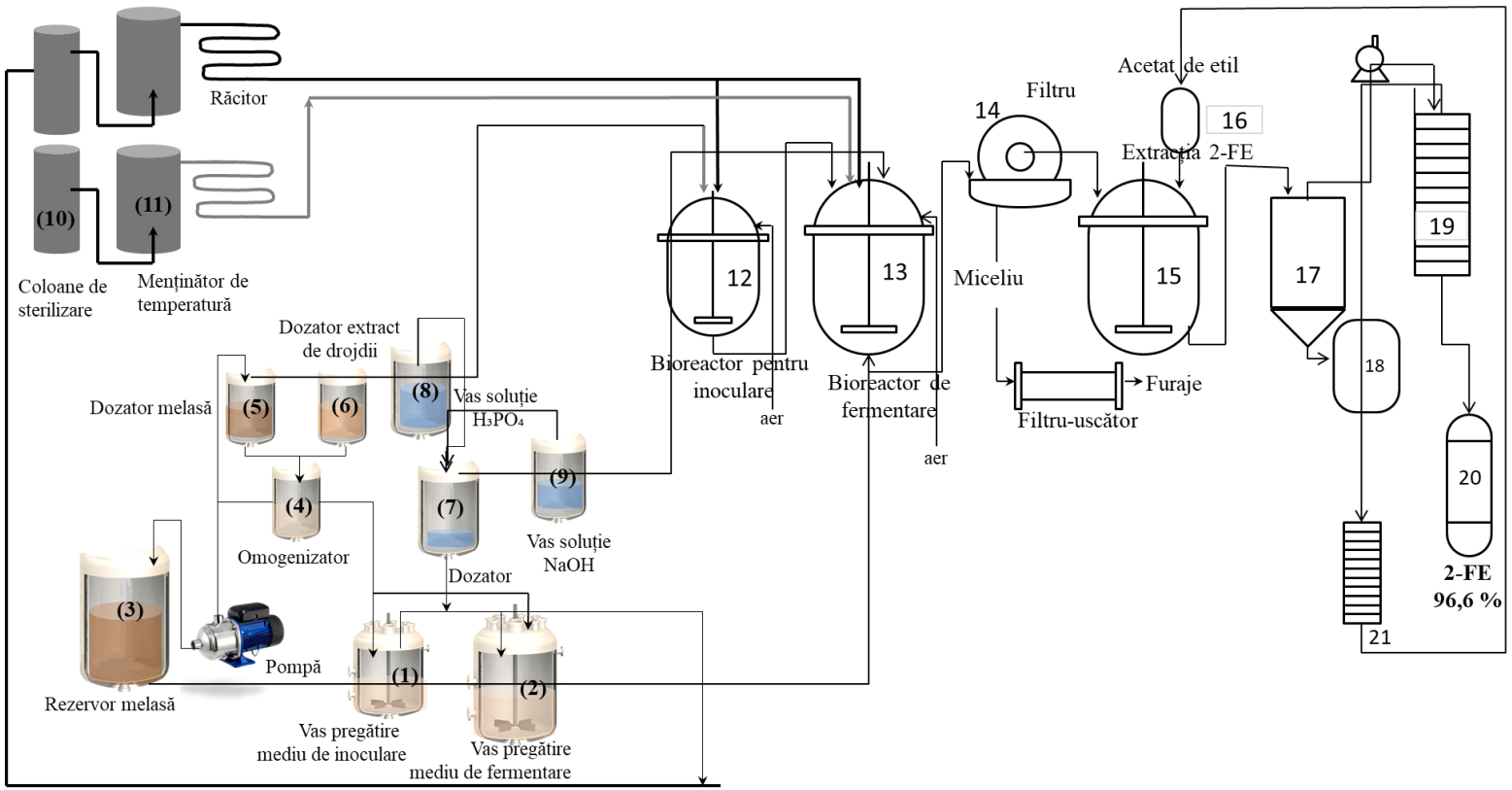


Figura 11.6. Schema tehnologică de producere a 2-FE prin metoda biosintezei *de novo* cu *Yarromia lipolytica*

Durata fermentării este în intervalul de 96-120 de ore (4-5 zile). Melasa se adaugă în porții mici, la intervale regulate (ex., fiecare 12 ore), sau prin alimentare continuă la o rată controlată (din rezervorul (**3**)). Concentrația totală a zaharurilor în bioamestec nu trebuie să depășească 50–70 g/L pentru a evita inhibiția osmotică. 2-FE produs prin biosinteza *de novo* în *Y. lipolytica* este un metabolit extracelular, fiind secretat în mediul de fermentare pe măsură ce este sintetizat. Această caracteristică simplifică semnificativ procesul de separare și purificare. Prin această metodă se obține 2-FE în concentrații de până la 2,0-3,0 g/L, concentrațiile mai mari sunt citotoxice pentru majoritatea microorganismelor, inclusiv pentru *Y. lipolytica.* După finalizarea fermentării, soluția nativă este pompată în filtrul cu microfiltrare (**14**) pentru separarea biomasei. Biomasa (miceliul) se colectează în rezervorul filtrul-uscător, unde se usucă, iar ulterior este folosită ca adaos în furajele animaliere. Soluția limpede cu conținut de 2-FE este colectată în extractorul lichid-lichid (**15**). În calitate de solvent de extracție a 2-FE este folosit acetatul de etil, care se dozează în extractorul din rezervorul (**16).**

2-FE are o solubilitate înaltă în acetatul de etil, astfel se transferă din faza apoasă în faza organică. Pentru a separa faza organică (acetatul de etil care conține 2-FE) de faza apoasă se folosește separatorul gravitațional (**17**). Faza organică în care în mare parte se conține actetatul de etil și 2-FE se colectează în partea superioară și se pompează cu ajutorul pompei, pentru a mări presiunea, în coloana de distilare (**19**). Iar faza apoasă este colectată în partea inferioară în rezervorul (**18**), de unde ulterior va fi transportată în stația de tratare a apelor reziduale. 2-FE este colectat în partea de jos a coloanei de distilare (**19**), sub formă concentrată (96,6%), în rezervorul (**20**), iar acetatul de etil se colectează în partea superioară a rezervorului și trece în coloana de distilare (**21**) pentru recuperarea acestuia din apă. Acetatul de etil recuperat este reciclat în rezervorul (**16**), pentru a fi refolosit în procesul de extracție. Prin această metodă randamentul de recuperare a 2-FE din soluția nativă este de 99,8%, datorită selectivității solventului și diferenței mari a temperaturilor de fierbere dintre acetatul de etil (77,1ºC) și 2-FE (219-222ºC).

În funcție de domeniul utilizării, 2-FE poate fi supus în continuare procesului de purificare sau cristalizare. Pentru a obține 2-FE cu puritate extrem de ridicată (99,9%), necesară pentru uz farmaceutic sau cosmetică de lux, se folosesc coloanele cromatografice. Această metodă se bazează pe separarea pe baza diferențelor de polaritate între 2-FE și alte impurități utilizând o coloană cromatografică (cromatografie de lichide de înaltă performanță – HPLC). În caz de necesitate se face cristalizarea 2-FE. Pentru aceasta are loc supersaturarea soluției de 2-FE și cristalizarea lui la temperaturi scăzute.

Distilarea fracționată combinată cu extracția lichid-lichid este cea mai practică și economică pentru cantități mari. Alegerea metodei depinde de costuri, volum și de cerințele de puritate ale utilizării finale.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați aromele cosmetice și evidențiați rolul și funcțiile lor în industria cosmetică.
2. Prezentați și explicați ecuațiile de biosinteză a eugenolului și a *γ*-decalactonei.
3. Prezentați și explicați ecuațiile de biosinteză a 2-feniletanolului și a vanilinei.
4. Elaborați și explicați schema de biosinteză a 2-FE.
5. Elaborați și explicați schema de biosinteză a eugenolului și a vanilinei.
6. Elaborați și explicați schema tehnologică de producere a 2-FE pe calea biosintezei *de novo*.
7. Descrieți factorii critici în biosinteza 2-FE.
8. Propuneți metode de izolare și purificare a 2-feniletanolului din soluția nativă după fermentare.
9. Argumentați avantajele producerii aromelor cosmetice prin procese biotehnologice.
10. Propuneți metode pentru creșterea productivității aromelor cosmetice prin procese biotehnologice.

BIBLIOGRAFIE

1. KOEDUKA, T., FRIDMAN, E., GANG, D.R., VASSAO, D.G., JACKSON, B.L., KISH, C.M., PICHERSKY, E. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized *via* reduction of a coniferyl alcohol ester. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(26), pp. 10128–10133. https://doi.org/10.1073/pnas.0603732103.
2. CHREPTOWICZ, K., WIELECHOWSKA, M., GŁÓWCZYK-ZUBEK, J., RYBAK, E., MIERZEJEWSKA, J. Production of natural 2-phenylethanol: From biotransformation to purified product. In: *Food and Bioproducts Processing*, 2016, 100, pp. 275–281. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.07.011.
3. GUANGLU, W., MENGYUAN, W., JINCHU, Y., QIAN, L., NIANQING, Z., LANXI, L., XIANMEI, H., XUEPENG, Y. *De novo* Synthesis of 2-phenylethanol from Glucose by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(6). https://doi.org/10.1093/jimb/kuac026.

4. ZHAN, Y., ZHOU, M., WANG, H., CHEN, L., LI, Z., CAI, D., CHEN, S. Efficient synthesis of 2-phenylethanol from *L*-phenylalanine by engineered *Bacillus licheniformis* using molasses as carbon source. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104, pp. 7507-7520. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10740-7.
5. ETSCHMANN, M.M., BLUEMKE, W., SELL, D., SCHRADER, J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1), pp. 1–8. https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x.
6. ACHMON, Y., BEN-BARAK ZELAS, Z., FISHMAN, A. Cloning Rosa hybrid phenylacetaldehyde synthase for the production of 2-phenylethanol in a whole cell *Escherichia coli* system. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 98(8), pp. 3603–3611. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5269-z.
7. MO, Q., CHEN, H., FAN, C., ZHANG, D., LIU, L., FU, B., YUAN, J. Utilization of a styrene-derived pathway for 2-phenylethanol production in budding yeast. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6), pp. 2333–2340. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11186-1.
8. KONG, S., PAN, H., LIU, X., LI, X., GUO, D. *De novo* Biosynthesis of 2-Phenylethanol in Engineered *Pichia pastoris*. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 133, 109459. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109459.
9. YE, Q., XU, W., HE, Y., LI, H., ZHAO, F., ZHANG, J., SONG, Y. Biosynthesis of Vanillin by Rational Design of Enoyl-CoA Hydratase/Lyase. In: *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(17), 13631. https://doi.org/10.3390/ijms241713631.
10. MA, Q., LIU, L., ZHAO, S., HUANG, Z., LI, C., JIANG, S., LI, Q., GU, P. Biosynthesis of vanillin by different microorganisms: a review. In: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 38(40). https://doi.org/10.1007/s11274-022-03228-1.
11. KAUR, B., CHAKRABORTY, D. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: a Review. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(4), pp. 1353–1372. https://doi.org/10.1007/s12010-012-0066-1.
12. KLAUS, T., SEIFERT, A., HÄBE, T., NESTL, B.M., HAUER, B. An Enzyme Cascade Synthesis of Vanillin. In: *Catalysts*, 2019, 9(3), 252. https://doi.org/10.3390/catal9030252.
13. GARCÍA-BOFILL, M., SUTTON, P.W., GUILLÉN, M., ÁLVARO, G. Enzymatic synthesis of vanillin catalyzed by an eugenol oxidase. In: *Applied Catalysis A: General*, 2019, 582, 117117. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2019.117117.
14. MAŁAJOWICZ, J., NOWAK, D., FABISZEWSKA, A., IULIANO, A. Comparison of gamma-decalactone biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica* MTLY40-2p and W29 in batch-cultures. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34(1), pp. 330–340. https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1749528.

15. MAŁAJOWICZ, J., FABISZEWSKA, A., NOWAK, D., KUŚMIREK, S. Improved Gamma-Decalactone Synthesis by *Yarrowia lipolytica* Yeast Using Taguchi Robust Design Method. In: *Applied Sciences*, 2022, 12(20), 10231. https://doi.org/10.3390/app122010231.
16. BRAGA, A., BELO, I. Biotechnological production of γ-decalactone, a peach like aroma, by *Yarrowia lipolytica*. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(10). https://doi.org/10.1007/s11274-016-2116-2.
17. SINGH, S., DEEPA, N., RASTOGI, D., CHATURVEDI, S., SYED, N., SINGH, A., NANNAWARE, A.D., ROUT, P.K. Biotransformation of ricinoleic acid to γ-decalactone using novel yeast strains and process optimization by applying Taguchi model. In: *Journal of Biotechnology*, 2023, 377, pp. 34-42. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.10.004.
18. MAŁAJOWICZ, J., KOZŁOWSKA, M. Factors Affecting the Yield in Formation of Fat-Derived Fragrance Compounds by *Yarrowia lipolytica* Yeast. In: *Applied Sciences*, 2021 11(21), 9843. https://doi.org/10.3390/app11219843.
19. ZHANG, H., CAO, M., JIANG, X., ZOU, H., WANG, C., XU, X., XIAN, M. De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. In: *BMC Biotechnology*, 2014, 14(1), 30. https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-30.
20. WANG, Y., ZHANG, H., LU, X., ZONG, H., ZHUGE, B. Advances in 2-phenylethanol production from engineered microorganisms. In: *Biotechnology Advances*, 2019, 37, pp. 403-409. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.005.
21. MITRI, S., LOUKA, N., ROSSIGNOL, T., MAROUN, R.G., KOUBAA, M. Bioproduction of 2-Phenylethanol by *Yarrowia lipolytica* on Sugar Beet Molasses as a Low-Cost Substrate. In: *Fermentation*, 2024, 10(6), 290. https://doi.org/10.3390/fermentation10060290.

12. BIOTEHNOLOGIA POLIFENOLILOR, TERPENELOR ȘI A CAROTENOIDELOR DE INTERES COSMETIC

12.1. Polifenoli, terpene și carotenoide: clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică
12.2. Biosinteza acidului elagic, galic, ferulic și a resveratrolului
12.3. Biotehnologia acidului elagic: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Abilități

Studentul:

- clasifică și relatează despre compușii din clasa polifenolilor, terpenelor și a carotenoidelor de interes cosmetic;
- scrie ecuațiile reacțiilor de biosinteză a acidului elagic, galic, ferulic și a resveratrolului;
- elaborează schema tehnologică și descrie etapele și parametrii tehnici ai procesului biotehnologic de producere a acidului elagic.

12.1. Polifenoli, terpene și carotenoide: clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică

Polifenolii sunt o clasă de compuși organici larg răspândiți în natură. Aceștia se caracterizează prin prezența a cel puțin două grupe hidroxil atașate la inelele fenolice, fiind implicați în numeroase procese biologice, precum protecția împotriva radiațiilor UV, atacurilor microbiene sau altor stresori. Acești compuși sunt extrem de abundenți în plante și includ o varietate de clase structurale. Polifenolii pot fi clasificați pe baza structurii lor chimice, care determină proprietățile și funcțiile acestora (Tab. A.12.1).

Terpenele (cunoscute și sub denumirea de izoprenoide) reprezintă o grupă de compuși organici, heterogeni din punct de vedere structural, foarte răspândiți în natură. Terpenele pot fi clasificate în funcție de numărul de unități izoprenice din moleculă, prefixul din denumirea lor indicând acest număr. În mod obișnuit, terpenele conțin 2, 3, 4, 5 sau 6 unități izoprenice (Tab. A.12.2). Tetraterpenele, formate din 8 unități de izopren, constituie o clasă separată de compuși, cunoscuți sub denumirea de carotenoizi, în timp ce alte terpene cu mai mult de 6 unități izoprenice sunt rare. Grupa terpenelor cuprinde peste 8.000 de terpene și mai mult de 30.000 de substanțe înrudite, denumite terpenoide. Majoritatea terpenelor sunt de origine vegetală, fiind întâlnite mai rar la organismele de origine animală. În natură, acestea se găsesc frecvent sub formă de hidrocarburi, alcooli, glicozide, eteri, aldehide, cetone, esteri și acizi carboxilici. Din punct de vedere biologic, rolul

terpenelor nu este pe deplin cunoscut, însă acestea sunt componente importante ale uleiurilor esențiale, feromonilor, substanțelor bactericide și ale parfumurilor.

Carotenoidele sunt pigmenți organici de culoare galbenă, portocalie și roșie, care sunt produși de plante, alge, precum și de diverse bacterii și ciuperci. Carotenoidele dau culoarea caracteristică dovleceilor, morcovilor, păstârnacului, porumbului, roșiilor, somonului, homarului, creveților și narciselor etc. Peste 1100 de carotenoide identificate pot fi clasificate în trei grupe (Tab. A.12.3). Carotenoidele sunt derivate ale tetraterpenelor, ceea ce înseamnă că sunt formate din 8 unități izoprenice, adică un total de 40 de atomi de carbon. În general, carotenoidele absorb fotonii de lumină la lungimi de undă între 400 și 550 de nanometri (de la lumina violetă până la verde), ceea ce face ca acești compuși să fie profund colorați în galben, portocaliu sau roșu. Carotenoidele sunt pigmentul dominant care contribuie la colorarea frunzelor de toamnă în aproximativ 15-30% dintre speciile de arbori, însă multe dintre culorile plantelor, în special roșul și violetul, se datorează polifenolilor.

Compușii naturali, precum polifenolii, terpenele și carotenoidele, sunt biomolecule esențiale în diverse industrii, în special în farmaceutică și cosmetică, datorită proprietăților lor biologice remarcabile. Obținuți adesea prin biotehnologii avansate, acești compuși oferă alternative sustenabile și eficiente la materialele sintetice. Dezvoltarea biotehnologiilor oferă oportunități valoroase pentru producerea acestor compuși cu un impact minim asupra mediului. Clasificarea, structura, proprietățile și utilizarea în industria cosmetică a unor polifenoli, terpene și carotenoide obținute pe cale biotehnologică sunt prezentate în tabelul A.12.4.

12.2. Biosinteza acidului elagic, galic, ferulic și a resveratrolului

Biosinteza acidului elagic

Acidul elagic este un compus fenolic natural cu proprietăți antioxidante și antiinflamatorii remarcabile. Este prezent în diverse plante, deseori în fructe, semințe și fructe, fiind apreciat pentru beneficiile acestuia în sănătate și în industria cosmetică. Acidul elagic este un polifenol bioactiv derivat din acidul galic, iar biosinteza lui începe de la glucoză pe calea shikimatului, care este o cale metabolică esențială pentru biosinteza compușilor aromatici în plante, fungii și bacterii.

Biosinteza acidului elagic din glucoză, pe calea shikimatului, implică mai multe microorganisme ce pot să producă intermediari esențiali, cum ar fi acidul galic și derivații acestuia. Pentru biosinteza acidului elagic sunt utilizate următoarele microorganisme: bacterii (*Escherichia coli* (modificate genetic prin inginerie), *Corynebacterium glutamicum, Pseudomonas putida*); ciuperci

filamentoase (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trametes versicolor*); actinomicete (*Streptomyces sp.*); drojdii (*Saccharomyces cerevisiae* (modificate genetic)).

În prima etapă glucidele simple, precum glucoza, sunt metabolizate prin glicoliză și calea pentozofosfaților pentru a produce fosfoenolpiruvat (PEP) și eritrozo-4-fosfat (Fig. 12.1), care sunt precursori pentru calea shikimatului.

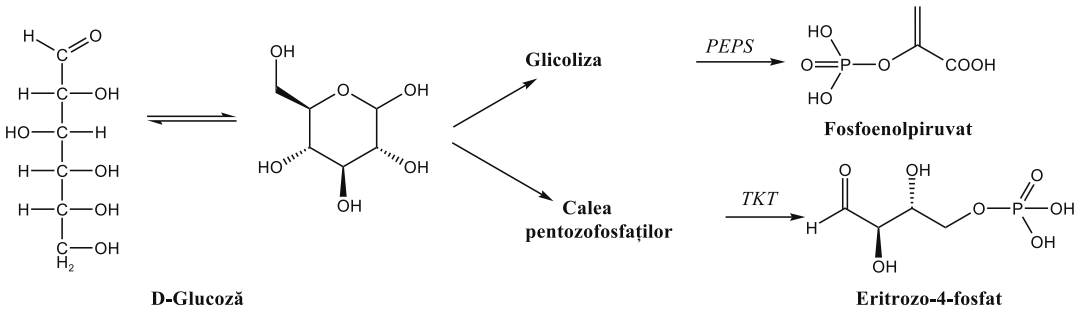


Figura 12.1. Ecuațiile reacțiilor de obținere a PEP și a eritroză-4-fosfatului

În etapa a doua PEP și eritrozo-4-fosfatul condensează și formează acid 3-deoxi-*D*-arabino-heptulozo-7-fosfat (DAHP) (Fig. 12.2). Acesta este transformat în acidul 3-dehidrochinic printr-o reacție de ciclizare intramoleculară. Reacția este catalizată de enzima 3-dehidrochinat sintaza. Acidul 3-dehidrochinic este deshidratat, se elimină o moleculă de apă și se formează acidul 3-dehidroshikimic, reacția este catalizată de 3-dehidrochinază. Acidul 3-dehidroshikimic este redus la acid shikimic printr-o reacție catalizată de shikimat dehidrogenază, reacția necesită NADPH în calitate de donor de electroni. Ulterior acidul shikimic este transformat în shikimat-3-fosfat printr-o reacție de fosforilare catalizată de enzima shikimat kinază. Reacția utilizează ATP ca donor de gruparea fosfat, generând shikimat-3-fosfat și ADP. Transformarea acidului shikimic în shikimat-3-fosfat este o etapă esențială în calea shikimatului, facilitând continuarea biosintezei precursorilor aromatici. În etapa următoare are loc condensarea shikimat-3-fosfatului cu fosfoenolpiruvat (PEP). Shikimat-3-fosfatul reacționează cu fosfoenolpiruvat (PEP) într-o reacție de adiție nucleofilică. Enzima 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintază (EPSP sintază) catalizează atacul nucleofil al grupării hidroxil de la C_5 al shikimat-3-fosfatului asupra carbonului electrofil al PEP. În această reacție se formează o legătură C–C între structura shikimatului și gruparea enolpiruvilică.

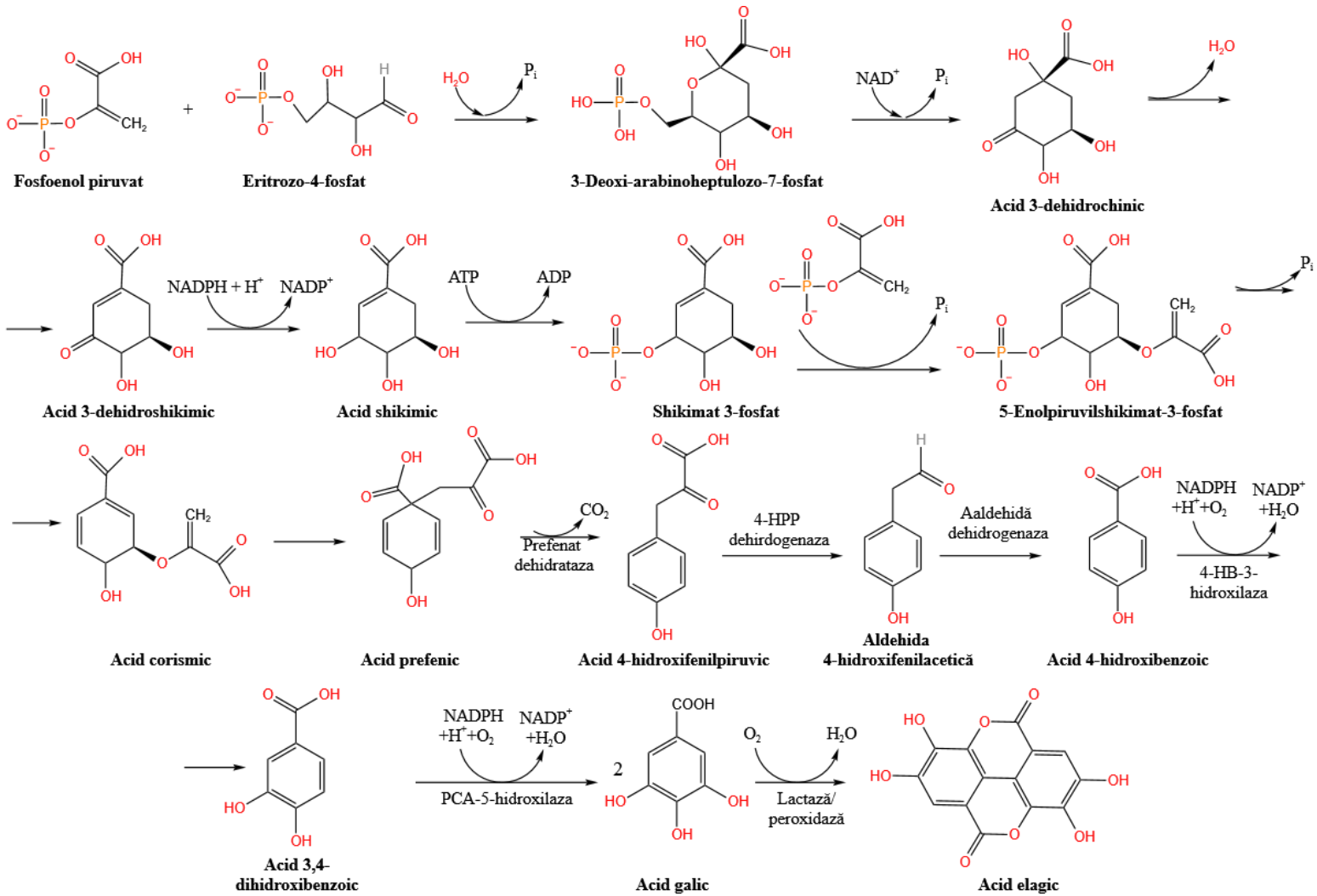


Figura 12.2. Mecanismul de biosinteză a acidului elagic pe calea shikimatului

Ulterior se formează un intermediar, care suferă o rearanjare pentru a elibera un rest fosfat (Pi). După eliberarea grupării fosfat din PEP, rămâne un intermediar instabil care se rearanjează printr-un mecanism enzimatic specific. Ca rezultat se formează 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat (EPSP), un precursor-cheie în sinteza corismatului. Apoi are loc eliberarea fosfatului și formarea acidului corismic. Reacția dată este catalizată de corismat sintaza. Enzima determină eliminarea fosfatului anorganic (Pi) din EPSP, generând un intermediar enolic. Acest intermediar se rearanjează spontan printr-o tautomerizare, ducând la formarea unui inel ciclohexadienic conjugat, caracteristic acidului corismic.

În etapa a treia are loc conversia acidului corismic în acid prefenic, reacția este catalizată de enzima corismat mutază. Această enzimă catalizează o transpoziție *Claisen* intramoleculară a acidului corismic. Transformarea duce la rearanjarea moleculară, rezultând un compus cu inel ciclohexadienic reorganizat – acidul prefenic. Ulterior acidul prefenic este convertit în acidul 4-hidroxibenzoic (4-HBA). Acidul prefenic suferă o reacție de decarboxilare oxidativă catalizată de prefenat dehidratază. Aceasta elimină o moleculă de CO_2, transformând acidul prefenic în acid 4-hidroxifenilpiruvic (4-HPP). Acidul 4-HPP este transformat în aldehida 4-hidroxifenilacetică printr-o reacție de transaminare catalizată de enzima 4-hidroxifenilpiruvat dehidrogenază (4-HPP dehidrogenaza). Ulterior aldehida 4-hidroxifenilacetică este oxidată în acidul 4-hidroxibenzoic (4-HBA) de către aldehid dehidrogenază. În etapa următoare are loc conversia 4-HBA în acid galic. Pentru aceasta inițial are loc hidroxilarea 4-HBA la acid 3,4-dihidroxibenzoic (acid protocatechuic, PCA). Enzima 4-hidroxibenzoat-3-hidroxilază (4-HB-3hidroxilaza) introduce o grupare hidroxil în poziția meta (C_3) a nucleului benzenic, acest proces necesită NADPH și O_2. Ulterior are loc hidroxilarea acidului protocatechuic în acidul galic, reacția este catalizată de enzima 3,4-dihidroxibenzoat-5-hidroxilază (PCA-5-hidroxilaza), care adaugă a treia grupă hidroxil în poziția para (C_5). Procesul este de asemenea dependent de NADPH și O_2.

În ultima etapă biochimică (etapa a patra) are loc conversia acidului galic în acid elagic. Pentru aceasta inițial acidul galic este oxidat de laccaze sau peroxidaze, generând un radical fenoxidic stabilizat prin rezonanță. Radicalii se cuplează la pozițiile C_5 și $C_{5'}$ ale celor două molecule de acid galic, formând un intermediar hexahidroxidifenic. Ulterior, sub acțiunea enzimelor taninază, intermediarul dimeric suferă esterificare intramoleculară, formând o punte lactonică. Acest proces transformă intermediarul într-o structură biciclică stabilă, rezultând acidul elagic. Mecanismul schematic (simplificat) de obținere a acidului elagic pe calea shikimatului este prezentat în figura A.12.1.

Actualmente, obținerea biotehnologică a acidului elagic se bazează pe bioconversia elagitaninelor prin procese enzimatice sau fermentative folosind microorganisme specifice, precum: *Aspergillus niger, Penicillium spp., Bacillus subtilis, Streptomyces spp., Lactobacillus plantarum* etc. Elagitaninele sunt prezente în diverse surse vegetale, cum ar fi: rodia (*Punica granatum*) – bogată în punicalagin; nucile (*Juglans regia*) – conțin casuarinin și tellimagrandin; fructe de zmeură și mure (*Rubus spp.*) – conțin sanguin H-6; frunze de ceai (*Camellia sinensis*) – sursă de taninuri hidrolizabile.

Obținerea acidului elagic din deșeuri vegetale reprezintă o metodă ecologică și economică. Cel mai des se folosesc deșeuri bogate în elagitanine, precum: coji și semințe de rodie, coajă de nucă și lemn de stejar, frunze și coajă de castan dulce, resturi de fructe de mure, zmeură și căpșuni. Aceste deșeuri conțin elagitanine (cum ar fi punicalagin, castalagin, vescalagin) care pot fi hidrolizate pentru a obține acidul elagic. La etapa inițială are loc extracția elagitaninelor, care se poate face folosind metode convenționale sau tehnologii avansate: macerare cu solvenți (etanol 50–70%, apă, acetonă), extracție asistată de ultrasunete, extracție asistată de microunde, hidrodistilare cu abur (în special pentru scoarța arborilor).

Elagitaninele extrase se supun hidrolizei prin două metode principale:

a) hidroliză acidă – se utilizează HCl 1-2 M la temperaturi de 80-100ºC timp de câteva ore. Această metodă este eficientă, dar poate degrada produsul;
b) hidroliză enzimatică cu taninaze și esteraze produse de unele microorganisme. Mecanismul biochimic de obținere a acidului elagic prin hidroliza punicalaginei este prezentat în figura 12.3.

La etapa inițială are loc hidroliza enzimatică sau fermentativă a punicalaginei. Taninazele catalizează scindarea legăturilor esterice dintre unitățile HHDP și nucleul glucozidic, eliberând acidul hexahidroxidifenic (acidul HHDP) și punicalină. Reacția are loc în prezența apei, fiind catalizată de enzime microbiene din *Aspergillus niger, Penicillium spp., Bacillus subtilis, Streptomyces spp*.

În etapa următoare acidul HHDP fiind instabil suferă mai multe rearanjări oxidative spontane în soluție apoasă. În condiții acide sau prin acțiunea enzimelor lactonaze, HHDP ciclizează cu formarea acidului elagic.

Valorificarea reziduurilor agroindustriale are un șir de avantaje: reduce cantitatea deșeurilor, materia primă este abundentă și ieftină, prin optimizarea metodelor se obțin randamente ridicate.

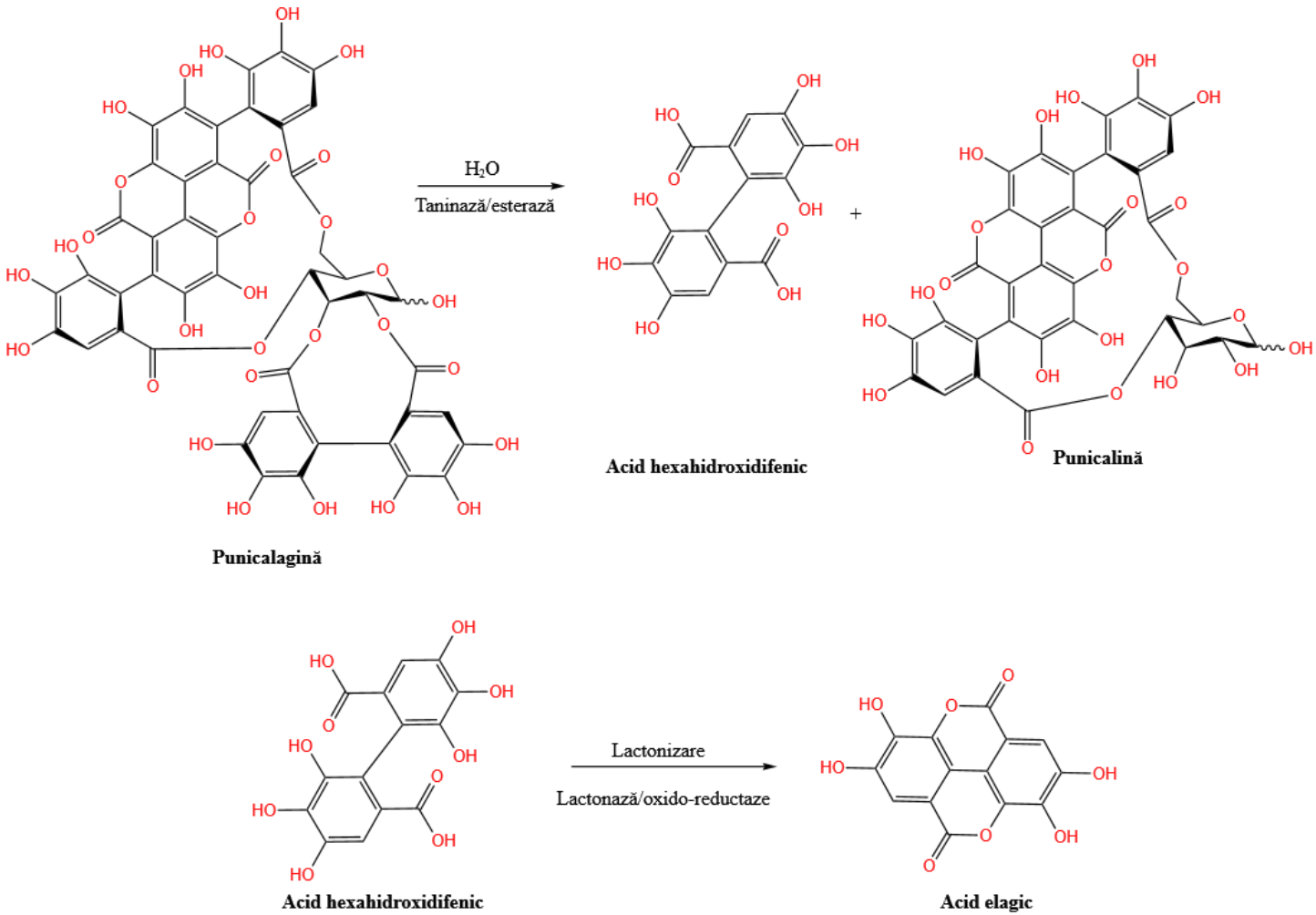


Figura 12.3. Mecanismul de biosinteză a acidului elagic prin hidroliza punicalaginei

Biosinteza acidului galic

Acidul galic (acidul 3,4,5-trihidroxibenzoic) este un compus fenolic cu aplicații în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară datorită proprietăților sale antioxidante și antimicrobiene. Acesta poate fi obținut prin metode biotehnologice folosind microorganisme care transformă substraturi naturale în acid galic prin procese enzimatice.

Acidul galic poate fi produs direct din glucoză prin inginerie metabolică, urmând calea shikimatului, în care precursorii aromatici sunt convertiți în acid galic. Pentru obținerea acidului galic pe această cale sunt folosite microorganisme modificate genetic, precum *Escherichia coli* (tulpini optimizate), *Corynebacterium glutamicum, Pseudomonas putida* etc. (Fig. A.12.2).

O altă metodă de biosinteză a acidului galic este bioconversia taninurilor hidrolizabile utilizând enzime specifice numite taninaze. Aceste enzime catalizează hidroliza legăturilor esterice din taninuri, eliberând acidul galic și glucoza. Taninurile hidrolizabile sunt polimeri naturali compuși din unități de acid galic sau acid elagic legate de un ciclu glucidic (în special glucoză) prin legături glicozidice. Surse bogate în taninuri hidrolizabile sunt extractele din scoarța de stejar, oțetar, ceai verde, castan, rodie, struguri etc. Taninazele sunt poduse de diverse fungii și bacterii, precum: *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Penicillium chrysogenum, Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum, Pseudomonas putida* etc. Ecuația reacției de biosinteză a acidului galic este prezentată în figura 12.4.

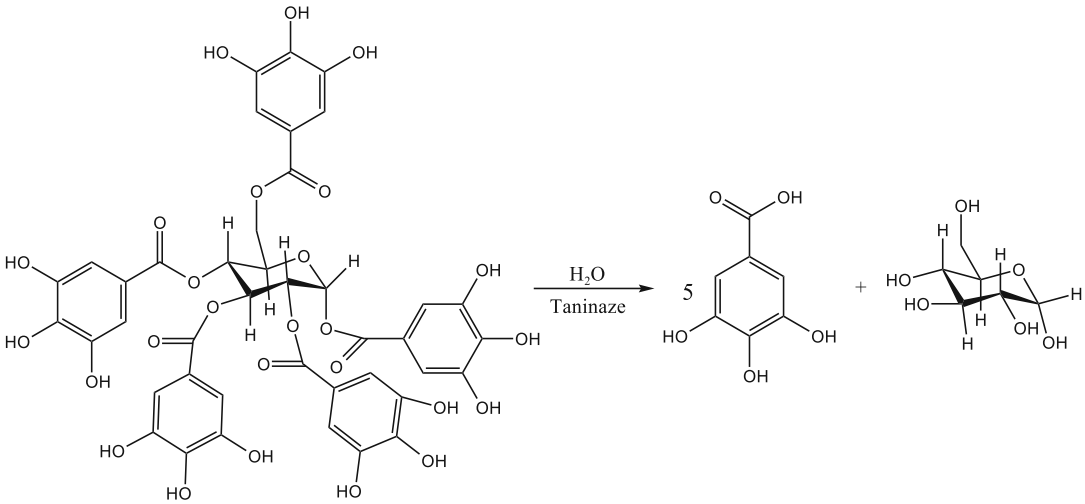


Figura 12.4. Ecuația reacției de biosinteză a acidului galic prin hidroliza enzimatică a 1,2,3,4,6-galoilglucozei în prezența taninazelor

Biosinteza acidului ferulic

Acidul ferulic face parte din grupul acizilor fenolici, o subfamilie a clasei polifenolilor. Acizii fenolici pot fi clasificați în acizi hidroxibenzoici, conținutul cărora este redus în plante, și acizi hidroxicinamici, care sunt mult mai frecvenți și abundenți în fructe, legume și cereale, precum și în băuturi, cum ar fi cafeaua și vinul. Acidul ferulic este prezent în fructe (afine, struguri), legume (ardei roșu, spanac, castraveți, sfeclă roșie, roșii, morcovi) și, în special, în tărâțele de cereale. Acesta este frecvent asociat cu mono- și dizaharide, glicoproteine, polizaharide din peretele celular al plantei, carbohidrați insolubili și lignină, având un rol important în menținerea structurii plantei. Forma *trans*- și esterii acidului ferulic pot reticula peretele celular, contribuind astfel la rigiditatea acestuia. În plus, acidul ferulic este esențial în sinteza altor metaboliți secundari.

Acidul ferulic are proprietăți antiinflamatoare, antimicrobiene și antioxidante, fiind utilizat în farmaceutică, cosmetică și în industria alimentară. Biosinteza acidului ferulic este realizată de diverse microorganisme, inclusiv bacterii, fungi și drojdii fie prin fermentare naturală, fie prin inginerie metabolică. De exemplu, *Bacillus subtilis* modificat prin inginerie genetică se folosește în biosinteza acidului ferulic din precursori fenolici; *Corynebacterium glutamicum* modificat prin inginerie metabolică se folosește pentru conversia acidului cafeic în acid ferulic; *Escherichia coli* (tulpini modificate genetic) – una dintre cele mai eficiente platforme biotehnologice pentru producția de acid ferulic prin exprimarea enzimelor specifice căii fenilpropanoide; alte microorganisme folosite în biosinteza acidului ferulic sunt: *Aspergillus oryzae, Rhizopus oryzae, Aspergillus niger* etc.

Biosinteza acidului ferulic are loc în plante și microorganisme prin intermediul căii metabolice a acizilor hidroxicinamici (Fig. 12.5). Biosinteza acidului ferulic începe cu metabolizarea glucozei în acidul 4-hidroxifenilpiruvic printr-o serie de reacții care sunt parte din calea shikimatului. Acidul 4-hidroxifenilpiruvic este precursor în biosinteza *L*-Tyr sau *L*-Phe. Bioconversia acidului 4-hidroxifenilpiruvic în *L*-Tyr este o reacție esențială în metabolismul aminoacizilor aromatici, catalizată de enzima tirozin-aminotransferază (TAT). Ca rezultat are loc transferul grupării amino (-NH_2) de la glutamat la acidul 4-hidroxifenilpiruvic, ceea ce duce la formarea *L*-tirozinei, iar glutamatul este convertit în α-cetoglutarat. În etapa următoare tirozin-aminoliaza (TAL) catalizează eliminarea grupării amino din *L*-tirozină, formând acidul *p*-cumaric. Ulterior acidul *p*-cumaric este hidroxilat generând astfel acidul cafeic.

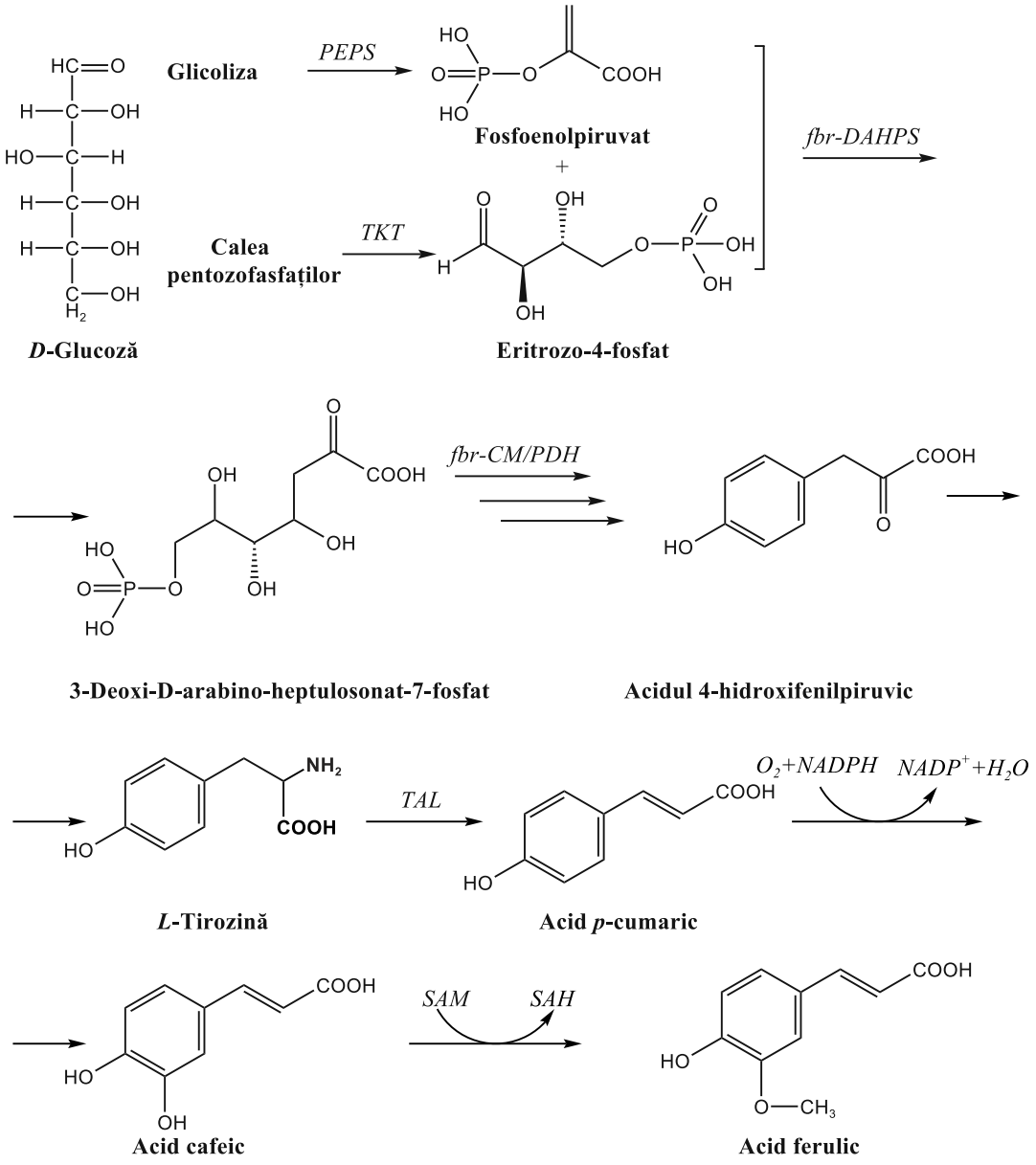


Figura 12.5. Mecanismul de biosinteză a acidului ferulic pe calea shikimatului

TyrR – proteină reglatoare; PEPS – fosfoenolpiruvat sintetază; TKT – transketolază; fbr-DAHPS – fbr-3-deoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat sintază; fbr-CM/PDH – fbr-chorismat mutază/prefenat dehidrogenază; TAT – Tirozin-aminotransferază; TAL – tirozin amoniac-liază; NADPH – Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat, forma redusă; $NADP^+$ – Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat, forma oxidată; C_3H – p-Cumarat 3-hidroxilază; COMT – Cafeat O-metiltransferază; SAM – S-adenozilmetionină; SAH – S-adenozilhomocisteină.

Această reacție este catalizată de enzima *p*-cumarat 3-hidroxilază (C3H), o monooxigenază dependentă de citocrom P450, care catalizează adăugarea grupării hidroxil în poziția 3 a inelului aromatic. Electronii necesari pentru desfășurarea reacției sunt asigurați de NADPH care ca rezultat se regenerează până la $NADP^+$. În ultima etapă cafeat O-metiltransferaza (COMT) transferă o grupare metil din *S*-adenozil metionină (SAM), care servește donor de metil la gruparea hidroxil din poziția 3 a acidului cafeic, formând acid ferulic. Astfel, SAM trece în *S*-adenozil homocisteină (SAH), care poate fi reciclată în ciclul metilării.

Biosinteza resveratrolului

Resveratrolul este un antioxidant natural aparținând clasei stilbenilor, care funcționează ca fitoalexină produsă de plante ca răspuns la stresul abiotic și biotic. Acesta este sintetizat pentru a spori rezistența plantelor la infecțiile cauzate de agenți patogeni și este considerat unul dintre principalii compuși bioactivi implicați în mecanismele de apărare vegetală. Resveratrolul este un polifenol cu greutate moleculară mică, prezent în concentrații ridicate în struguri, în special în frunze și coji, unde se acumulează pentru a proteja planta împotriva stresului biotic și abiotic, inclusiv invaziilor fungice, expunerii la substanțe chimice și radiațiilor UV.

Extragerea resveratrolului din surse vegetale este o metodă tradițională, însă aceasta prezintă dezavantaje semnificative, precum: timp îndelungat de creștere a plantelor, costuri ridicate, conținut scăzut în plante și necesitatea de inducție prin factori abiotici și biotici pentru a stimula producția de fitoalexine. Sinteza chimică a resveratrolului este complexă, implică utilizarea de solvenți toxici și poate duce la formarea de produse secundare toxice. Prin urmare, utilizarea microorganismelor pentru biosinteza resveratrolului prin fermentare reprezintă o strategie promițătoare.

Mulți cercetători au raportat izolarea și screening-ul ciupercilor endofitice provenite din *Vitis vinifera* pentru producerea de resveratrol. Microorganisme modificate genetic, precum *Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli* și *Yarrowia lipolytica*, sunt microorganisme care ar putea maximiza producția de resveratrol prin diferite procese de fermentare. Ciupercile endofitice pot reproduce capacitatea plantelor-gazdă de a produce fitochimicale, datorită relației lor simbiotice cu acestea, oferind o alternativă sustenabilă pentru obținerea resveratrolului la scară industrială. Fermentarea microbiană utilizând *Yarrowia lipolytica* transgenică, *Escherichia coli* și *Saccharomyces cerevisiae* prezintă mai multe avantaje, inclusiv o abordare eco-prietenoasă, o rată de creștere rapidă, un mediu de cultură simplu și ieftin, ușurința de manipulare genetică și o creștere sigură și eficientă a producției de resveratrol. Cu toate acestea, ingineria

metabolică, prin inserarea unor gene specifice, implică costuri ridicate și un timp considerabil de optimizare. Alternativ, micodofitele oferă un potențial considerabil pentru biosinteza metaboliților secundari caracteristici plantelor-gazdă. Aceste micodofite au capacitatea de a produce metaboliți funcționali asemănători celor sintetizați de plantele-gazdă în simbioza lor cu ciupercile. Mai mult, ciupercile endofitice au demonstrat capacitatea de a produce cantități mari de metaboliți secundari, uneori toxici, dar prezintă o rezistență ridicată la propriile produse secundare. Producția de resveratrol de către ciuperci ar putea fi îmbunătățită în perspectivă prin stimuli induși de substanțe chimice, factori fizici și biologici. Optimizarea genetică a ciupercilor endofite poate ameliora spectrul de producere a metaboliților secundari. Progresele în genetica moleculară fungică au arătat că, în condiții de cultură de laborator, multe gene ale microorganismelor sunt neexprimate din punct de vedere fenotipic.

Descifrarea căii de biosinteză a resveratrolului și a genelor-cheie relevante în ciupercile endofitice este esențială pentru controlul eficient al producției și pentru depășirea problemelor legate de randamentul scăzut și variabil. Biosinteza resveratrolului în unele microorganisme modificate genetic, precum *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae* și *Yarrowia lipolytica,* decurge prin *biosinteza de novo*. Prin biosinteza *de novo, L*-Phe sau *L*-Tyr sunt obținute din glucoză pe calea shikimatului, descrisă anterior. În etapa următoare *L*-Phe este supusă procesului de dezaminare, reacție catalizată de fenilalanina amoniac-liaza (PAL), cu formarea acidului cinamic (Fig. 12.6). În etapa următoare acidul cinamic este hidroxilat în poziția 4 a nucleului aromatic de către cinamat 4-hidroxilaza (C4H), care utilizează ATP și coenzima A pentru a cataliza această reacție. Se formează acidul *p*-cumaric, un precursor esențial în biosinteza resveratrolului. Ulterior acidul *p*-cumaric este activat prin legarea la coenzima A (CoA), formând 4-cumaroil-CoA. Această reacție este catalizată de 4-cumarat-CoA ligaza (4CL), care adaugă CoA la acidul *p*-cumaric, pregătindu-l pentru etapele ulterioare. Acest compus este supus ulterior procesului de extindere a lanțului carbonic, prin condensarea succesivă cu 3 molecule de malonil-CoA. Acest proces este catalizat de enzima stilben sintaza. Se formează un intermediar stilbenoid (policetonă) cu un lanț carbonic mai lung. În continuare intermediarul policetonic suferă o rearanjare spațială, favorabilă pentru ciclizare. Aceasta presupune o flexibilitate conformațională a lanțului de carbon, care permite interacțiuni între grupările funcționale ale moleculei și facilitează ciclizarea în structura finală. Acest proces de rearanjare este esențial pentru ciclizarea ulterioară. După aceasta stilbensintaza catalizează ciclizarea intermediarului printr-o reacție de condensare intramoleculară, în care o grupare carbonilică din structura lanțului reacționează cu o grupare hidroxil pentru a forma

un inel aromatic. Aceasta duce la formarea unui ciclu benzenic, iar lanțul carbonic devine ciclic.

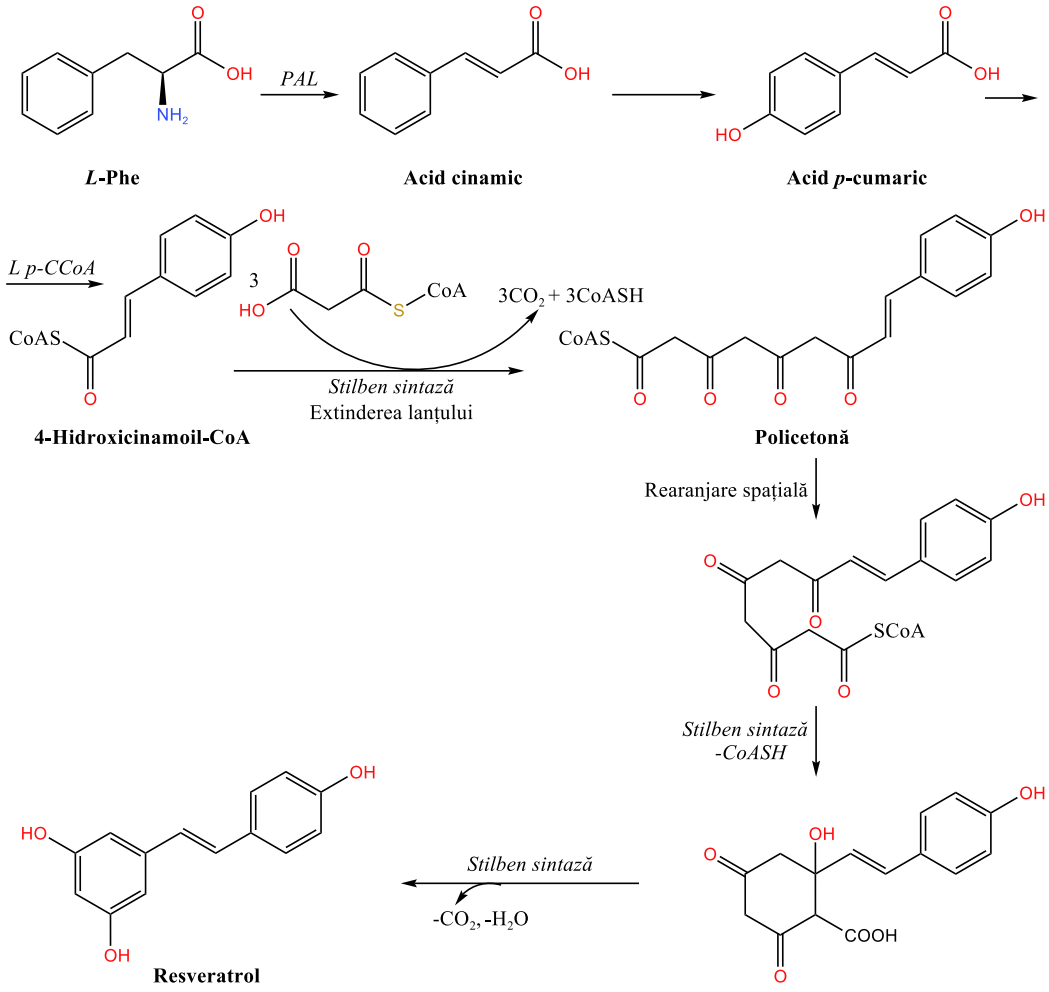


Figura 12.6. Ecuațiile reacțiilor de biosinteză a resveratrolului din *L*-Phe

În etapa finală intermediarul ciclic suferă o decarboxilare, ca rezultat se elimină o moleculă de CO_2. După decarboxilare practic concomitent urmează etapa de deshidratare cu formarea resveratrolului.

12.3. Biotehnologia acidului elagic: materii prime, etape de prefermentare, fermentare, izolare și purificare

Acidul elagic este un metabolit secundar care a generat un interes semnificativ în ultimii ani datorită beneficiilor biomedicale ale acestuia. Acesta este prezent în diverse fructe, precum căpșuni, afine, mure, nuci și rodii.

Acidul elagic se obține din elagitanine atunci când grupa acidului hexahidroxidifenic (HHDP) este eliberată prin hidroliză chimică sau enzimatică. În

acest proces, legătura esterică dintre glucoză și HHDP este scindată, iar HHDP suferă o rearanjare moleculară, formând acidul elagic. Hidroliza chimică utilizată pentru obținerea acidului elagic implică metode foarte poluante, din cauza substanțelor acide utilizate. În plus, costurile de producție sunt ridicate, iar randamentul produsului este redus. Din aceste motive, numeroase studii se fac pentru a obține acidul elagic printr-un proces biotehnologic.

Producerea biotehnologică a acidului elagic prin fermentare cu *Aspergillus niger*, din coaja și semințele rodiilor (*Punica granatum*), reprezintă o alternativă ecologică și sustenabilă față de metodele chimice tradiționale, care sunt costisitoare și poluante. Pentru convertirea elagitaninelor din coaja de rodie în acid elagic, sunt selectate cele mai performante tulpini de *Aspergillus niger* utilizând cultura solidă.

În etapa inițială are loc pregătirea substratului. Deșeurile de rodie (coaja și semințele) sunt colectate și spălate pentru a îndepărta impuritățile. Materialul spălat este uscat la 50–60ºC pentru a preveni degradarea polifenolilor. După uscare, coaja este măcinată fin pentru a obține o pulbere cu particule omogene. Această pulbere de coajă de rodie este utilizată ca sursă de carbon și elagitanine în procesul de fermentare.

În următoarea etapă are loc pregătirea inoculului (sporilor fungici). Pentru aceasta se cultivă inițial *A. niger* pe medii solide. Cel mai des se utilizează agar dextroză de cartofi, care favorizează creșterea rapidă a fungilor și formarea sporilor. Mediul solid este autoclavat (121ºC, 15 min) și inoculat cu *A. niger* (**(9)**, Fig. 12.7) într-o hotă cu flux laminar pentru a preveni contaminarea. Incubarea se face în incubatorul **(10)** la temperatura de 28-30ºC timp de 5-7 zile, până la formarea unui strat negru de spori maturi. Sporii maturi sunt eliberați prin spălare cu o soluție sterilă de Tween 80 (0,1%), pentru a reduce agregarea lor. Suspensia sporilor este omogenizată și se determină concentrația prin hemocitometru, densitatea inoculului fiind ajustată la 10^6-10^7 spori/mL. Inoculul obținut este păstrat la 4ºC până la utilizare.

După pregătirea substratului și a sporilor maturi de *Aspergillus niger* se pregătește mediul nutritiv pentru procesul de fermentare (Tab. 12.1), în vasul pentru pregătirea mediului de fermentare **(1)** (Fig. 12.7).

Tabelul 12.1. Compoziția mediului nutritiv pentru bioconversia elagitaninelor în acid elagic în prezența *Aspergillus niger*

Componenți	Concentrația optimă, g/L	Rolul în fermentare
extract apos de coji și semințe de rodie măcinate	10,00 – 50,00	sursă de elagitanine (de ex., punicalagina, precursor al acidului elagic)
glucoză/zaharoză	5,00 – 20,00	sursă de energie pentru creșterea inițială a fungului
sulfat de amoniu ($(NH_4)_2SO_4$)	2,00 – 5,00	sursă de azot anorganic esențial pentru sinteza enzimelor
extract de drojdie	2,00 – 5,00	sursă de vitamine, aminoacizi și oligoelemente
peptone	3,00 – 7,00	sursă de azot organic
KH_2PO_4	1,00 – 3,00	sursă de fosfor și tampon
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50 – 1,00	cofactor enzimatic
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 – 0,05	cofactor enzimatic
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 – 0,05	cofactor enzimatic
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 – 0,02	cofactor enzimatic
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,005 – 0,01	cofactor enzimatic
acid citric	0,50 – 2,00	stabilizator pH
pectină	0,10 – 0,50	stimulează producerea de enzime pectinolice pentru degradarea substratului
celuloză (opțional)	0,10 – 0,50	activează sinteza celulazelor pentru eliberarea polifenolilor

Extractul apos din pulberea de rodie este pregătit în rezervorul **(2)**, de unde cu ajutorul dozatorului **(3)** este trecut în omogenizatorul **(5)**, unde se amestecă cu celelalte componente ale mediului de fermentare (Tab. 12.1). Mediul de fermentare din vasul **(1)** este sterilizat prin coloanele de sterilizare **(7)**, prin sterilizare continuă cu temperaturi între 121 și 130ºC timp de 20-30 de minute, pentru a evita degradarea componentelor sensibile. Coloanele de sterilizare sunt echipate cu schimbător de căldură, pentru menținerea temperaturii constante și cu o cameră de răcire, pentru a răci mediul sterilizat la temperatura de 50-60ºC. Mediul steril este pompat în fermentatorul **(11)**, unde se dozează și inoculul cu densitatea de 10^6-10^7 spori/mL. Procesul de fermentare decurge în fermentatorul **(11)**, în care sunt menținți parametrii de fermentare optimi: pH 5,5-6,5, temperatura de 28-32ºC, aerarea 1vvm (volum de aer/volum de mediu/minut) pentru a susține metabolismul aerob al fungului, viteza de agitare 100-150 rpm pentru asigurarea dispersiei oxigenului în tot volumul biomasei. Procesul de fermentare durează aproximativ 7 zile, timp în care fungul produce enzime tanazice și elagitanaze, care descompun elagitaninele în acid elagic. Pe parcursul fermentării, acidul elagic începe să precipite datorită solubilității sale reduse în apă. La finalul procesului, mediul

fermentat conține acid elagic sub formă liberă și în complex cu proteine sau polizaharide. Procesul de fermentare se consideră finalizat atunci când pH-ul mediului este stabil timp de 12-24 de ore, în timpul fermentării pH-ul mediului scade până la 3,5-4,5 datorită formării acizilor organici secundari. La fel se poate monitoriza conținutul de elagitanine din mediu (precursorii acidului elagic). Fermentarea se poate opri când acestea sunt aproape complet consumate. Determinarea conținutului total de polifenoli se face prin metoda *Folin-Ciocalteu*. Ca rezultat se obține până la 10-20 g/L de acid elagic.

După finalizarea procesului de fermentare, lichidul conține atât acid elagic dizolvat, cât și biomasă fungică (miceliu de *Aspergillus niger*). Aceasta este pompată pentru filtrare pe filtre rotative de tip tambur. Lichidul trece printr-o membrană poroasă a tamburului, iar biomasa solidă este captată pe suprafața tamburului. Biomasa reținută este apoi îndepărtată de pe tambur (de obicei prin spălare sau prin aplicarea unui jet de apă). Biomasa (miceliul și resturile de rodie) colectată pe tambur poate fi folosită pentru alte procese, cum ar fi producerea de compost, biogaz sau chiar utilizarea în alte aplicații industriale. Lichidul filtrat, care conține acidul elagic, este colectat în partea inferioară și este pompat în rezervorul pentru soluții filtrate. De unde se pompează în extractorul **(14)** pentru extracția acidului elagic. Solventul (acetat de etil sau etanol 80%) este dozat din dozatorul **(13)** în raport de 1:1 sau 1:2 față de volumul soluției de fermentare. Soluția de fermentare se amestecă bine cu solventul în extractorul echipat cu aparat de amestecare magnetică, pentru a asigura o extracție uniformă. Procesul de extracție durează 2–4 ore la temperatura 30–40ºC, pentru a îmbunătăți eficiența extracției. După extracție, soluția se pompează în decantorul **(15)** și se lasă să se separe în două faze. Faza organică (superioară), care conține acidul elagic dizolvat în solventul organic (acetat de etil sau etanol), se colectează în rezervorul **(16)**, iar faza apoasă (inferioară), care conține restul compușilor hidrosolubili, se colectează în rezervorul **(17)**. În unele cazuri poate fi necesar să se adauge apă pentru a facilita separarea fazelor. La etapa următoare solventul se evaporă. În acest sens, soluția de extracție este supusă unui vid controlat (utilizând o pompă de vid **(18)**), ceea ce scade punctul de fierbere al acetatului de etil. Acest lucru permite ca solventul să se evapore la o temperatură mai mică decât la presiune atmosferică, protejând astfel acidul elagic de descompunere.

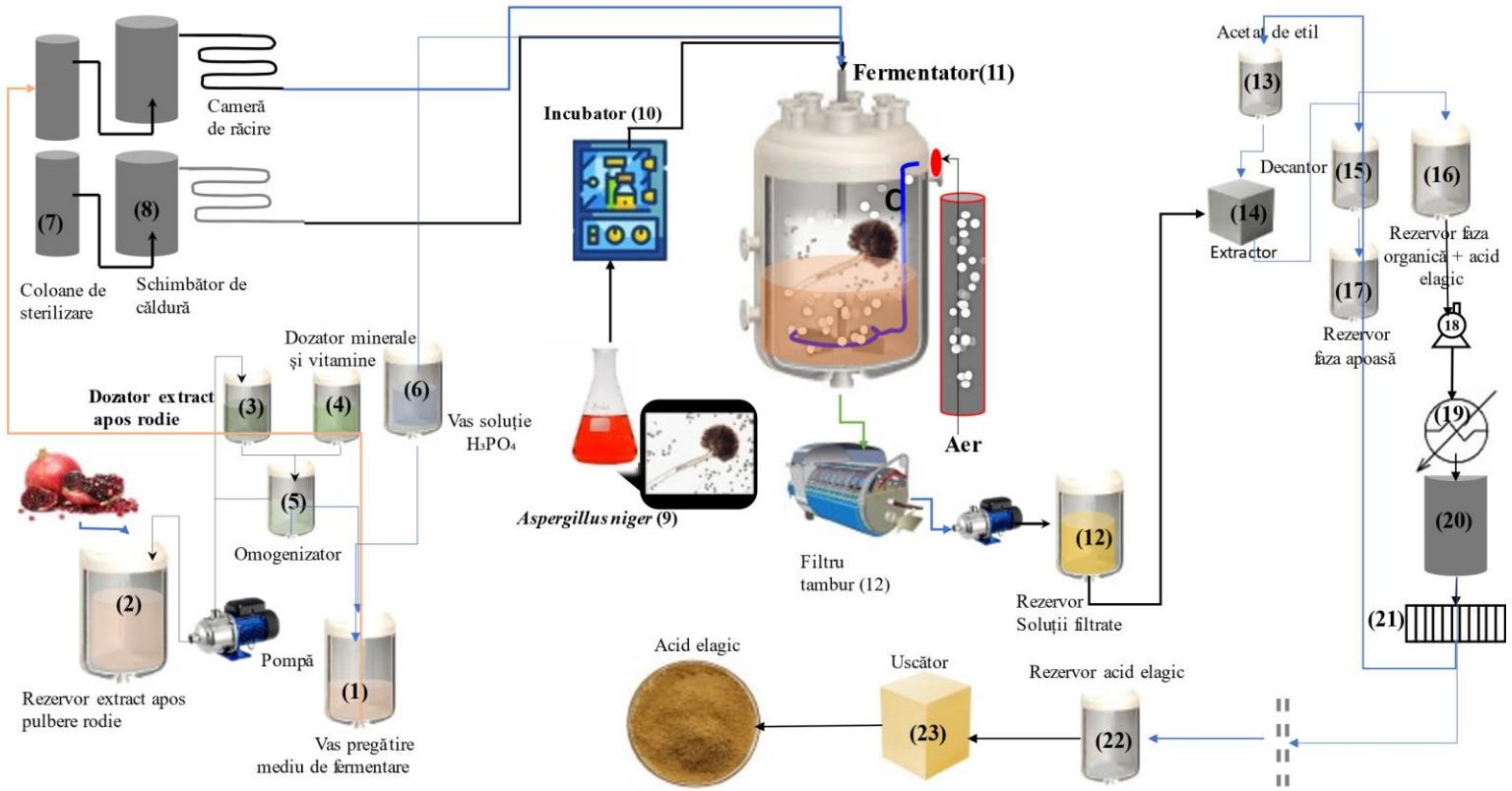


Figura 12.7. Etapele de producere a acidului elagic prin bioconversia elagitaninelor în prezența *Aspergillus niger*

Soluția este încălzită uniform printr-un schimbător de căldură indirect **(19)** (adică, folosirea unei surse de căldură care nu intră direct în contact cu soluția, evitând contaminarea și supraîncălzirea) și se menține la temperatura de 30 - 40ºC. Soluția încălzită intră în evaporatorul **(20)**, unde acetatul de etil se evaporă. Vaporii de solvent se deplasează printr-un condensator **(21)**, unde sunt răciți cu ajutorul unui sistem de circuit de apă rece sau gheață.

Acetatul de etil condensat este recuperat în rezervorul **(13)** pentru a fi reutilizat în următoarele etape de extracție, reducând astfel costurile și impactul asupra mediului. După evaporarea acetatului de etil, acidul elagic rămâne sub formă de pastă concentrată în rezervorul de evaporare. Faza apoasă și alți compuși solubili sunt îndepărtați prin filtrare, iar concentratul de acid elagic este obținut în rezervorul **(22)**. Concentratul de acid elagic este supus procesului de uscare în uscătorul cu vid **(23)**, la temperatura de 40-50ºC. Randamentul de recuperare a acidului elagic prin această metodă este de până la 90%, iar puritatea lui – 85-95%.

Dacă este necesar, acidul elagic este supus în continuare procesului de purificare prin recristalizare. La etapa inițială se alege solventul care trebuie să dizolve bine acidul elagic la temperaturi ridicate, dar să-l solubilizeze foarte puțin la temperaturi scăzute. Pentru recristalizarea acidului elagic în calitate de solvent pot fi folosiți: etanol, metanol, acetonă, amestecuri etanol-apă sau metanol-apă etc. Ulterior într-un reactor cu solventul selectat se adaugă acidul elagic. Sistemul este încălzit treptat la o temperatură apropiată de punctul de fierbere a solventului, amestecând continuu pentru a facilita dizolvarea completă. Dacă rămân impurități insolubile, soluția se filtrează la cald pentru a le îndepărta. După dizolvarea completă, soluția este lăsată să se răcească lent la temperatura camerei. Răcirea trebuie să fie controlată pentru a permite formarea cristalelor mari. Pentru o cristalizare mai eficientă, soluția se răcește lent, apoi poate fi plasată în baie de gheață. Cristalele formate sunt separate prin filtrare cu vid. Se spală ușor cu un volum mic de solvent rece pentru a elimina impuritățile rămase. Cristalele spălate sunt uscate în etuvă cu vid la 40-50ºC. La necesitate, recristalizarea se repetă. Ca rezultat se obțin cristale fine de acid elagic cu o puritate de 98-99%.

Producerea acidului elagic prin biotehnologie utilizând resturi de rodie sau alte deșeuri agroindustriale este o metodă sustenabilă și eficientă, având multiple beneficii economice, ecologice și tehnologice. Resturile de rodie (coji, membrane interne, semințe) și alte deșeuri agroindustriale (sâmburi de struguri, coji de nuci, frunze de ceai, coji de castane) sunt bogate în elagitanine, precursori ai acidului elagic. Deșeurile agroindustriale sunt adesea aruncate sau utilizate ineficient. Valorificarea lor pentru producerea acidului elagic reduce impactul asupra mediului. Această metodă transformă un deșeu cu valoare mică într-un produs

valoros, promovând utilizarea completă a resurselor naturale. Metodele chimice utilizează solvenți organici periculoși (metanol, acetonă, hexan), care pot lăsa reziduuri toxice în produsul final. Fermentarea biotehnologică elimină această problemă. Totodată, obținerea produselor biologic active de interes prin procese bio consumă mai puțină energie decât metodele convenționale de extracție, reducând emisiile de CO_2. Procesele chimice agresive pot afecta structura acidului elagic, reducând activitatea biologică a acestuia. În schimb, fermentarea permite conversia naturală a elagitaninurilor, menținând stabilitatea moleculei. Mai mult ca atât, deșeurile agroindustriale sunt disponibile în cantități mari și la costuri reduse, iar fermentarea enzimatică optimizează conversia elagitaninurilor în acid elagic, obținând randamente înalte. La fel, fermentarea necesită mai puține etape de purificare, ceea ce scade cheltuielile operaționale, iar acidul elagic obținut poate atinge o puritate de 95-99%, fără reziduuri de solvenți toxici. Fermentarea în bioreactoare permite monitorizarea precisă a parametrilor (pH, temperatură, oxigen dizolvat) pentru o conversie optimă. Există posibilitatea de optimizare enzimatică a procesului prin selectarea unei tulpini microbiene (ex., *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*) care produce enzime specifice, îmbunătățind randamentul conversiei. Acidul elagic obținut prin proces biotehnologic poate fi certificat organic, deoarece nu implică solvenți sintetici sau substanțe chimice toxice. Poate fi utilizat în cosmetică (antioxidant, antiîmbătrânire), farmaceutică (antiinflamator, anticancerigen), suplimente alimentare etc.

Întrebări pentru autoevaluare

1. Clasificați și relatați despre compușii de interes cosmetic din clasa polifenolilor, terpenelor și a carotenoidelor.
2. Prezentați și explicați mecanismele de biosinteză a acidului elagic.
3. Prezentați și explicați mecanismele de biosinteză a acidului galic.
4. Prezentați și explicați mecanismele de biosinteză a resveratrolului.
5. Descrieți materiile prime și compoziția mediului nutritiv la obținerea acidului elagic prin biotehnologie.
6. Elaborați schema tehnologică și descrieți principalele etape în procesul de producere biotehnologică a acidului elagic.
7. Propuneți metode de izolare și purificare a acidului elagic din mediul de fermentare.
8. Propuneți metode de purificare avansată a acidului elagic obținut prin procese biotehnologice.
9. Argumentați avantajele proceselor biotehnologice față de extracția tradițională a diferitor polifenoli, terpene și carotenoide.

10. Propuneți metode de optimizare a proceselor de producere biotehnologică a diferitor polifenoli, terpene și carotenoide.

BIBLIOGRAFIE

1. GRONQUIST, M., SCHROEDER, F.C. Insect Natural Products. In: *Comprehensive Natural Products II*, 2010, pp. 67–108. https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00035-6.
2. HAGE-HÜLSMANN, J., KLAUS, O., LINKE, K., TROOST, K., GORA, L., HILGERS, DREPPER, T. Production of C_{20}, C_{30} and C_{40} terpenes in the engineered phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. In: *Journal of Biotechnology*, 2021, 338, pp. 20–30. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.002.
3. SIDDIQUI, T., KHAN, M.U., SHARMA, V., GUPTA, K. Terpenoids in essential oils: Chemistry, classification, and potential impact on human health and industry. In: *Phytomedicine Plus*, 2024, 4(2). https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100549.
4. YU, JEONG, H., YANG, K.Y., CHO, J.Y., HONG, I.K., NAM, S.H. Synthesis of ellagic acid glucoside using glucansucrase from *Leuconostoc* and characterization of this glucoside as a functional neuroprotective agent. In: *AMB Expr*., 2021, 11(12), 108. https://doi.org/10.1186/s13568-021-01265-x.
5. AGUILERA-CARBO, A., AUGUR, C., PRADO-BARRAGAN, L.A., FAVELA-TORRES, E., AGUILAR, C.N. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 78(2), pp. 189–199. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2.
6. HUANG, W., NIU, H., LI, Z., LIN, W., GONG, G., WANG, W. Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulase on ellagic acid production from cups extract of valonia acorns. In: *Process Biochemistry*, 2007, 42(9), pp. 1291–1295. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.06.013.
7. GULSUNOGLU-KONUSKAN, Z., KARBANCIOGLU-GULER, F., KILIC-AKYILMAZ, M. Development of a bioprocess for production of ellagic acid from chestnut (*Castanea sativa Mill*.) waste by fermentation with *Aspergillus* spp. In: *Food Bioscience*, 2021, 42, 101058. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101058.
8. CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.L. et al. Microbial Production of Ellagic Acid. In: Jafari, S.M., Harzevili, F.D. (eds) Microbial Production of Food Bioactive Compounds. In: *Springer, Cham*., 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-030-81403-8_4-1.
9. BRÜCK, W.M., ERISMANN, Y., ANDLAUER, W. Fermentative Liberation and Transformation of Bioactive Compounds: Ellagic Acid from Nut Press Cake Ellagitannins. In: *Applied Sciences*, 2024, 14(3), 1141. https://doi.org/10.3390/app14031141.
10. WERNER, R.A., ROSSMANN, A., SCHWARZ, C., BACHER, A., SCHMIDT, H.L., EISENREICH, W. Biosynthesis of gallic acid in *Rhus typhina*:

discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance. In: *Phytochemistry*, 2004, 65(20), pp. 2809–2813. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.020.

11. KUMAR, K., DEBNATH, P., SINGH, S., KUMAR, N. An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. In: *Stresses*, 2023, 3(3), pp. 570-585. https://doi.org/10.3390/stresses3030040.
12. CABEZUDO, I., GALETTO, C.S., ROMANINI, D. et al. Production of gallic acid and relevant enzymes by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation of soybean hull and grape pomace. In: *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023, 13, pp. 14939–14947. https://doi.org/10.1007/s13399-022-03435-8.
13. GOVINDARAJAN, R.K., REVATHI, S., RAMESHKUMAR, N., KRISHNAN, M., KAYALVIZHI, N. Microbial tannase: Current perspectives and biotechnological advances. In: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 6, pp. 168–175. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.03.011.
14. THAPA, S.B., PANDEY, R.P., PARK, Y.I., SOHNG, J.K. Biotechnological Advances in Resveratrol Production and its Chemical Diversity. In: *Molecules*, 2019, 24(14), 2571. https://doi.org/10.3390/molecules24142571.
15. PARK, J.Y., LIM, J.H., AHN, J.H. et al. Biosynthesis of resveratrol using metabolically engineered *Escherichia coli*. In: *Applied Biological Chemistry*, 2021, 64, 20. https://doi.org/10.1186/s13765-021-00595-5.
16. ABO-KADOUM, M.A., ABOUELELA, M.E., AL MOUSA, A.A., ABO-DAHAB, N.F., MOSA, M.A., HELMY, Y.A., HASSANE, A.M. Resveratrol biosynthesis, optimization, induction, bio-transformation and bio-degradation in mycoendophytes. In: *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13, 1010332. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1010332.
17. IBRAHIM, G.G., PERERA, M., ABDULMALEK, S.A., YAN, J., YAN, Y. De Novo Synthesis of Resveratrol from Sucrose by Metabolically Engineered *Yarrowia lipolytica*. In: *Biomolecules*, 2024, 14(6), 712. https://doi.org/10.3390/biom14060712.

ANEXE

ANEXA A.1

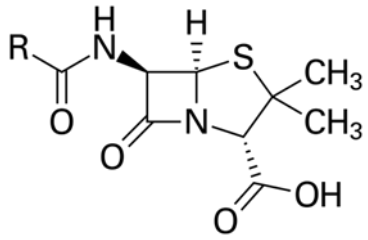
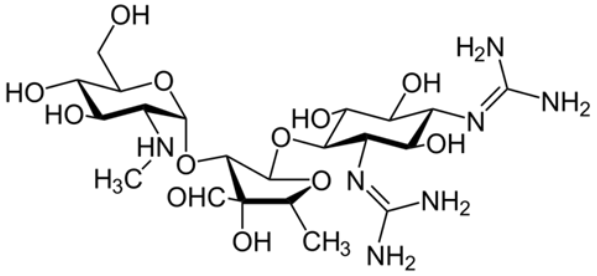
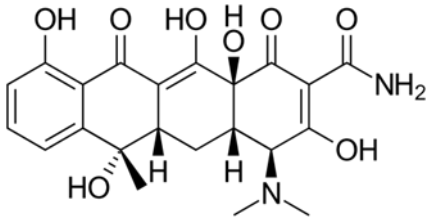
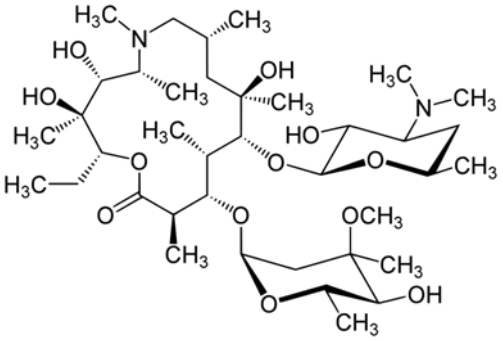
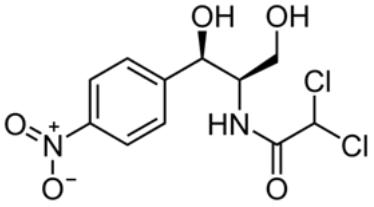
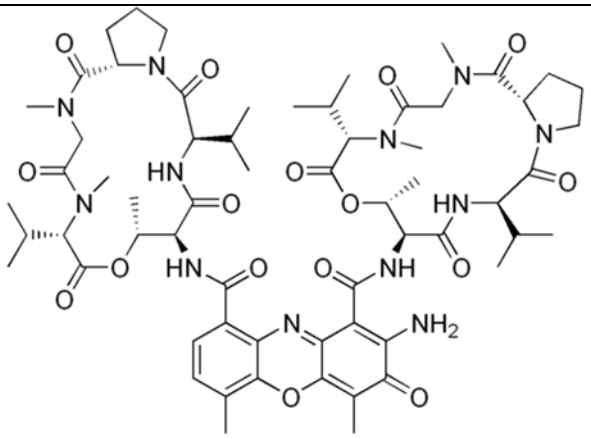
Tabelul A.1.1. Produse obținute pe cale biotehnologică (la nivel industrial)

Produse de fermentare	Tipul de organism utilizat	Producție anuală (în lume), kg/an
Solvenți organici		
Etanol (nu pentru băuturi)	*Saacharomyces cerevisiae*	$2,0 \cdot 10^{10}$
Acetonă/butanol/etanol	*Clostridium acetobutylicum*	$2,0 \cdot 10^{6}$
Biomasă		
Culturi starter și drojdii pentru industria alimentară și agricultură	Bacterii lactice sau drojdii de panificație	$5,0 \cdot 10^{8}$
Proteine monocelulare	*Pseudomonas methylotrophus sau Candida utilis*	$0,5\text{-}1,0 \cdot 10^{8}$
Acizi organici		
Acid citric	*Aspergillus niger*	$2,0\text{-}3,0 \cdot 10^{8}$
Acid gluconic	*Aspergillus niger*	$5,0 \cdot 10^{7}$
Acid lactic	*Lactobacillus delbrueckii*	$2,0 \cdot 10^{7}$
Acid itaconic	*Aspergillus terreus*	$5,0 \cdot 10^{4}$
Aminoacizi		
Acid *L*-glutamic	*Corynebacterium glutamicum*	$3,0 \cdot 10^{8}$
L-lizină	*Brevibacterium flavum*	$3,0 \cdot 10^{7}$
L-fenilalanină	*Corynebacterium glutamicum*	$2,0 \cdot 10^{6}$
L-arginină	*Brevibacterium flavum*	$2,0 \cdot 10^{6}$
Alți aminoacizi	*Corynebacterium spp.*	$1,0 \cdot 10^{6}$
Transformări microbiene		
Steroizi	*Rhizopus arrhizus*	
D-sorbitol la *L*-sorboză (în producția de vitamina C)	*Acetobacter suboxydans*	$4,0 \cdot 10^{7}$
Polizaharide extracelulare		
Xantan	*Xanthonomas campestris*	$5,0 \cdot 10^{6}$
Dextran	*Leuconostoc mesenteroides*	-
Nucleotide		
5'-guanozin monofosfat	*Brevibacterium ammoniagenes*	$1,0 \cdot 10^{5}$
Enzime		
Proteaze	*Bacillus spp.*	$6,0 \cdot 10^{5}$
α-Amilaze	*Bacillus amyloliquefaciens*	$4,0 \cdot 10^{5}$
Glucoamilaze	*Aspergillus niger*	$4,0 \cdot 10^{5}$
Glucozizomerază	*Bacillus coagulans*	$1,0 \cdot 10^{5}$
Pectinaze	*Aspergillus niger*	$1,0 \cdot 10^{4}$
Renina	*Mucor miehei sau drojdii recombinante*	$1,0 \cdot 10^{4}$

Vitamine B_{12} B_2	*Propionibacterium shermanii* *Eremothecium ashbyii*	$1,0 \cdot 10^4$ -
Alcaloizi din Ergot	*Claviceps paspali*	$5,0 \cdot 10^3$
Pigmenți *β*-carotenoide	*Blakeslea trispora*	60,0
Vaccinuri împotriva: - difteriei - tetanosului - pertussisului (tusea convulsivă) -virusului poliomielitei -rubeolei etc.	*Corynebacterium diphtheriae* *Clostridium tetani* *Bordetella pertussis* *Virusuri active atenuate cultivate in vitro*	< 50,0
Proteine terapeutice Insulina; Hormonul uman de creștere Eritropoietina; Factorul VIII-C; Interferonul-*α*2 etc.	Bacterii, drojdii sau celule mamaliene recombinante	< 20,0
Insecticide Spori bacterieni Spori de fungi	*Bacillus thuringienis* *Hirsutella Thompsonii*	
Antibiotice Peniciline Cefalosporine Tetracicline Antibiotice macrolide Antibiotice polipeptide Antibiotice aminoglicozide Antibiotice aromatice	*Penicillinum chrysogenum* *Cephalosporium acremonium* *Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces erythreus* *Bacillus brevis* *Streptomyces griseus* *Penicillium griseofulvum*	$3,0\text{-}4,0 \cdot 10^7$ $1,0 \cdot 10^7$ $1,0 \cdot 10^7$ - $2,0 \cdot 10^6$ - $1,0 \cdot 10^6$
Anticorpi monoclonali	Celule de tip *Hybridoma*	< 20,0

ANEXA A.2

Tabelul A.2.1. Structura generală a unor clase de antibiotice

Peniciline și Cefalosporine	Streptomicine
	
Tetracicline	**Macrolide**
	
Cloramfenicol	**Polipeptide**
	

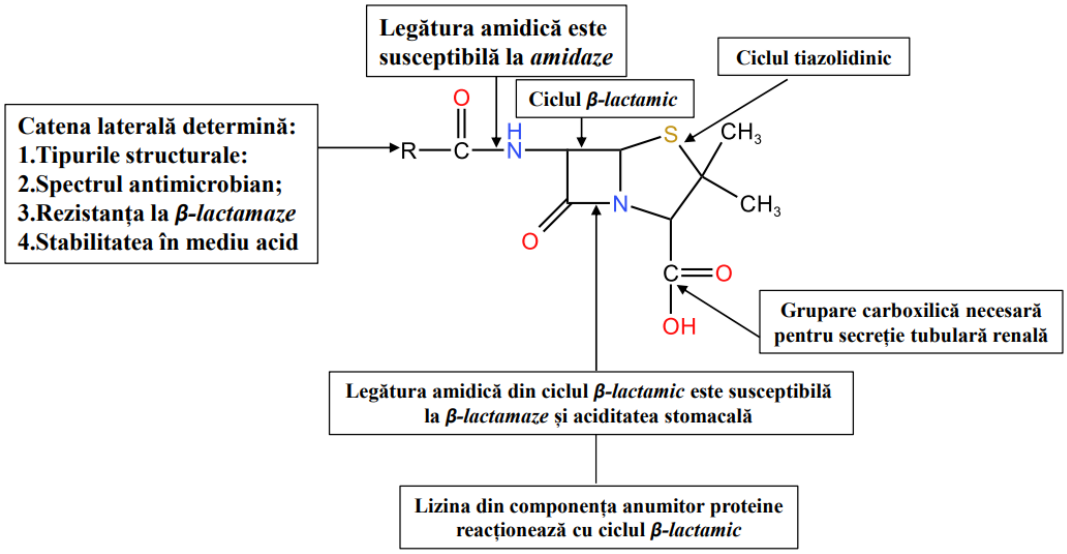


Figura A.2.1. Rolul elementelor structurale în acțiunea farmacologică a penicilinelor

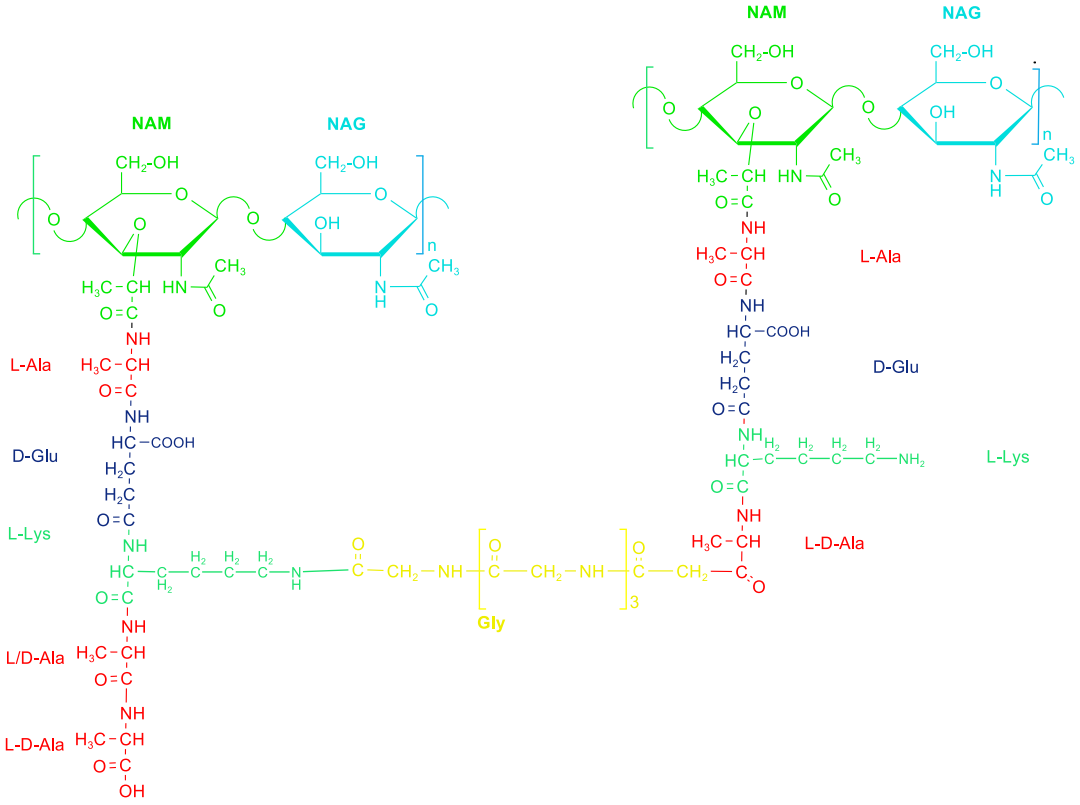
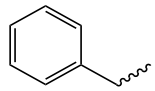
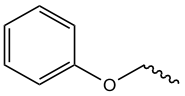
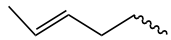
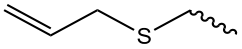
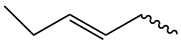
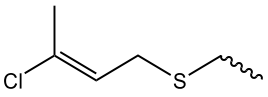
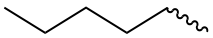
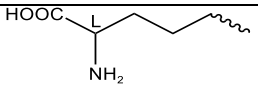
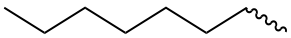
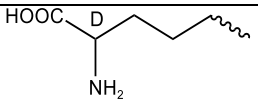
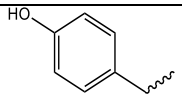
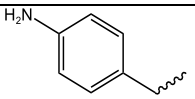


Figura A.2.2. Structura stratului peptidoglicanic

Tabelul A.2.2. Clasificarea penicilinelor naturale

Radicalul acil	Denumirea penicilinei	Radicalul acil	Denumirea penicilinei
	**Penicilina G, II**		**Penicilina V**
	**Penicilina F**		**Penicilina O**
	**Penicilina I**		**Penicilina S**
	**Penicilina D**		**Penicilina M, W**
	**Penicilina K, IV**		**Penicilina N**
	**Penicilina X, III**		**Penicilina T**

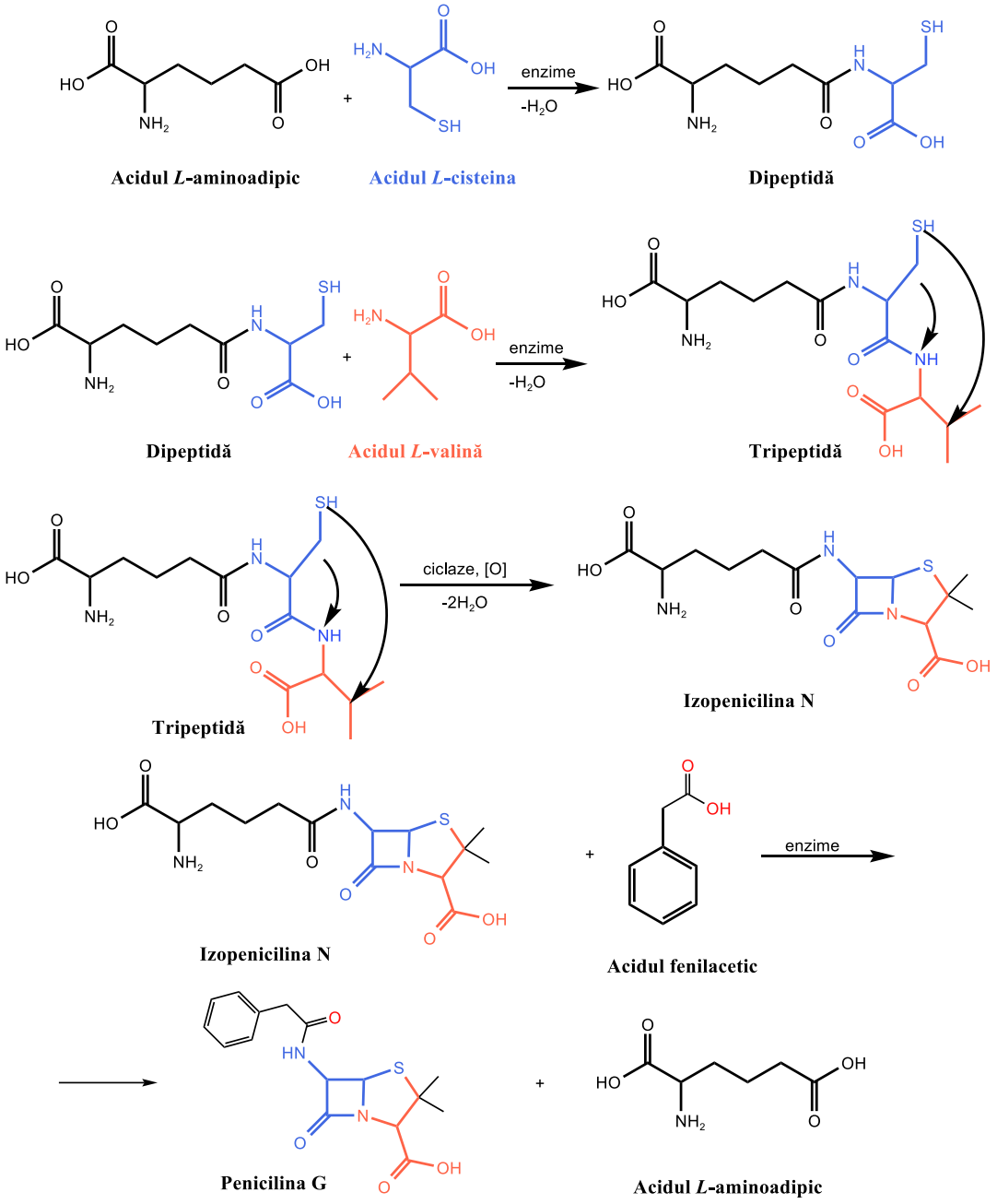


Figura A.2.3. Ecuațiile reacțiilor de biosinteză a penicilinei G

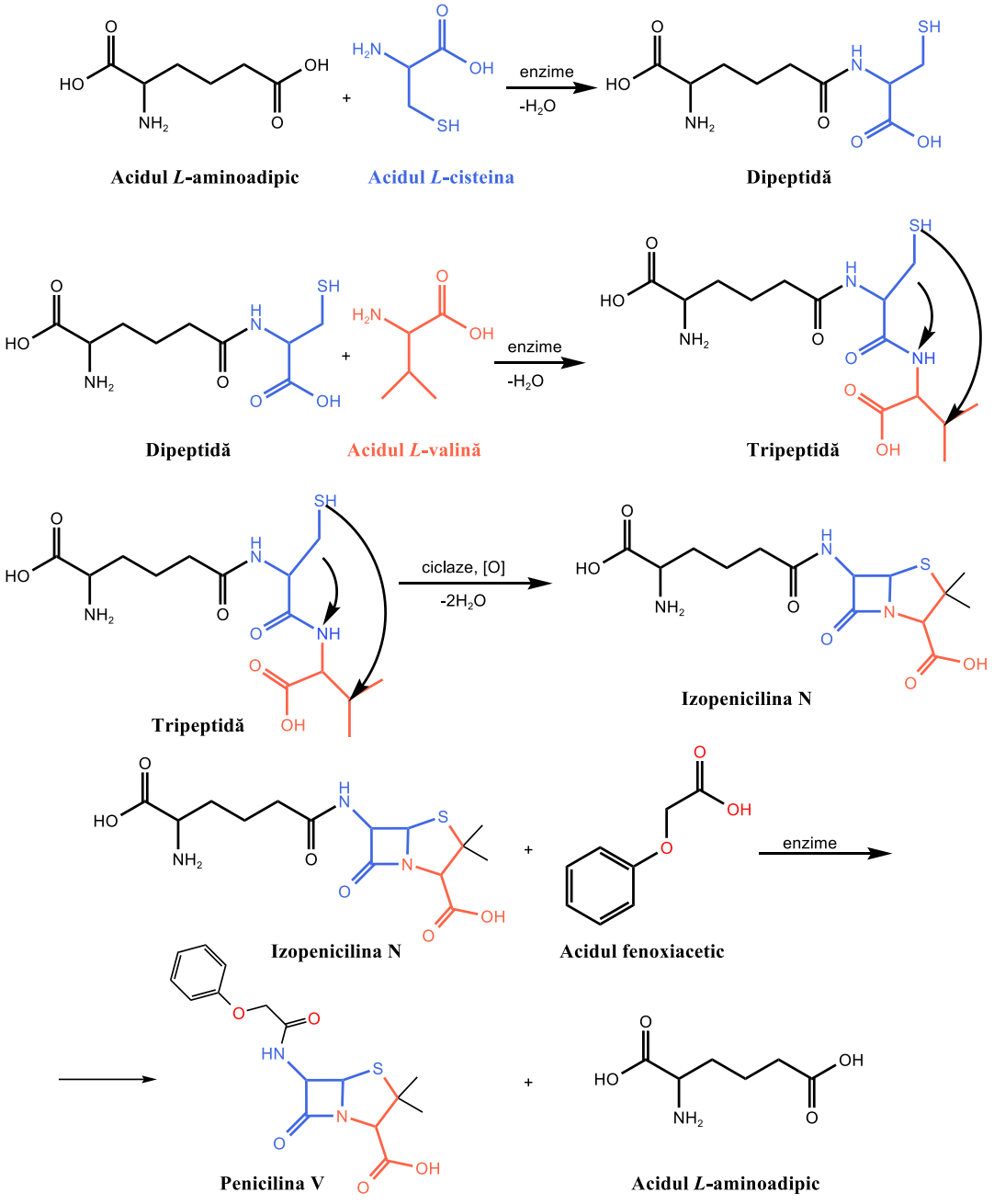


Figura A.2.4. Ecuațiile reacțiilor de biosinteză a penicilinei V

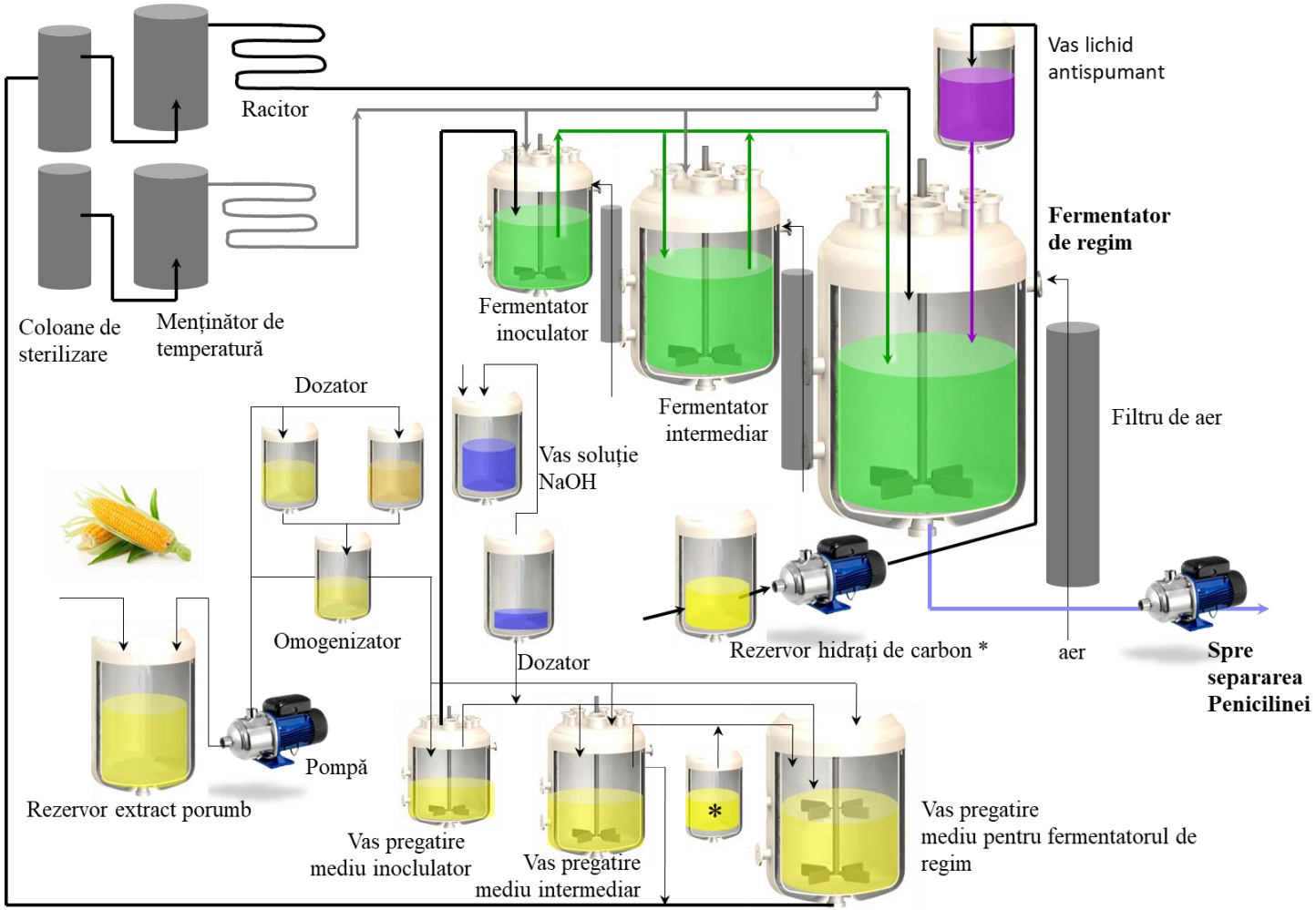


Figura A.2.5. Schema tehnologică de biosinteză a penicilinelor naturale. Etapele de pregătire și sterilizare a mediului de cultură

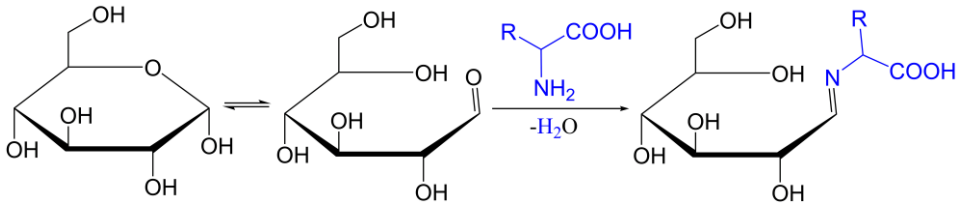


Figura A.2.6. Mecanismul de formare a bazelor *Schiff* (azometine) la condensarea hidraților de carbon cu aminoacizii și/sau moleculele proteice

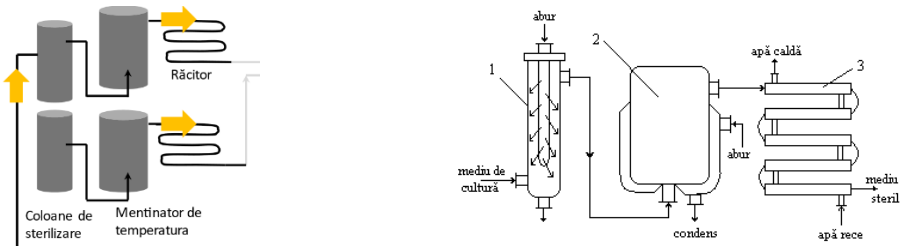
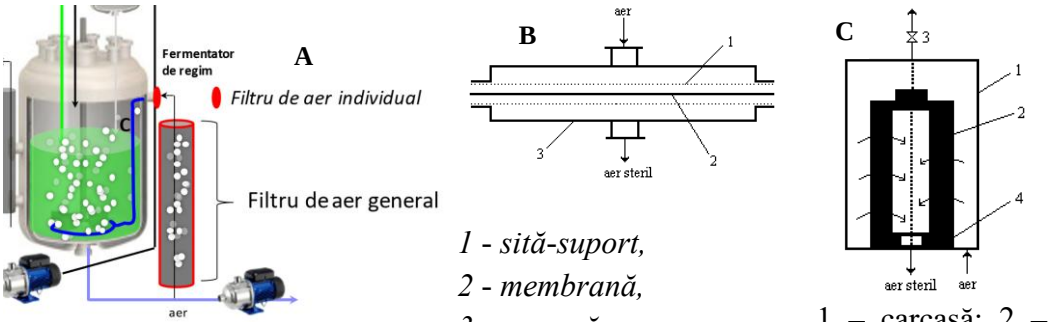


Figura A.2.7. Instalaţie continuă de sterilizare a mediului de cultură la 120 – 125ºC



1 - sită-suport,
2 - membrană,
3 - carcasă

1 – carcasă; 2 – membrană; 3 – ventil de aerisire; 4 – garnituri de etanșare

Figura A.2.8. Bioreactorul echipat cu filtre de aer (A); filtrul de aer individual (B); filtrul de aer general (C)

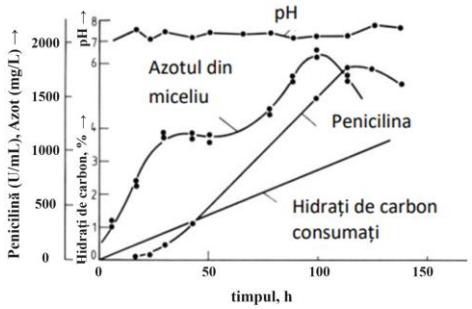


Figura A.2.9. Variația parametrilor de biosinteză în procesul de producere a penicilinelor

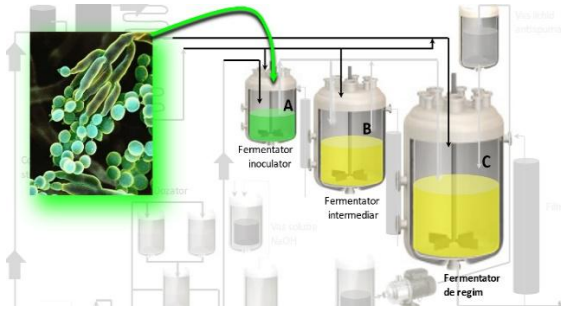


Figura A.2.10. Etapa de *inoculare* în procesul de producere a penicilinelor

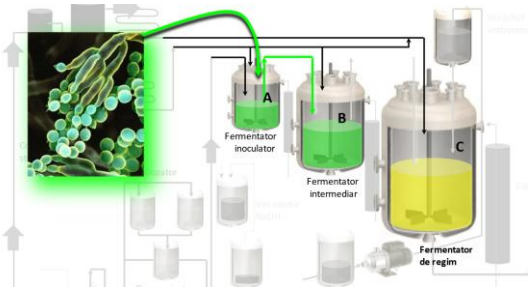


Figura A.2.11. Etapa *lag* în procesul de producere a penicilinelor

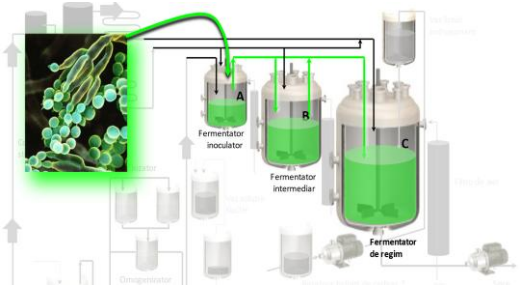


Figura A.2.12. Etapa de *fermentare* în procesul de producere a penicilinelor

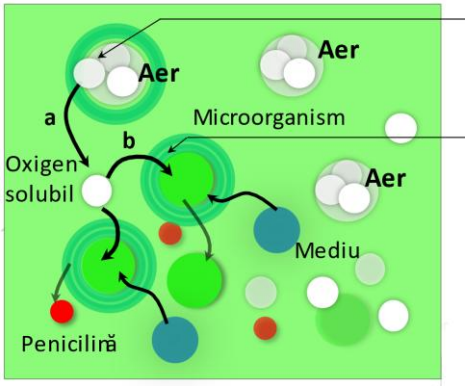


Figura A.2.13. Mecanismul de transfer de masă al oxigenului în procesul de biosinteză a penicilinelor

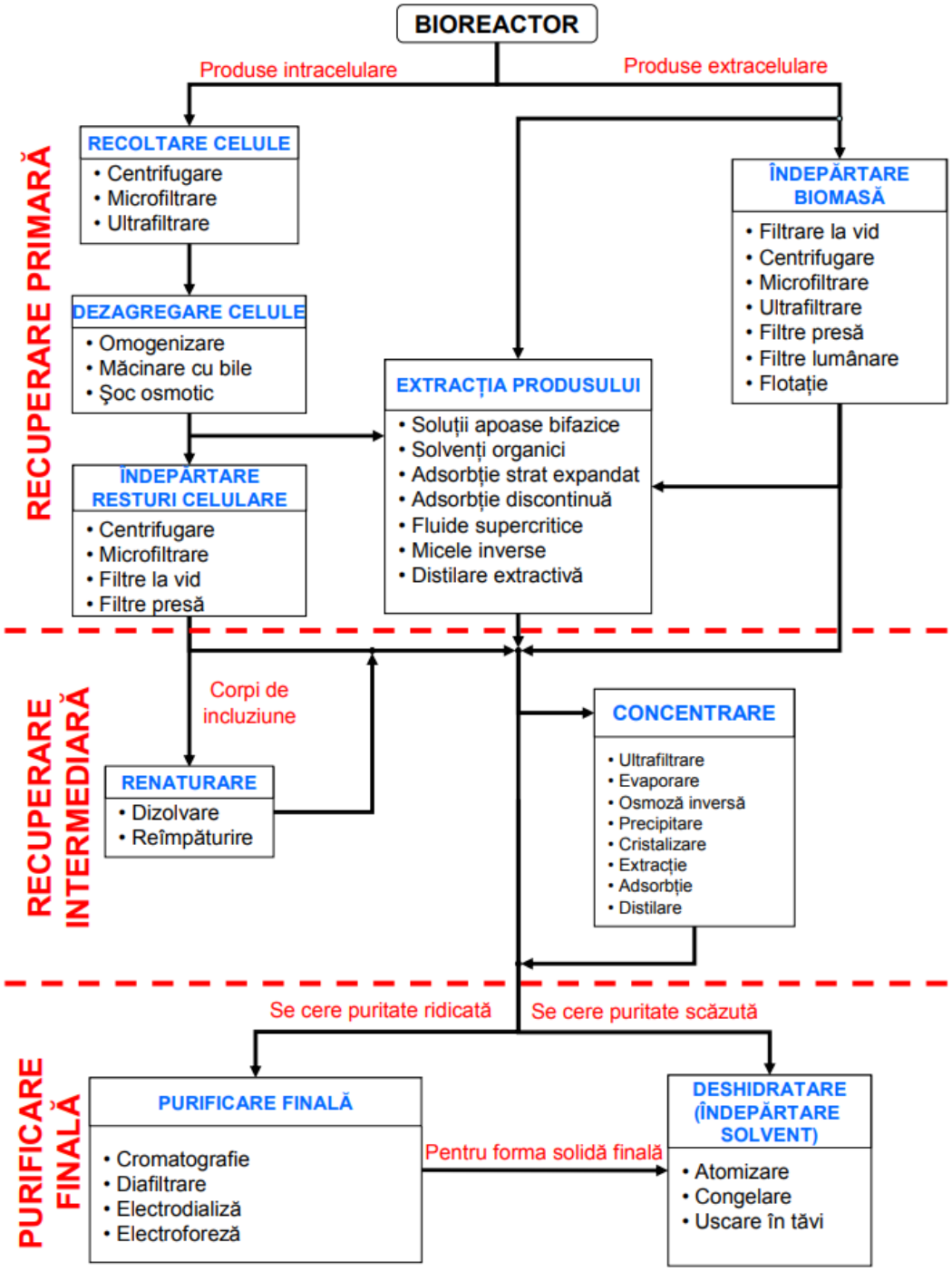
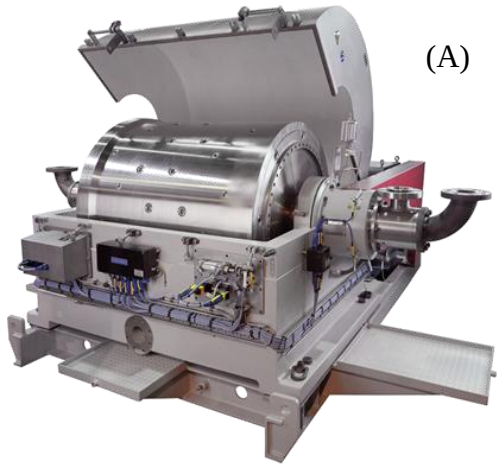


Figura A.2.14. Structura generală a prelucrării biomasei în aval de bioreactor

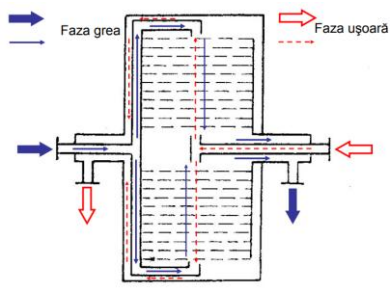


(A)



(B)

Figura A.2.15. Extractor orizontal, Podbielniak (A) și vertical, Luwesta (B)



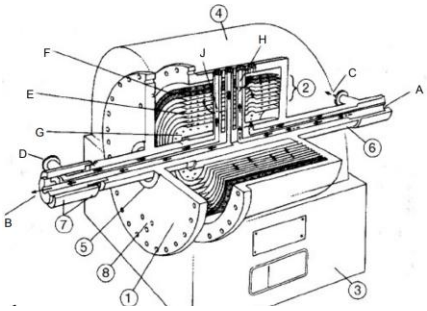


Figura A.2.16. Construcția extractorului Podbielniak

A – intrare fază ușoară; B – ieșire fază grea; C – ieșire fază ușoară; D – intrare fază grea; E – zonă de contact reglabil; F, G – zone de separare reglabilă; J, H – conducte de alimentare cu lichide; 1 – capac lateral demontabil; 2 – site perforate concentrice; 3 – suport; 4 – carcasă rotor; 5 – lagăre; 6 – arbore; 7 – etanșare; 8 – racorduri pentru curățire.

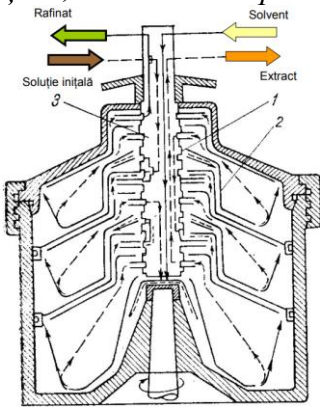


Figura A.2.17. Extractorul Luwesta

1 – discuri de amestecare; 2 – conuri de separare; 3 – ax central.

Tabelul A.2.3. Coeficienții de repartiție ai penicilinei G în sisteme apă – solvent organic la 0°C

Solvent	Valoarea coeficientului de distribuție K	
	pH = 0	pH = 4
Metil-etil-cetonă	180	19
Dimetilciclohexan	160	15
Metilciclohexan	80	7
Ciclohexan	62	4
Furfurilacetat	44	4
Metil-*i*-butil-cetonă	33	3
Dimetilftalat	30	2,7
Acetat de amil	20	1,8
Dietiloxalat	20	1,8

Tabelul A.2.4. Gradul de extracție a unor peniciline şi precursori de biosinteză a acestora în acetat de butil

Compus	Gradul de extracție,%				
	pH = 2	pH = 3	pH = 4	pH = 5	pH = 6
Penicilina G	98	95	75	21	10
Penicilina F	100	100	97	89	39
Penicilina K	100	100	80	62	12
Acid fenilacetic	98	98	96	89	39

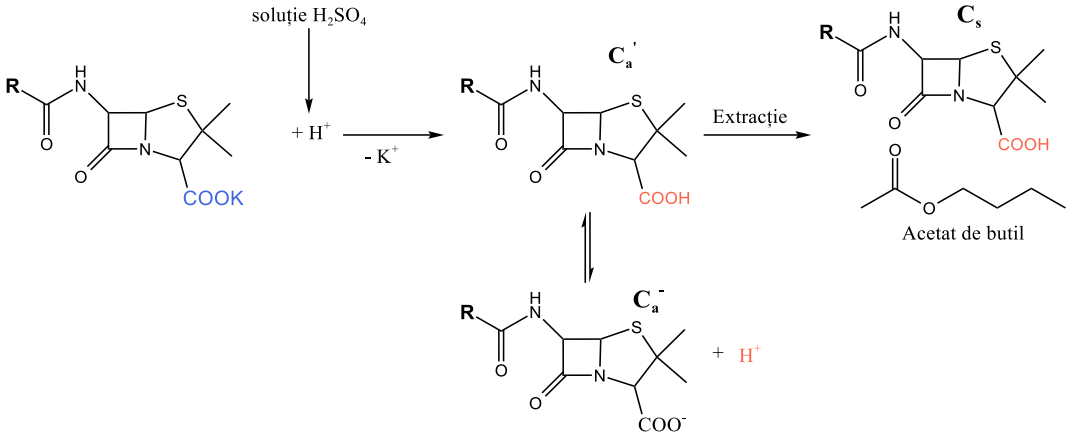


Figura A.2.18. Mecanismul de extracție a penicilinelor naturale cu acetat de butil

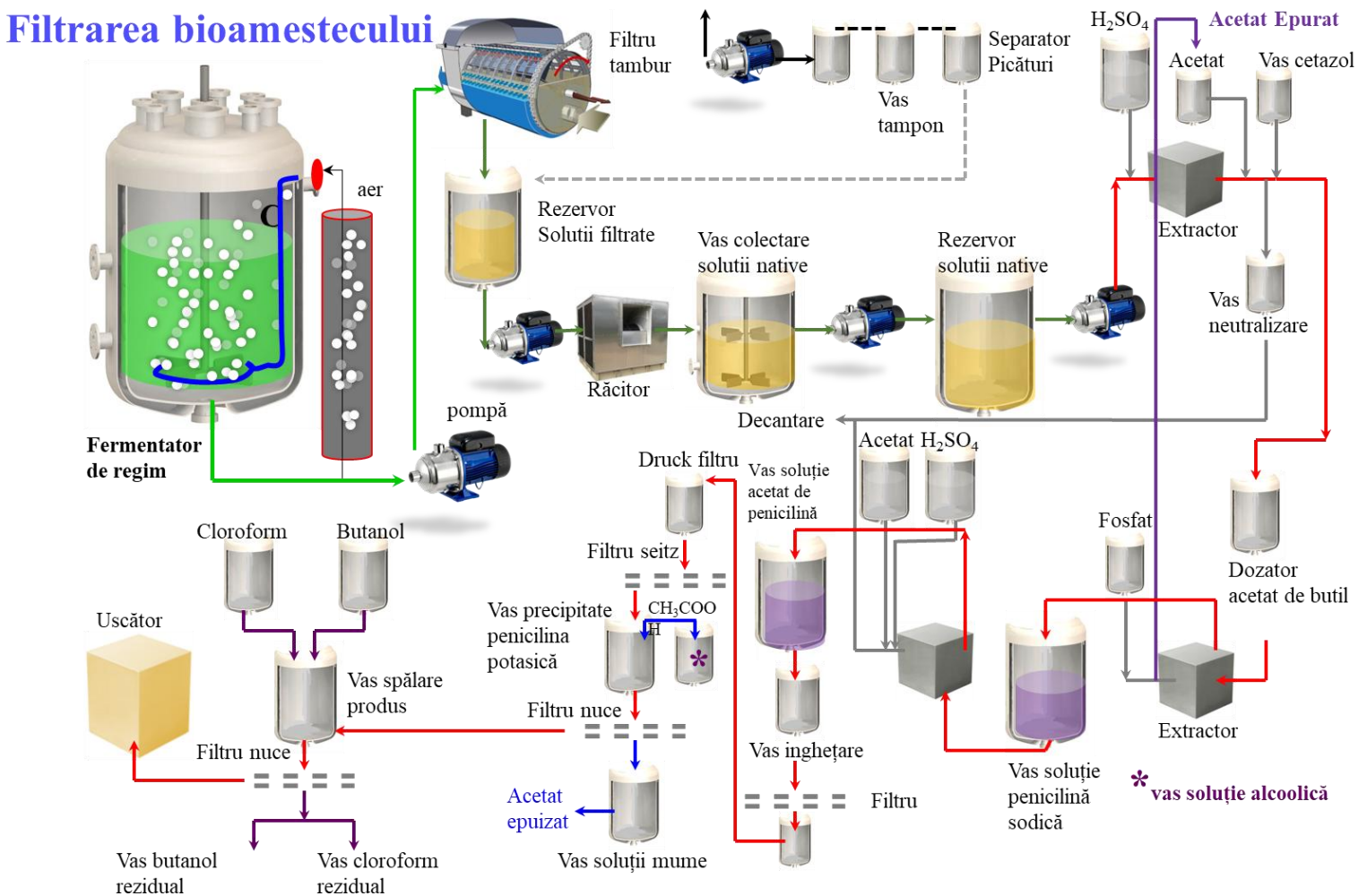


Figura A.2.19. Etapele de separare și purificare a penicilinelor

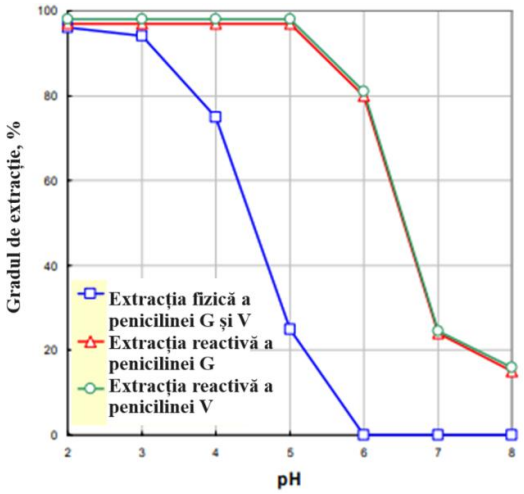
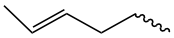
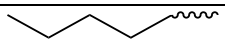
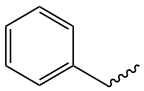
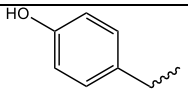
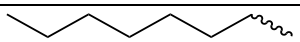
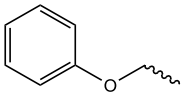
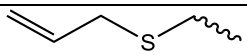
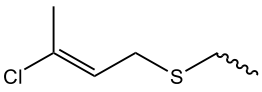


Figura A.2.20. Influența valorii pH-ului fazei apoase asupra gradului de extracție a penicilinelor

Tabelul A.2.5. Gradul de extracție reactivă a unor antibiotice *β-lactamice* cu trioctilamină în cloroform

Antibiotic	Gradul de extracție,%	
	0,01 M TOA	0,1 M TOA
Benzilpenicilină	92,0	92,1
Cloxacilină	96,8	96,2
Dicloxacilină	98,9	99,1
Ampicilină	23,1	71,3
Meticilină	94,6	98,5
Carbenicilină	84,4	66,8
Amoxicilină	0,5	1,4
Epicilină	22,4	66,8
Bayercilină	98,3	97,6
Fenoximetilpenicilină	98,4	98,3
Clomatacilină	97,8	98,8
Oxacilină	99,0	100,0

Tabelul A.2.6. Structura şi activitatea penicilinelor naturale

Denumirea penicilinei	Structura radicalului	Denumirea radicalului	Activitatea, U.I./mg
Penicilina F		2-Pentenil	1500
Dehidropenicilina F		2-Pentil	1670
Penicilina G, II		Benzil	1667
Penicilina X, III		*p*-Hidroxi-benzil	900
Penicilina K, IV		*n*-Heptil	2300
Penicilina V		Fenoximetil	1630
Penicilina O		Alilmercaptometil	-
Penicilina S		3-Clor-2-buteniltiometil	-

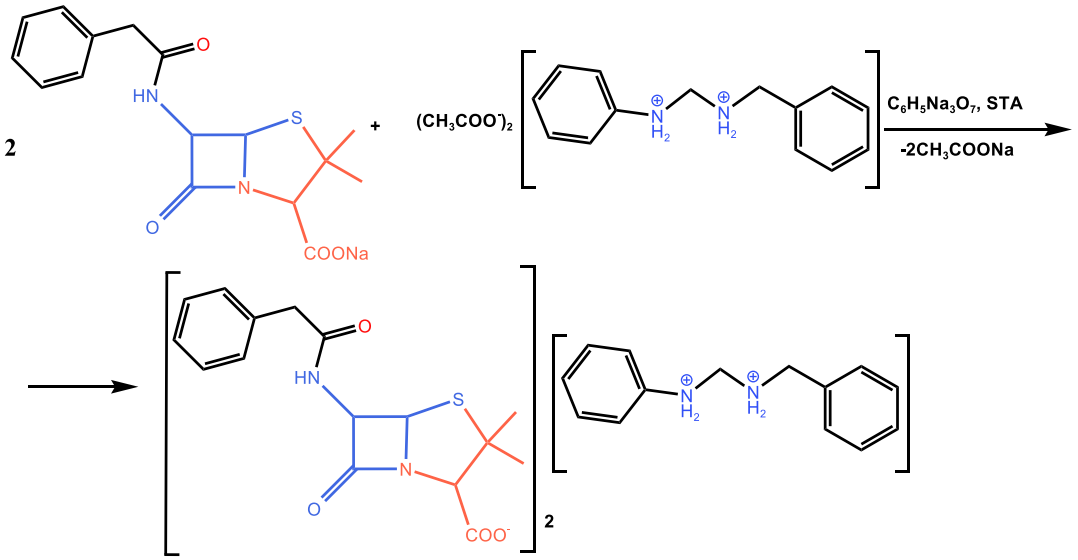


Figura A.2.21. Ecuația reacției de obținere a benzatin penicilinei G din penicilina G

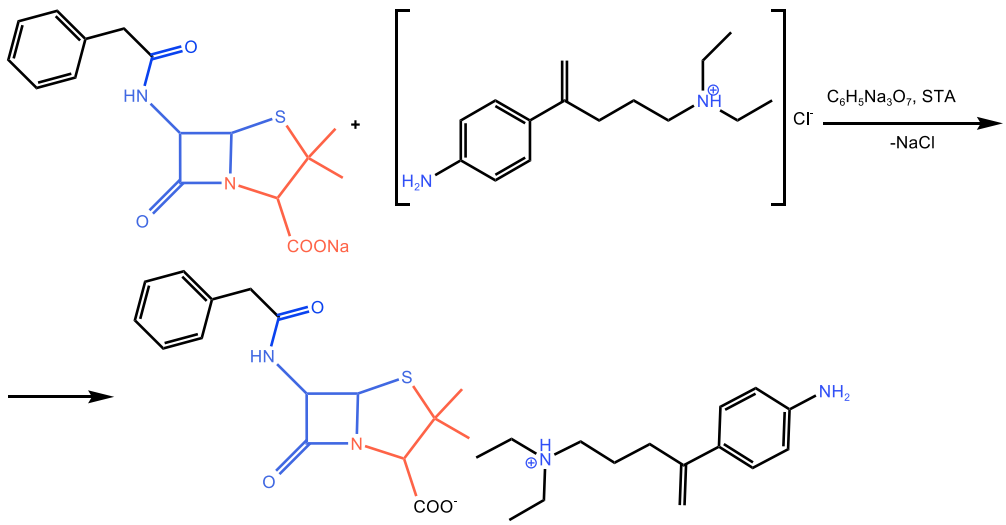


Figura A.2.22. Ecuația reacției de obținere a procain penicilinei G din penicilina G

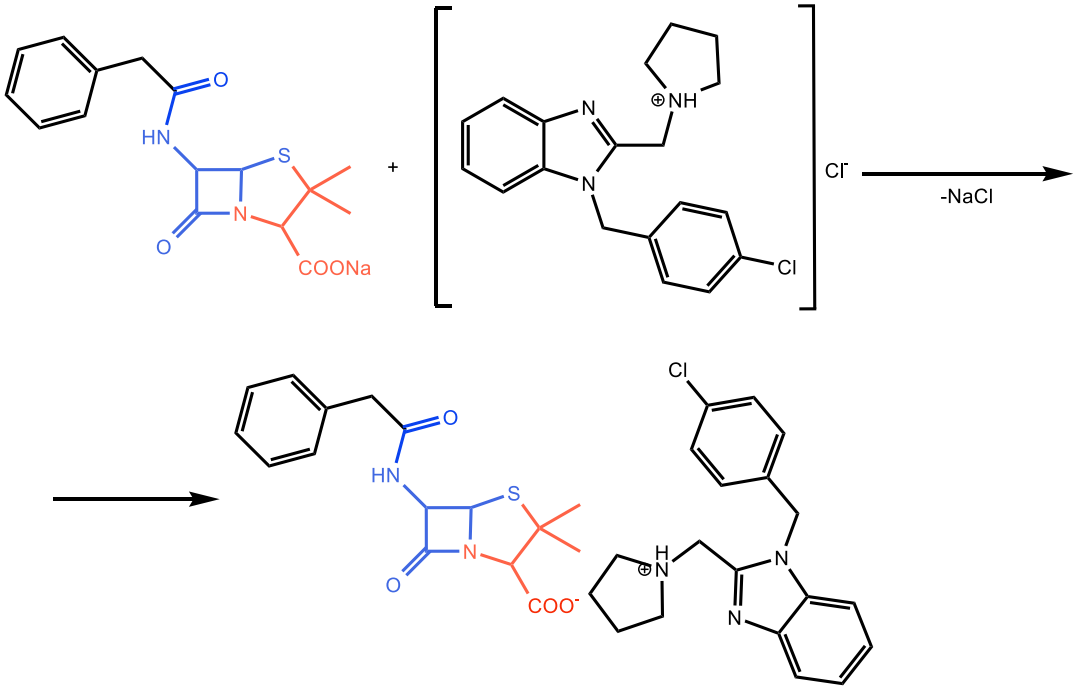


Figura A.2.23. Ecuația reacției de obținere a clemizol penicilinei G din penicilina G

ANEXA A.3

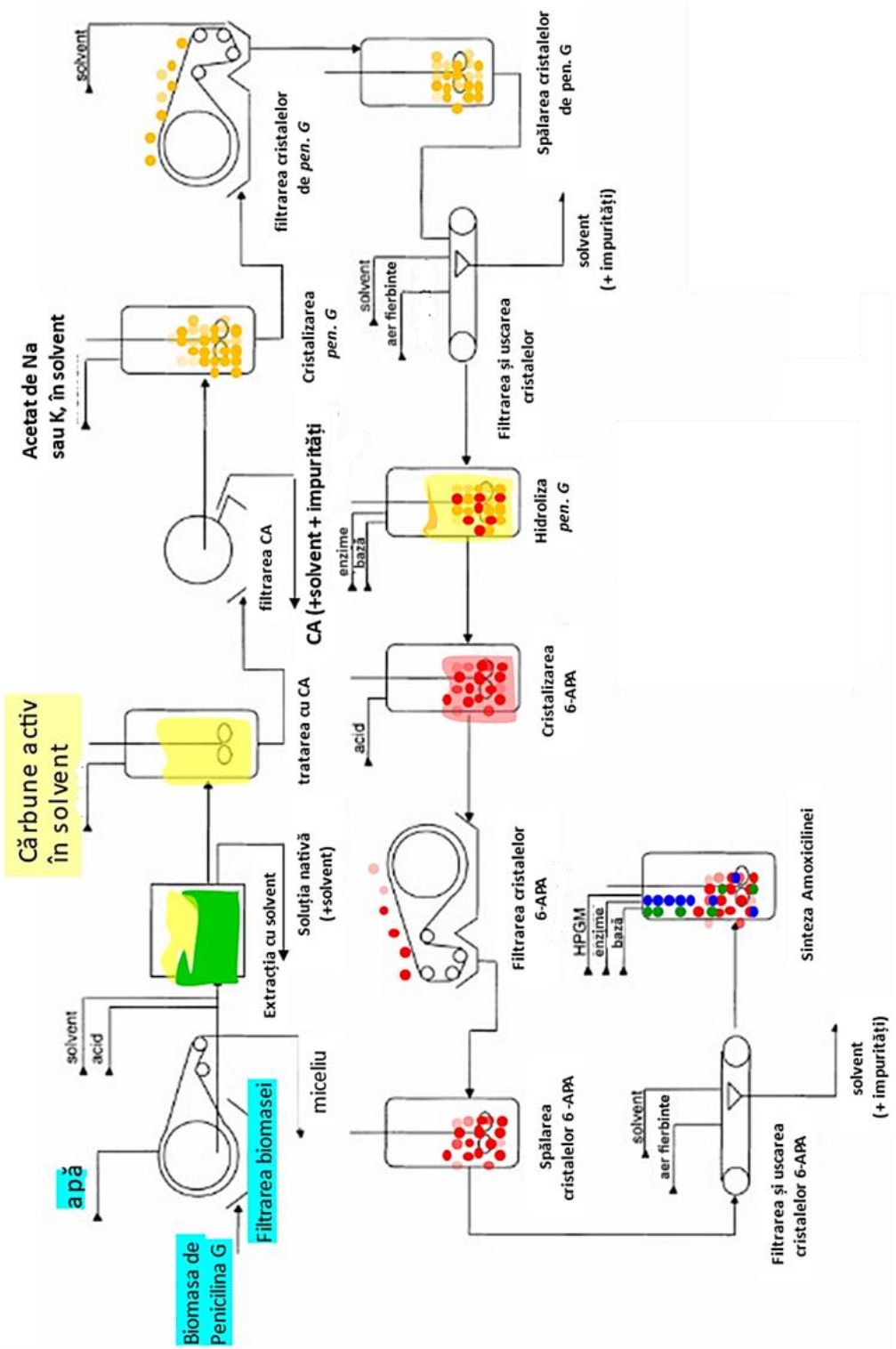


Figura A.3.1. Schema tehnologică de obținere a *Amoxicilinei* prin tehnologia integrată

ANEXA A.4

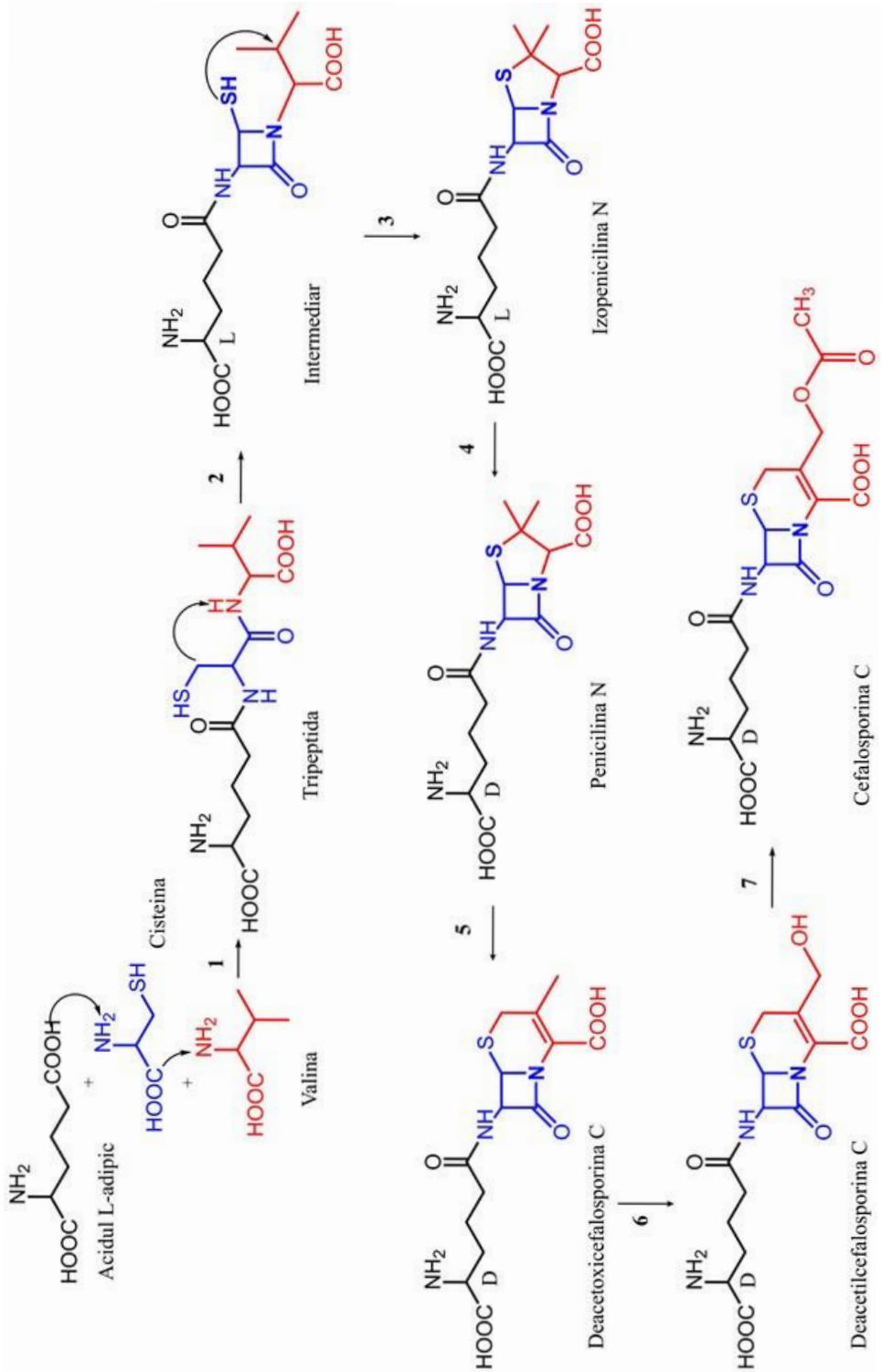


Figura A.4.1. Mecanismul de biosinteză a CFC

Tabelul A.4.1. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a CFC

	Componenți	Mediul 1, kg/m^3	Mediul 2, kg/m^3
	Extract de porumb	-	92,50
	Făină de arahide	100,00	
	Făină din semințe de bumbac	-	17,50
	Ulei de soia	-	14,00
	Oleat de metil (esterul metilic al acidului oleic)	3,00	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,50	8,00
	$(NH_4)_2\ SO_4$	-	14,00
	Acetat de amoniu	6,00	-
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0,1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,50	0,04
	$CaSO_4 \cdot 7H_2O$	2,50	-
	$CaCO_3$	5,00	10,00
	Făină de soia	-	34,00
	D,*L*-metionină	3,00	-
	Uree	-	3,00
	Amidon	-	20,00
	Glucoză	11,00	65,00
	Desmofen (alcool polivinilic modificat cu stiren acrilonitril)	3,00	0,50
pH-ul 5,8		-	-
	Sirop de glucoză	500,00	66,00%
	$(NH_4)_2\ SO_4$		20,00%
	Metionină	15,00-20,00	-

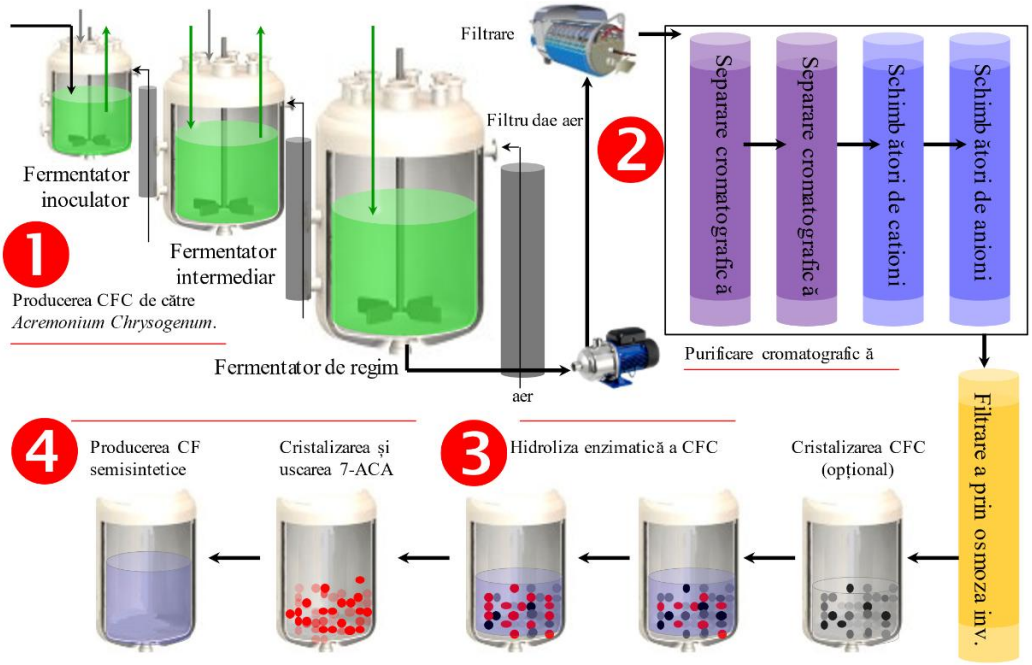


Figura A.4.2. Schema tehnologică de producere a CFC prin proces biotehnologic

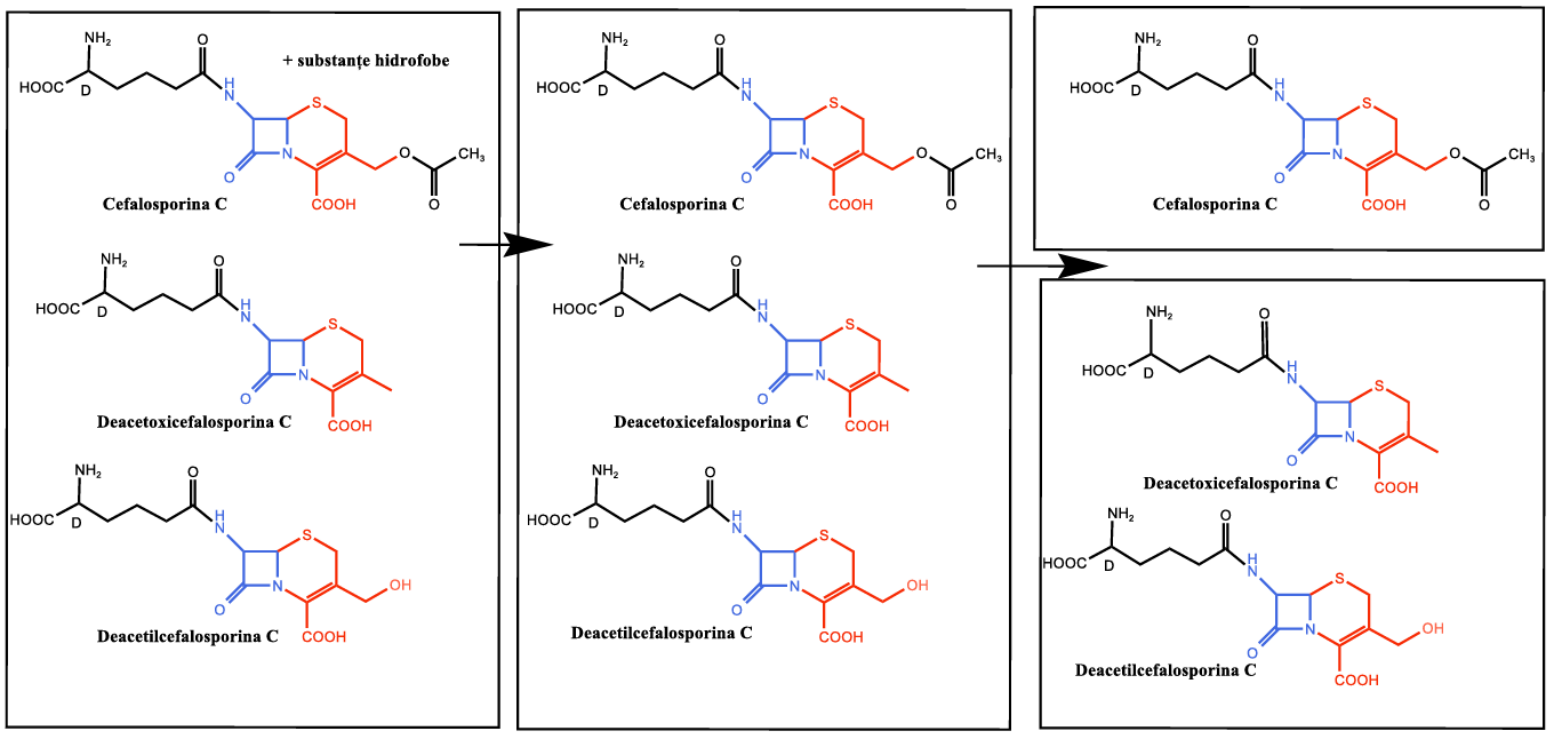


Figura A.4.3. Mecanismul depurificare cromatografică a Cefalosporinei C

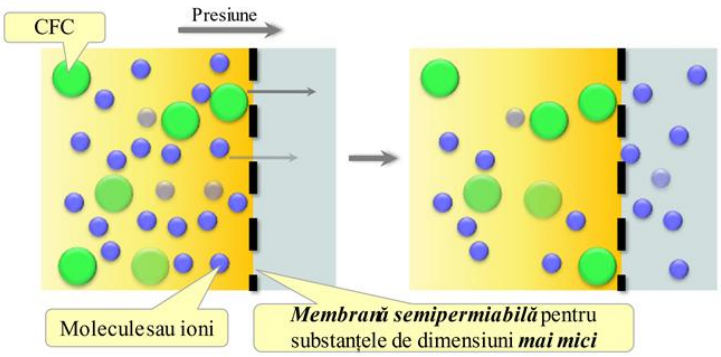


Figura A.4.4. Mecanismul de filtrare a CFC prin osmoză inversă

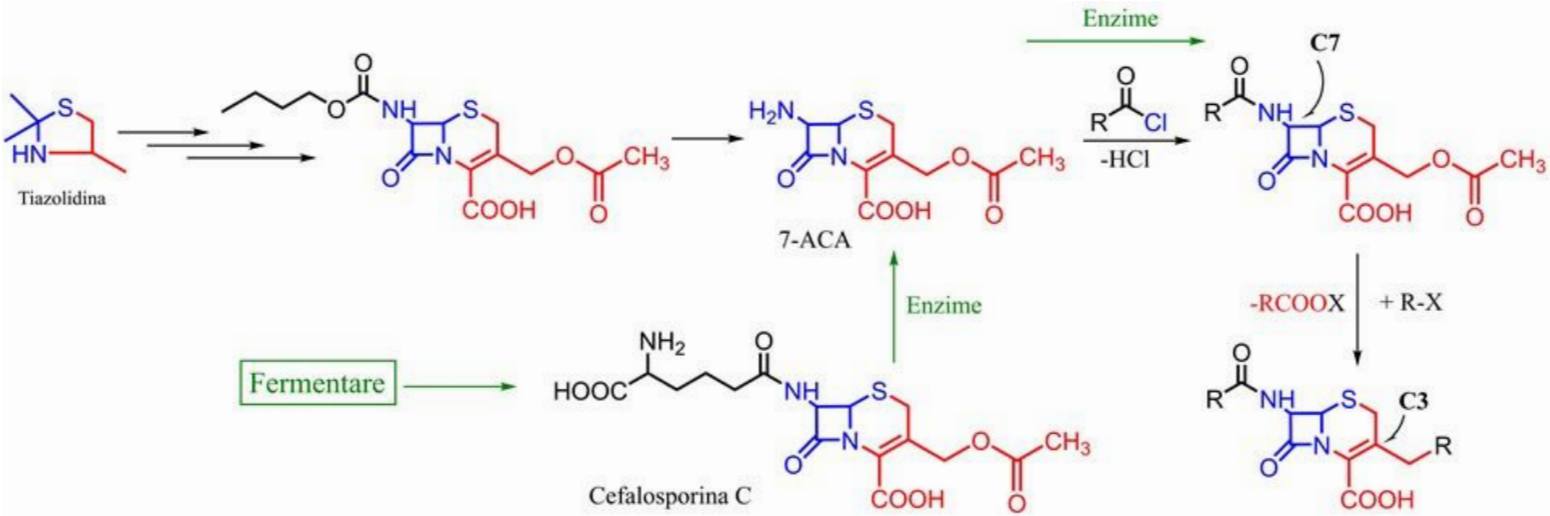


Figura A.4.5. Mecanismul general de obținere a 7-ACA

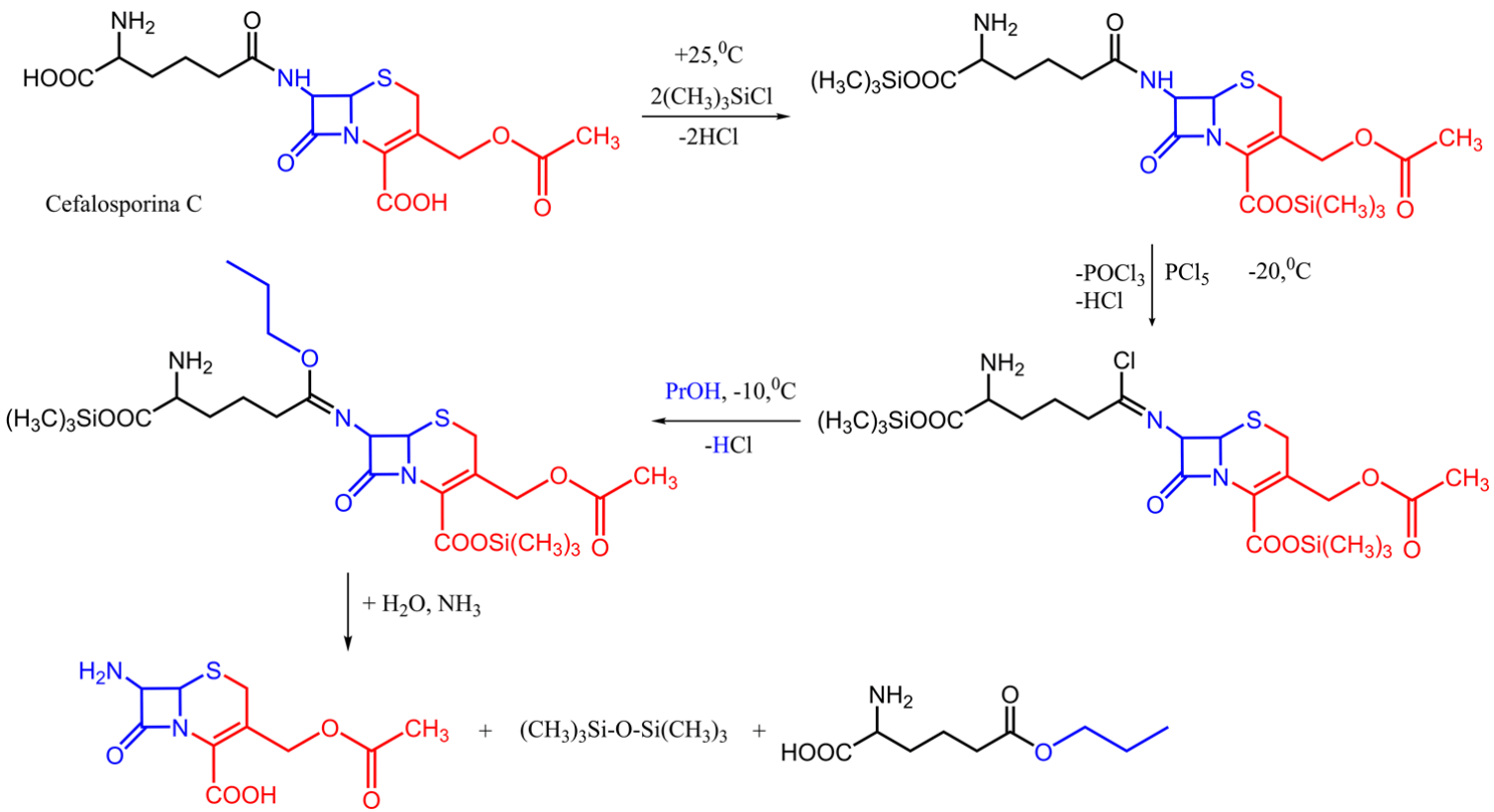


Figura A.4.6. Mecanismul de obținere a 7-ACA prin conversia chimică a CFC

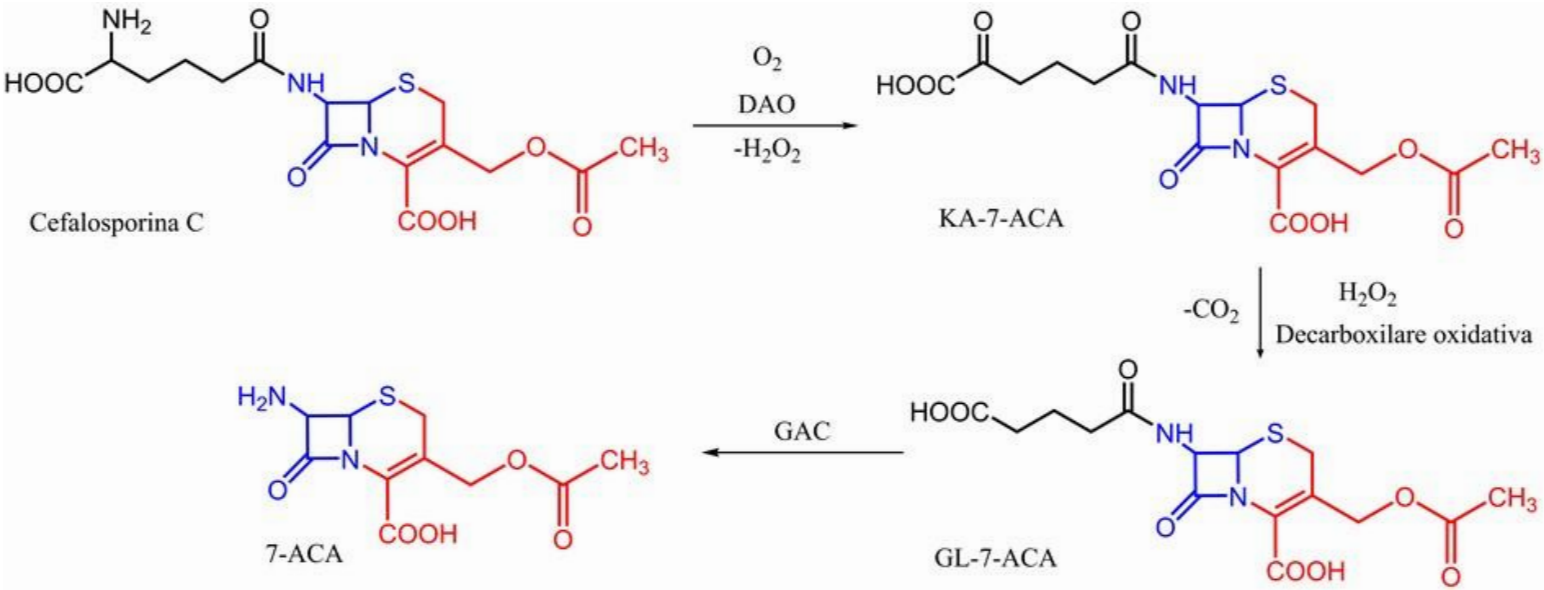


Figura A.4.7. Mecanismul de obținere a 7-ACA prin conversia enzimatică a CFC

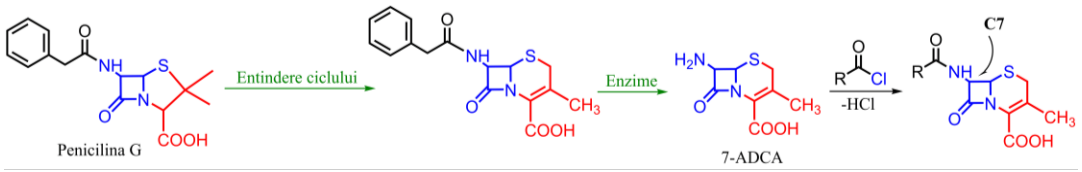


Figura A.4.8. Mecanismul general de obținere a CF semisintetice din penicilina G

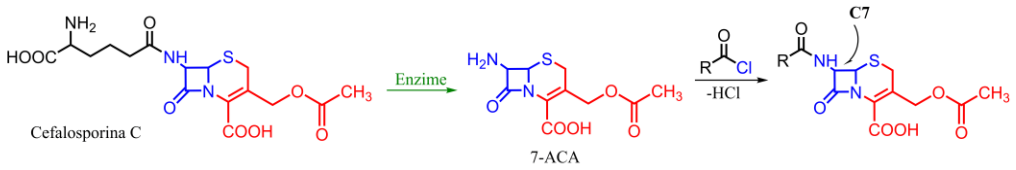


Figura A.4.9. Mecanismul general de obținere a CF semisintetice din 7-ACA obținut prin hidroliza enzimatică a CFC

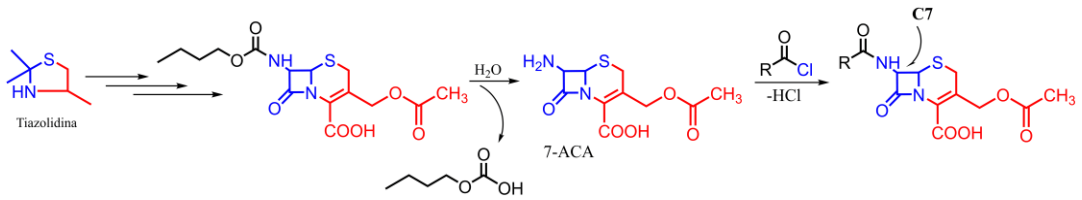


Figura A.4.10. Mecanismul general de obținere a CF semisintetice din 7-ACA obținut pe cale chimică din tiazolidină

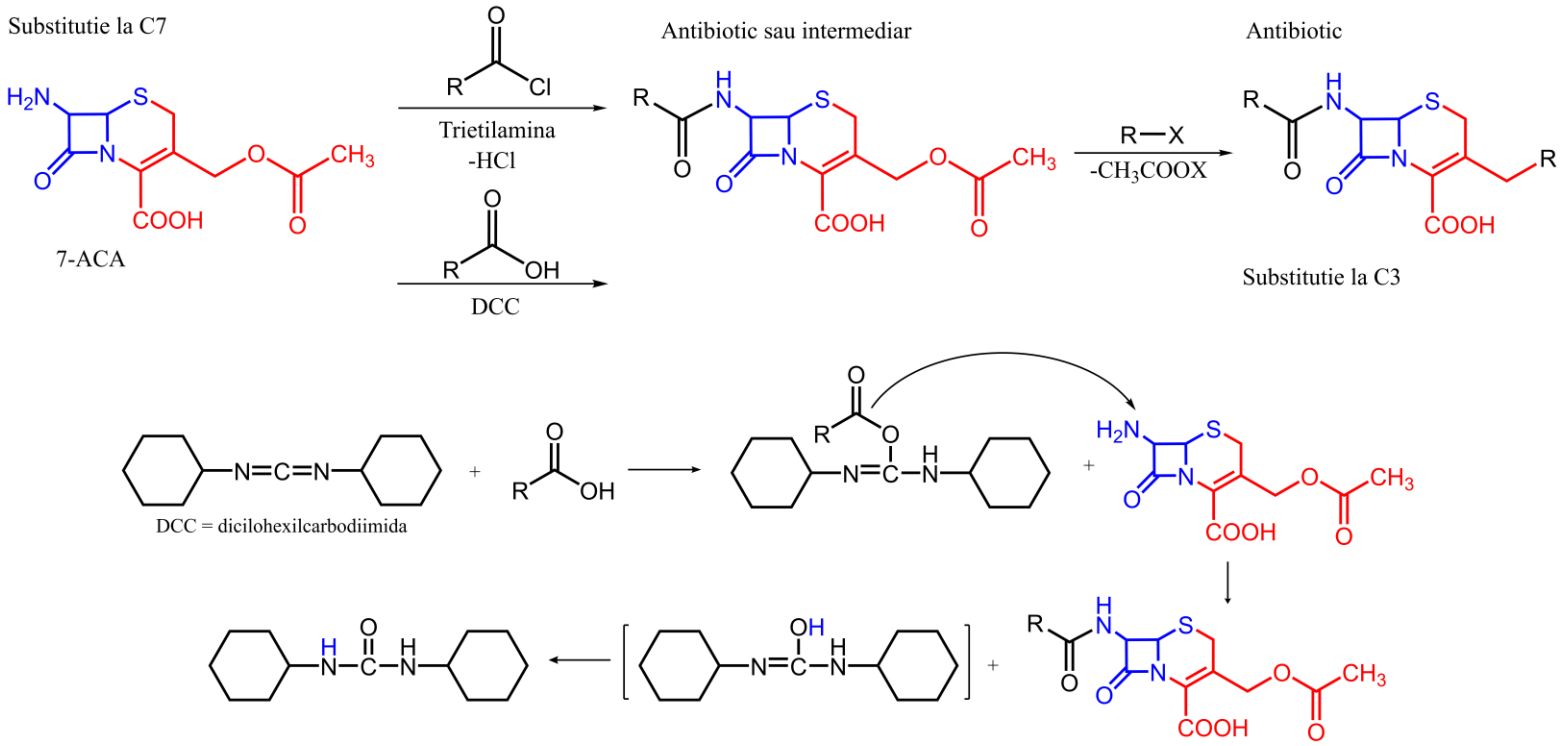


Figura A.4.11. Mecanismul general de acilare a 7-ACA în pozițiile C_7 și/sau C_3

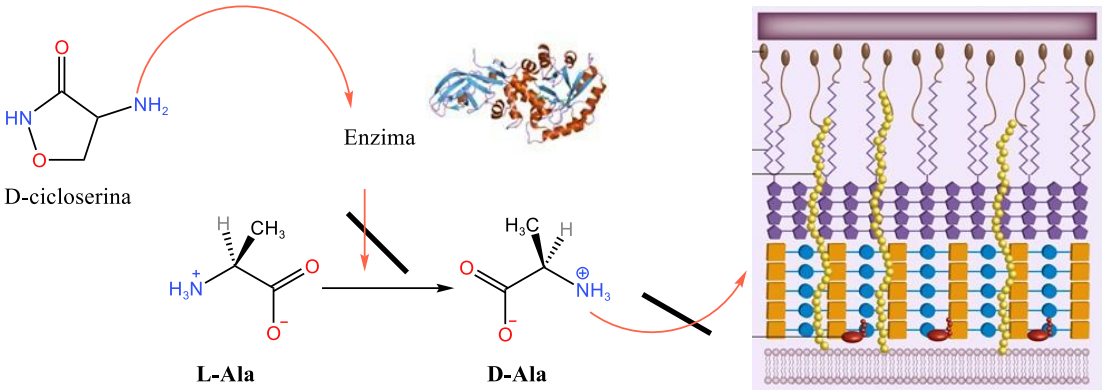


Figura A.5.1. Mecanismul de acțiune a *D*-cicloserinei asupra bacteriilor, prin blocarea conversiei *L-alaninei* în *D-alanină*

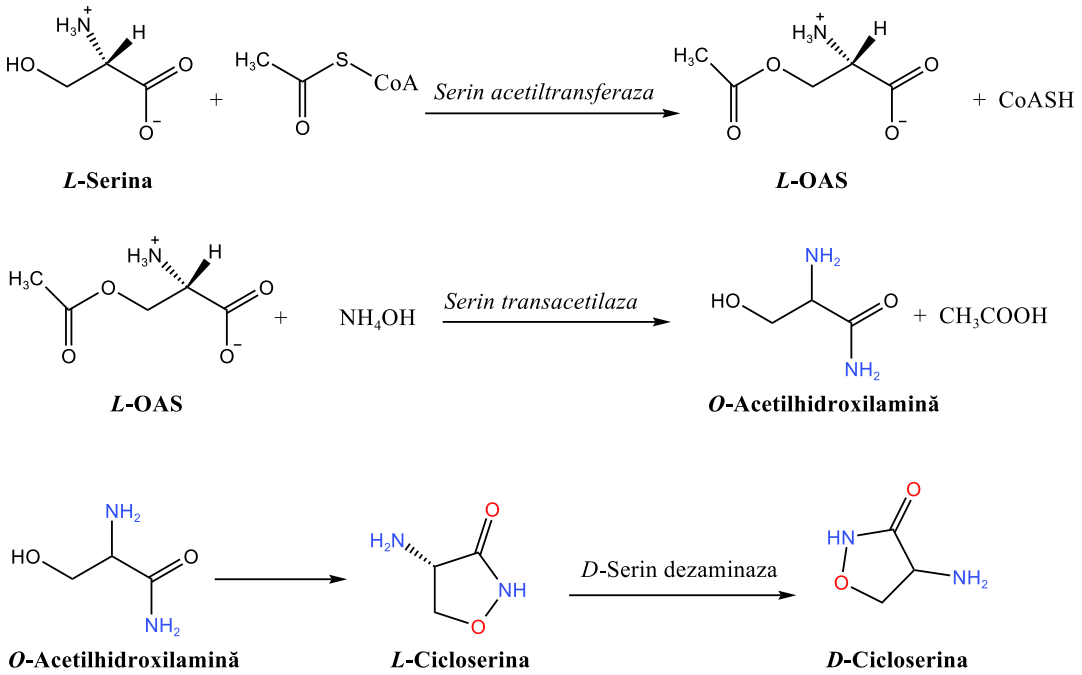


Figura A.5.2. Mecanismul de biosinteză a *D*-cicloserinei din *L*-serină

Tabelul A.5.1. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a *D*-cicloserinei

Mediul nutritiv	Componenți	Conținut,%
Mediul de inoculare	Dextroză	1,000
	Gelatină	0,500
	$NaNO_3$	0,300
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050
	K_2HPO_4	0,050
Mediul de fermentare	Amidon	5,000
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050
	K_2HPO_4	0,050
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,002
	$ZnSO_4$	0,002
	$MnSO_4$	0,001
	Ulei obținut din untură de porc	0,400
	Uree	0,480

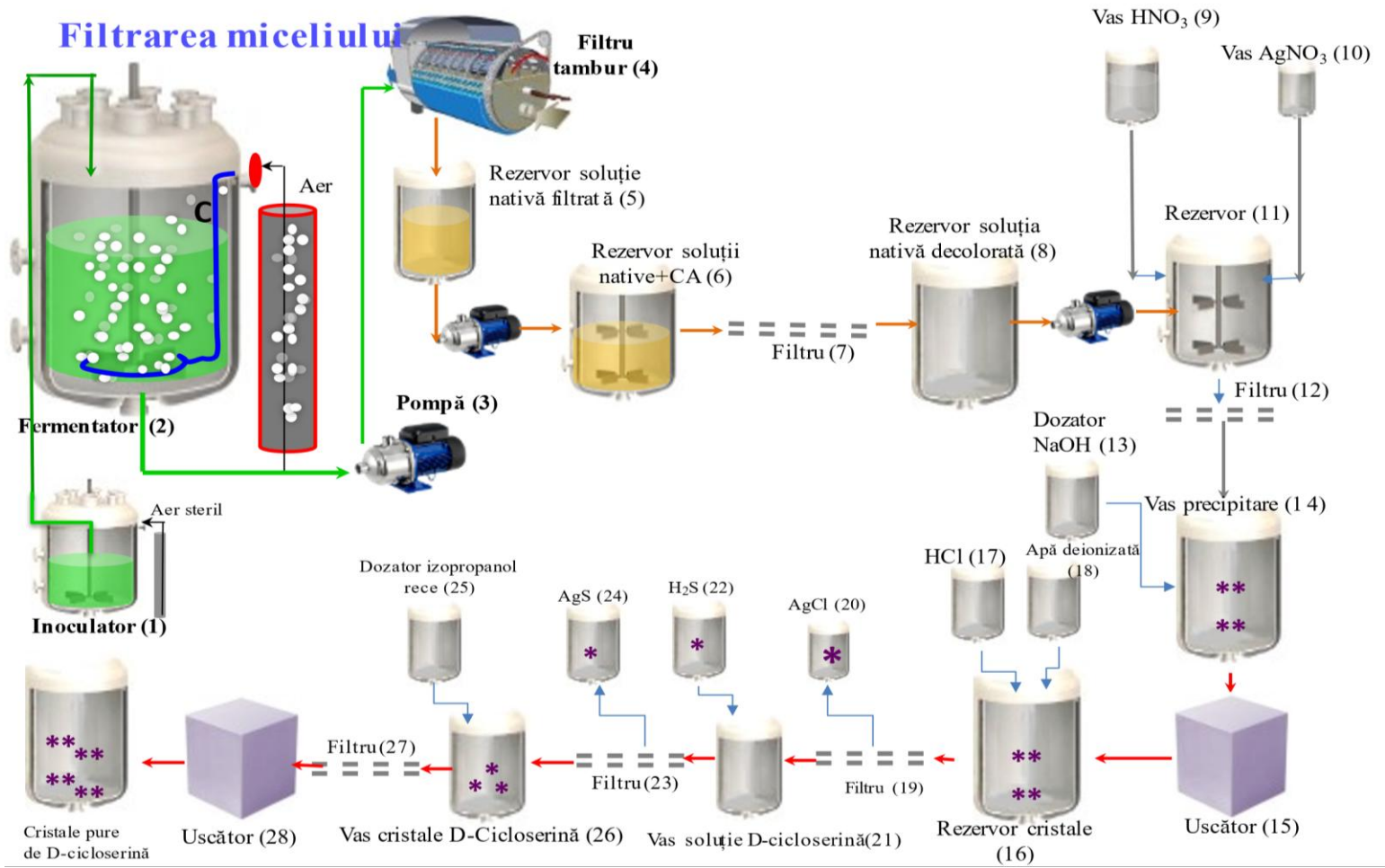


Figura A.5.3. Schema tehnologică de producere biochimică a *D*-cicloserinei cu ajutorul *Streptomyces orchidaceus*

Descrierea utilajelor din figura A.5.3. *Bioreactor de inoculare (1); fermentator (2); pompă (3); filtru cu tambur (4); vas colectare soluție nativă filtrată (5); vas amestecare soluție nativă cu cărbune activ (CA) (6); filtru cu membrană (7); rezervor soluție nativă decolorată (8); dozator soluție HNO_3 (9); dozator soluție $AgNO_3$ (10); rezervor pentru precipitarea sării de argint a cicloserinei (11); filtru cu membrană (12); dozator soluție NaOH (13); vas pentru precipitarea sării de argint a cicloserinei (14); uscător (15); rezervor pentru colectarea cristalelor (16); dozator HCl (17); dozator apă deionizată (18); filtru (19); vas colectare AgCl precipitat (20); vas colectare soluție de D-cicloserină (21); dozator H_2S (23); filtru (23); vas colector Ag_2S (24); dozator izopropanol rece pentru precipitarea D-cicloserinei (25); vas pentru cristalizarea D-cicloserinei (26); filtru (27); uscător cristale de D-cicloserină (28).*

Tabelul A.5.2. Microorganismele folosite în biosinteza non-ribozomală a unor peptido-antibiotice

Gramicidine	*Bacillus brevis*
Polimixine	*B. polymyxa și B. circulans*
Bacitracine	*B. subtilis*
Vancomicine	*Streptomyces orientalis (Nocardia orientalis)*

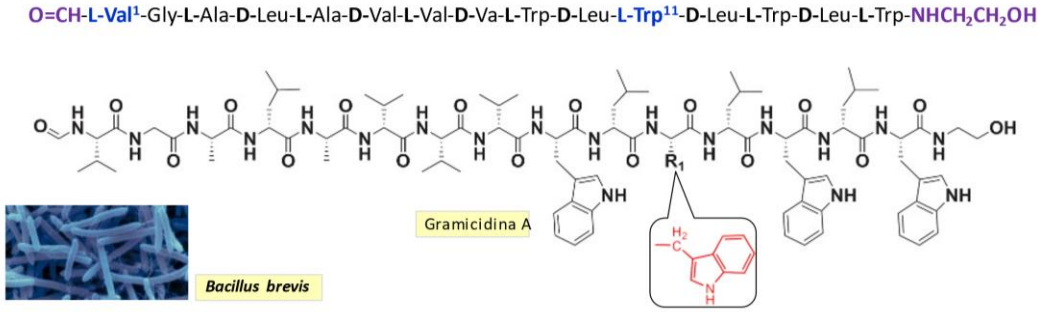


Figura A.5.4. Formula de structură a gramicidinei A

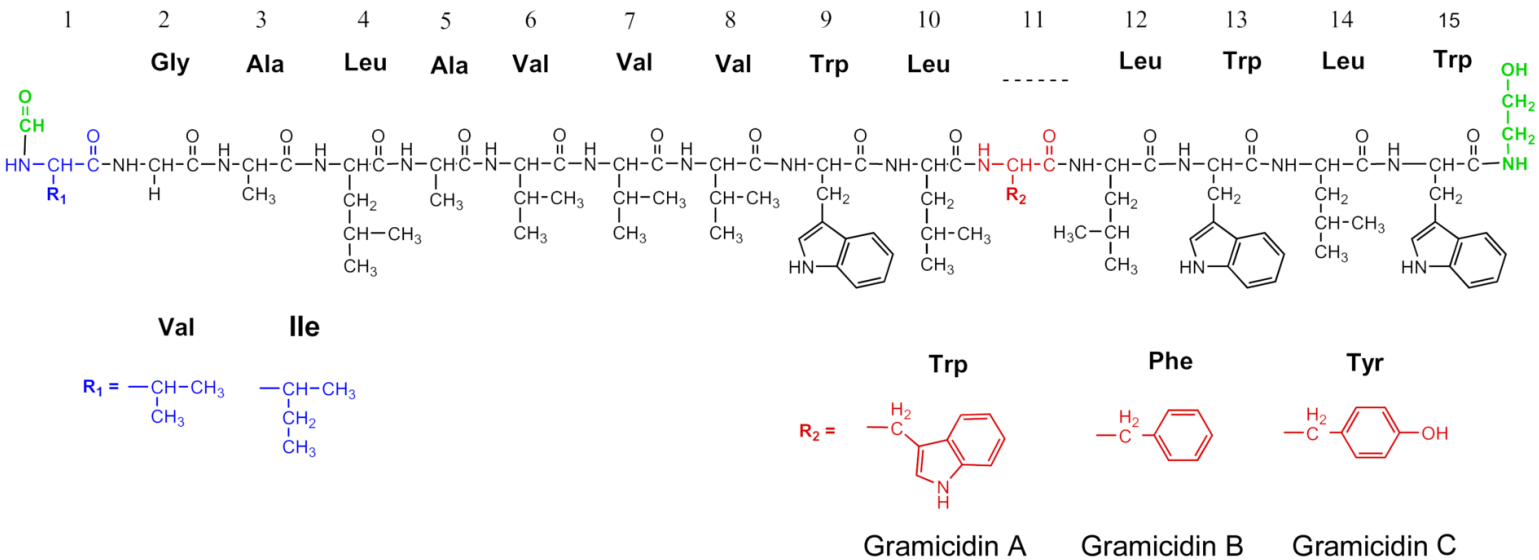


Figura A.5.5. Formulele de structură a gramicidinelor A, B și C

Gramicidinele A, B și C diferă după tipul aminoacidului din poziția 11: Trp pentru A, Phe pentru B și Tyr pentru C. Aminoacidul din poziția 1 poate fi L-Val sau L-Ile. Aproximativ 5% din amestec conține în prima poziție a moleculei aminoacidul L-Ile.

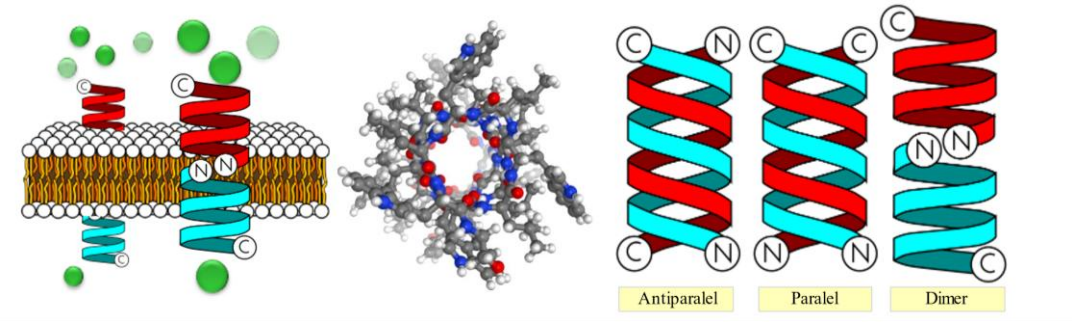


Figura A.5.6. Prezentarea grafică a moleculelor de dublu helix ale gramicidinelor

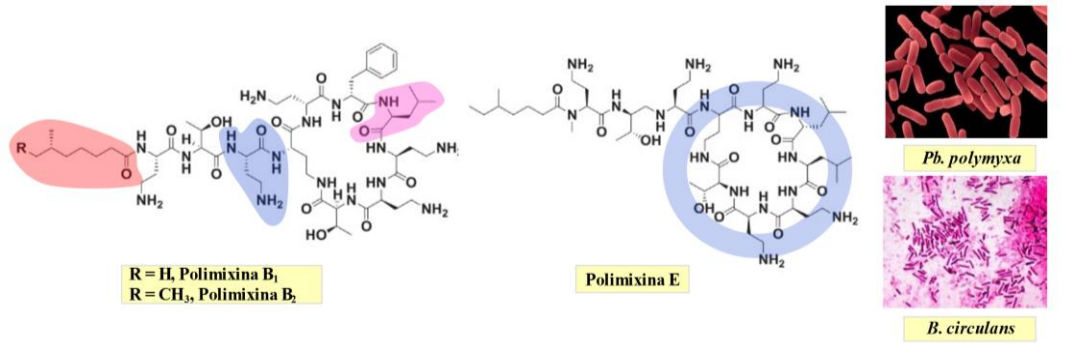


Figura A.5.7. Formulele de structură a polimixinelor B și E

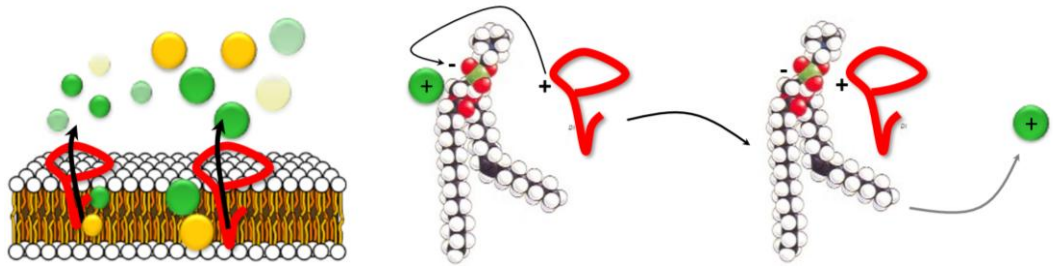


Figura A.5.8. Mecanismul de acțiune a polimixinelor

Tabelul A.5.3. Mecanisme de acțiune a polimixinelor asupra bacteriilor

Mecanism	Descriere	Efect asupra bacteriilor G(-)
Liza membranară	Polimixinele se leagă selectiv de lipopolizaharidele membranare (LPM) și dislocă cationii bivalenți (Ca^{2+}, Mg^{2+}), destabilizând membrana exterioară (ME). Inserția segmentelor hidrofobe ale polimixinei slăbește structura membranei interioare (MI), ducând la distrugerea acesteia	Liza membranei bacteriene și moarte celulară

Blocarea NADH oxidoreductazei de tip II	Polimixinele inhibă NADH oxidoreductaza de tip II (NDH-2/NQR), o enzimă respiratorie esențială în transportul electronilor și producția de ATP	Perturbarea respirației celulare și deficit de ATP, ceea ce duce la moarte celulară
Medierea contactelor dintre straturile periplasmatice ale MI și ME	Polimixinele se leagă de fosfolipidele din ME și MI, favorizând schimbul de fosfolipide între straturi și provocând un dezechilibru osmotic	Pierderea integrității membranei, dezechilibru osmotic și liza celulară
Stresul oxidativ	Polimixinele induc formarea speciilor reactive de oxigen (O_2^-, H_2O_2, $^{\cdot}OH$) prin reacția Fenton, ceea ce duce la deteriorarea oxidativă a ADN-ului, lipidelor și proteinelor (Fig. A.5.9)	Leziuni oxidative severe, apoptoză și moarte celulară

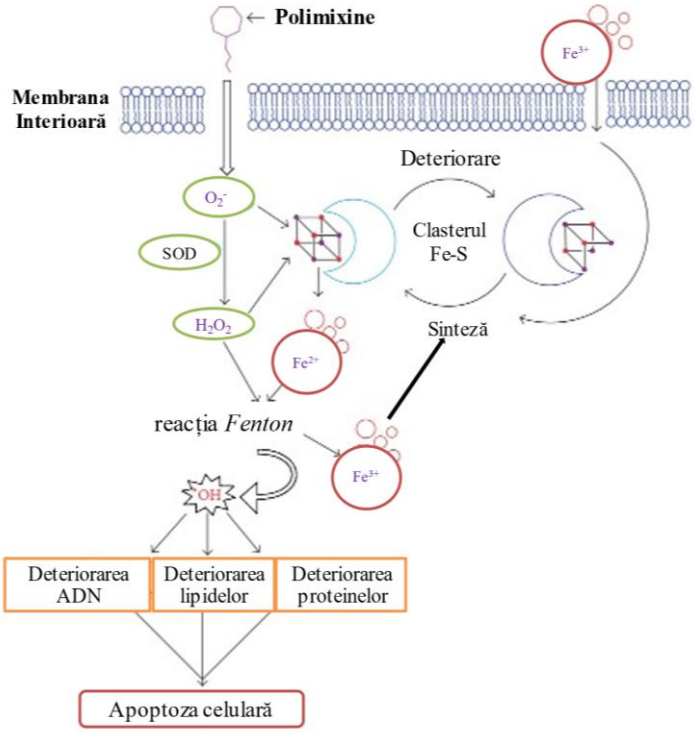


Figura A.5.9. Mecanismul de acțiune a polimixinelor asupra bacteriilor prin inducerea stresului oxidativ

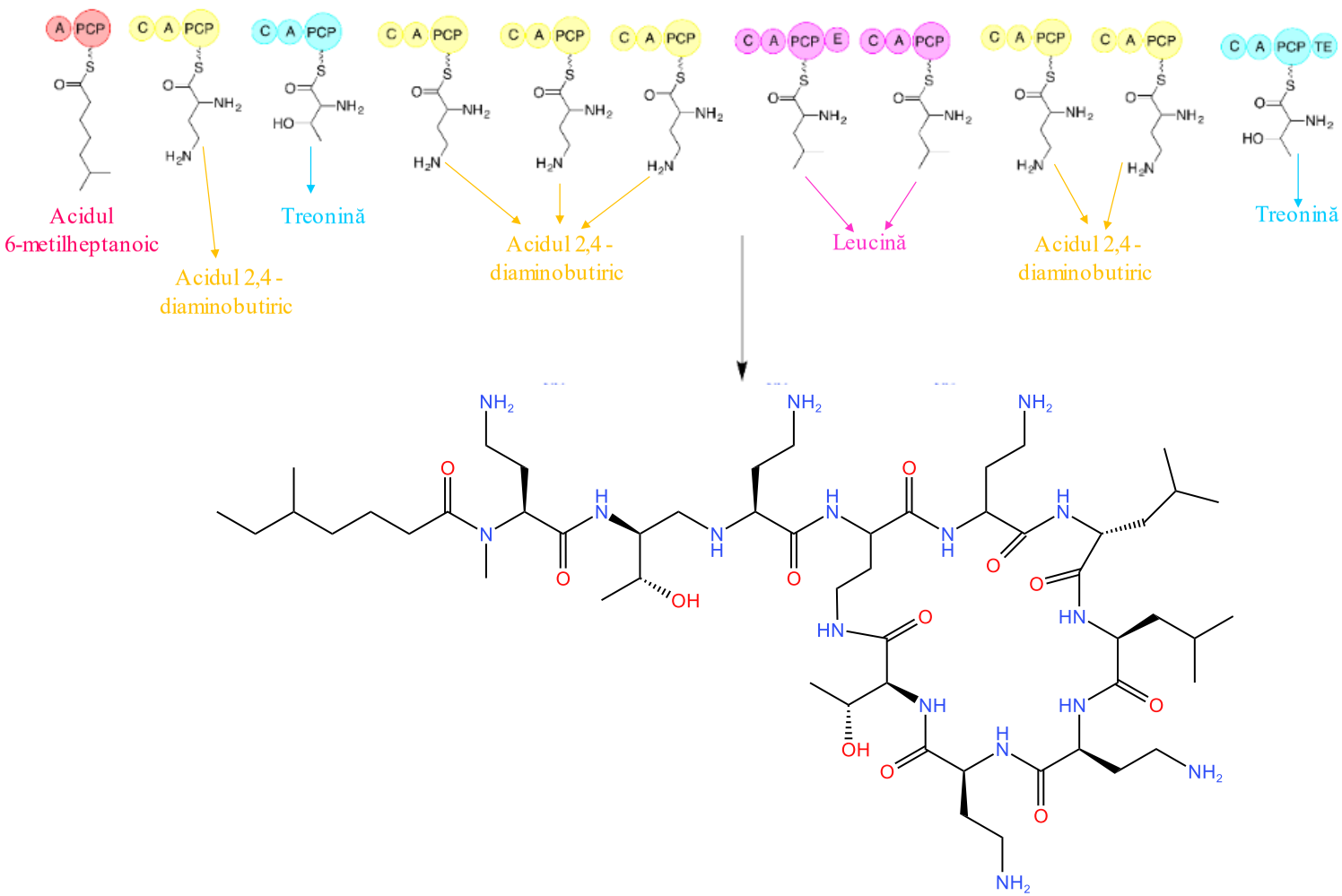


Figura A.5.10. Schema de biosinteză a polimixinei E (colistină)

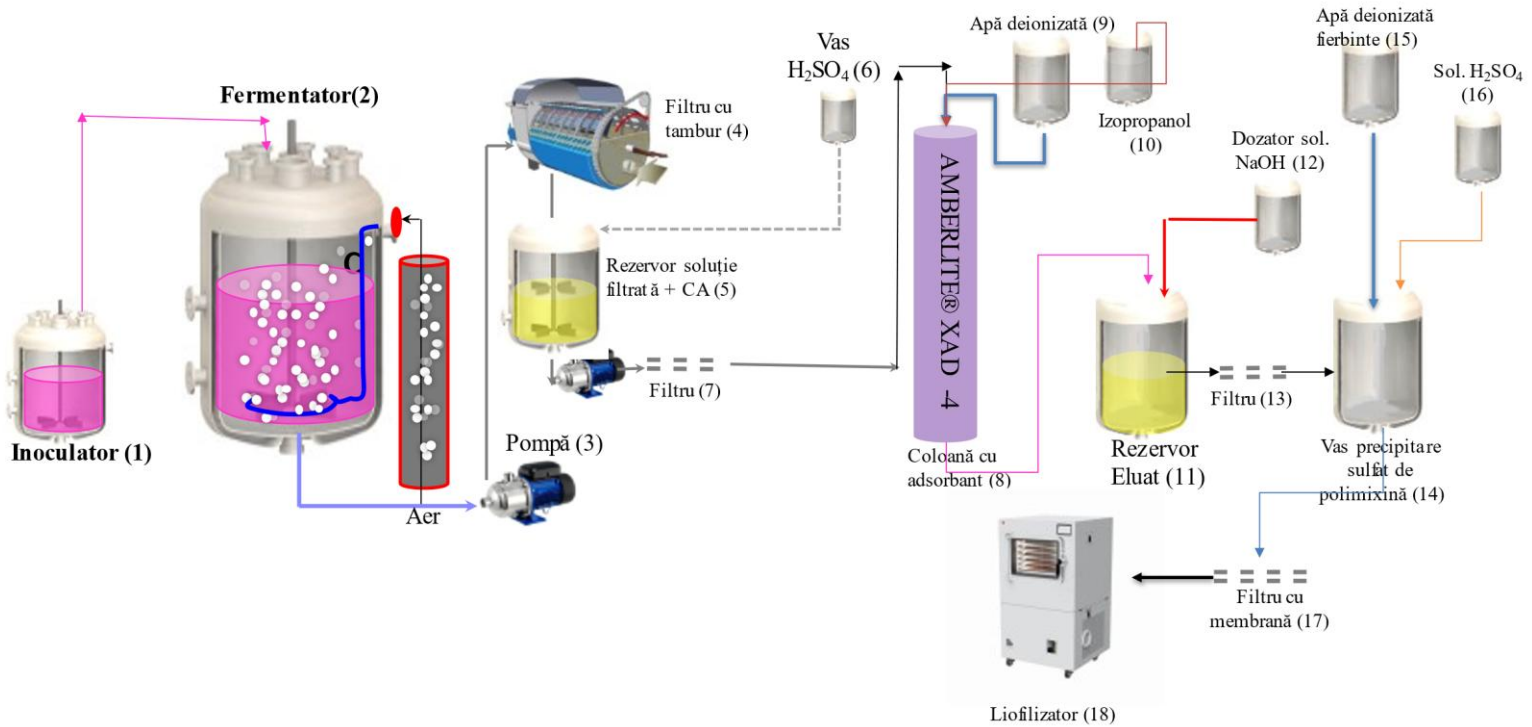


Figura A.5.11. Etapele tehnologice de producere, separare și purificare a polimixinei B

Bioreactor de inoculare (1); fermentator (2); pompă (3); filtru cu tambur rotativ (4); rezervor soluție nativă filtrată cu amestec de cărbune activ (CA) (5); dozator acid sulfuric (6); filtru cu membrană (7); coloană umplută cu adsorbantul AMBERLITE® XAD-4 (8); dozator apă deionizată (9); dozator soluție izopropanol (10); vas colector eluat cu polimixina B (11); dozator soluție NaOH (12); filtru cu membrană (13); vas pentru precipitarea polimixinei B sub formă de sulfat (14); dozator soluție H_2SO_4 (15); dozator apă deionizată (16); filtru cu membrană (17); liofilizator (18).

Tabelul A.5.4. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a polimixinelor

Mediul	Componenți	Concentrația, g/L
de inoculare	$(NH_4)_2SO_4$	20,00
	glucoză	10,00
	extract de porumb	
	K_2HPO_4	2,60
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
	NaCl	0,05
de fermentare	glucoză	60,00
	$(NH_4)_2SO_4$	15,00
	peptone	10,00
	K_2HPO_4	2,00
	NaCl	1,00
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,70
	KCl	0,50
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	5,00 mg/L
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,30 mg/L

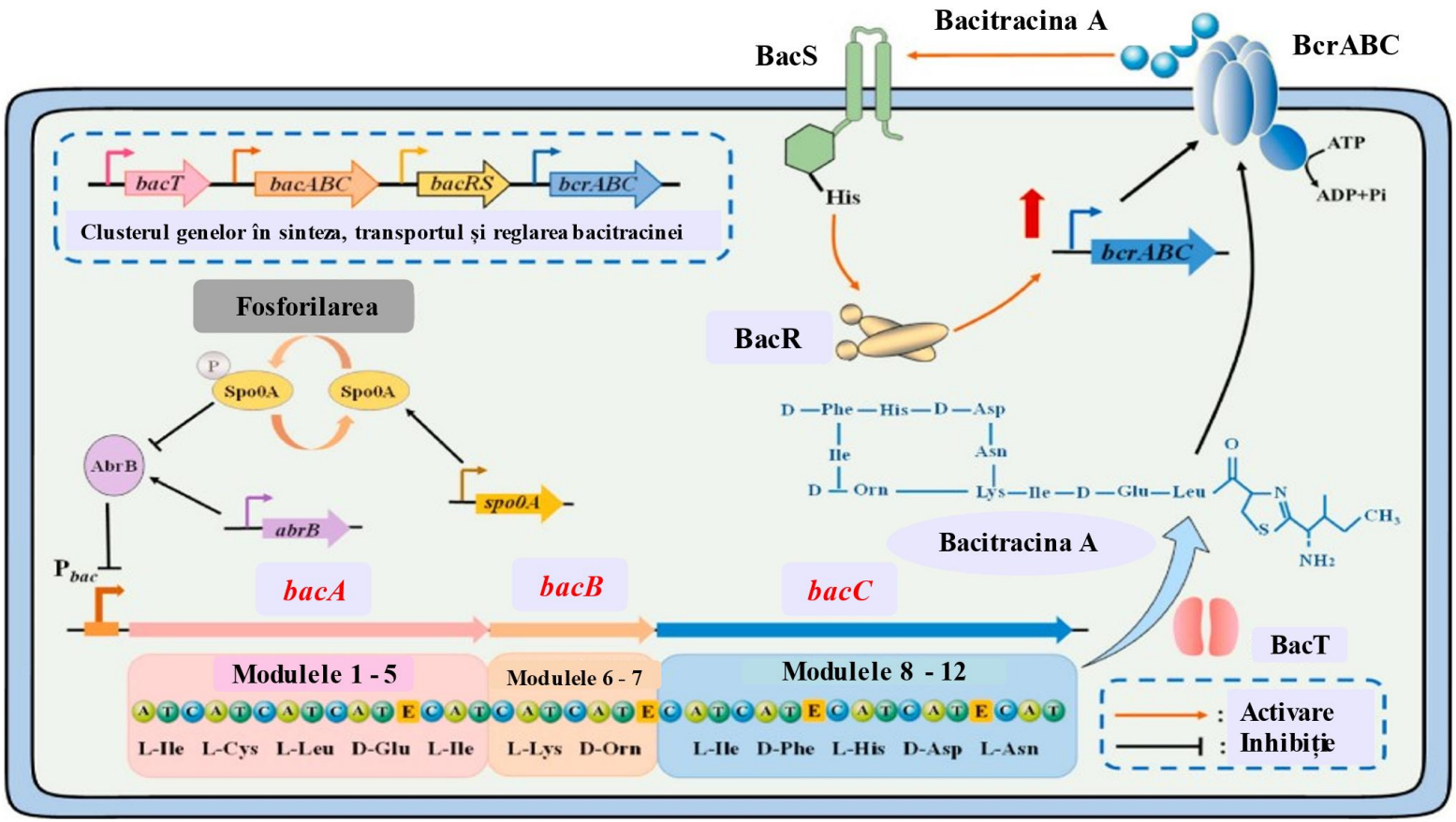


Figura A.5.12. Reprezentarea schematică a biosintezei, transportului și a rețelei de reglementare a bacitracinei A

bacABC – gena care codifică bacitracin sintetazele; bacT – gena care codifică tioesteraza de tip II; bacRS – gena care codifică un sistem de reglare cu două componente, compus dintr-un regulator de răspuns (BacR) și o kinază senzorială (BacS); bcrABC – gena care codifică legarea ATP-ului în caseta (ABC) a sistemului de transport al bacitracinei; spo0A – gena care codifică proteina A de sporulare din stadiul 0; abrB – codificarea pentru regulatorul global de transcripție AbrB.

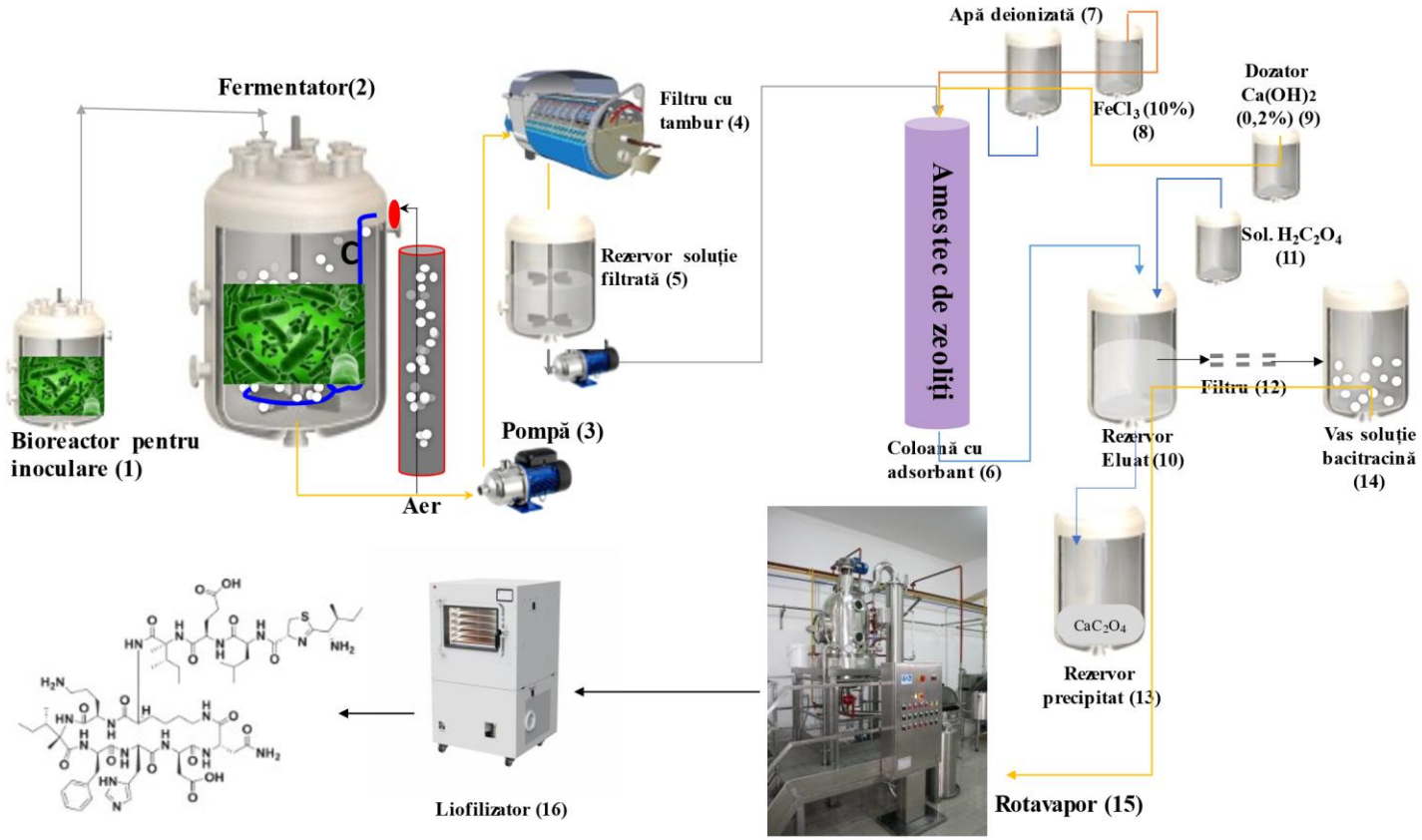


Figura A.5.13. Schema tehnologică de biosinteză, separare și purificare a bacitracinelor

Bioreactor pentru inoculare (1); fermentator (2); pompă (3); filtru cu tambur rotativ (4); rezervor soluție nativă filtrată (5); coloană cu amestec de zeoliți (6); dozator apă deionizată (7); dozator soluție $FeCl_3$ (10%) (8); dozator soluție $Ca(OH)_2$ (0,2%) (9); vas colector eluat cu bacitracină (10); dozator soluție $H_2C_2O_4$ (1,5%) (11); filtru cu membrană (12); vas colector precipitat CaC_2O_4; vas colector soluție bacitracină (14); rotavapor (15); liofilizator (16).

Tabelul A.5.5. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a bacitracinelor

Mediul	Componenți	Concentrație, g/L
de inoculare	Peptone	10,00
	glucoză	5,00
	extract de carne de vită	5,00
	NaCl	2,50
	$MgCl_2$	0,17
de fermentare	tărâța de grâu / coji de orez / floarea-soarelui / făină de soia / semințe de bumbac	45,00
	acid citric	1,00
	glucoză	0,50
	KH_2PO_4	0,50
	K_2HPO_4	0,50
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,01
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01

Tabelul A.5.6. Mecanisme de rezistență a bacteriilor la bacitracine

Mecanism de rezistență	Descriere
Modificarea locului țintă	Modificări ale moleculei C_{55}-izoprenil pirofosfat sau ale precursorilor de peptidoglican reduc legarea și inhibarea bacitracinei
Pompe de eflux	Transport activ al bacitracinei în afara celulei, reducând concentrația intracelulară
Permeabilitate redusă	Modificări ale peretelui celular sau ale membranei exterioare limitează intrarea bacitracinei
Producția de enzime de inactivare a bacitracinei	Enzimele specifice inactivează bacitracina prin hidroliză sau modificare
Modificări ale căilor de reglare	Modificări ale căilor care controlează sinteza peretelui celular ocolesc inhibarea bacitracinei
Mutații	Mutații ale proteinelor membranare scad afinitatea de legare a bacitracinei

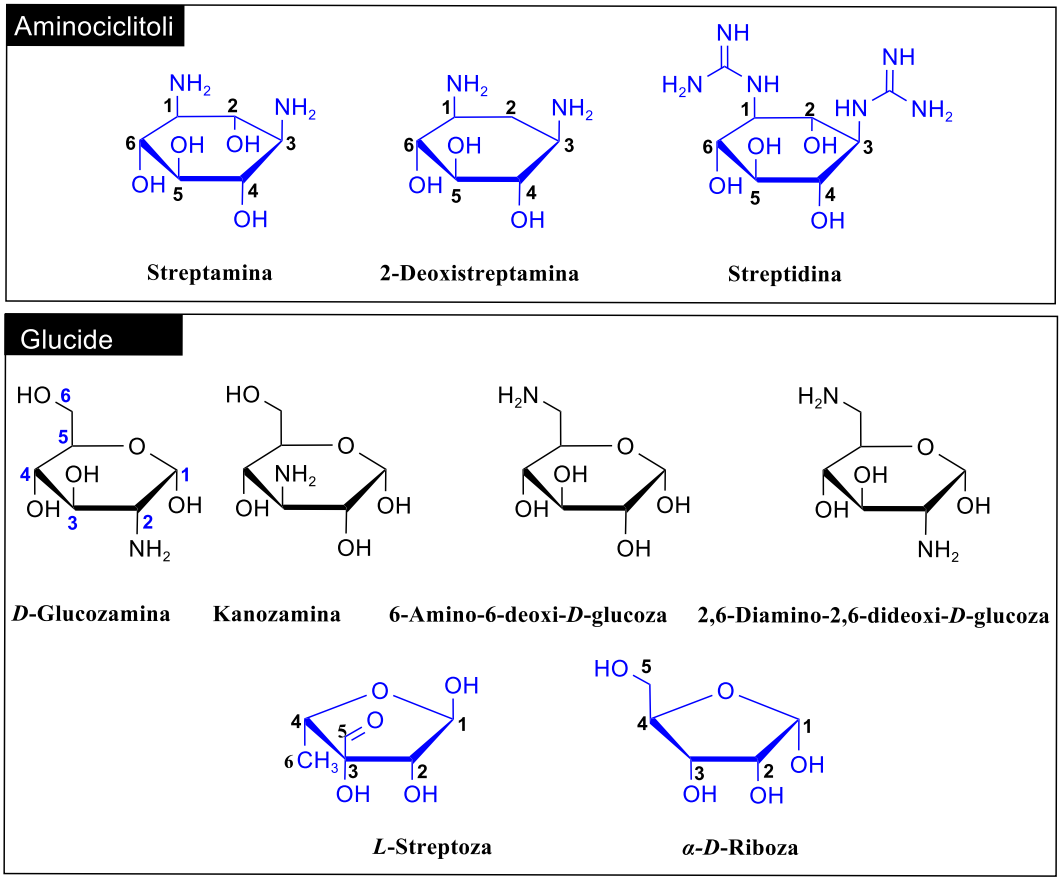


Figura A.6.1. Formulele de structură a aminociclitolilor și derivați ai glucidelor care intră în compoziția aminoglicozidelor

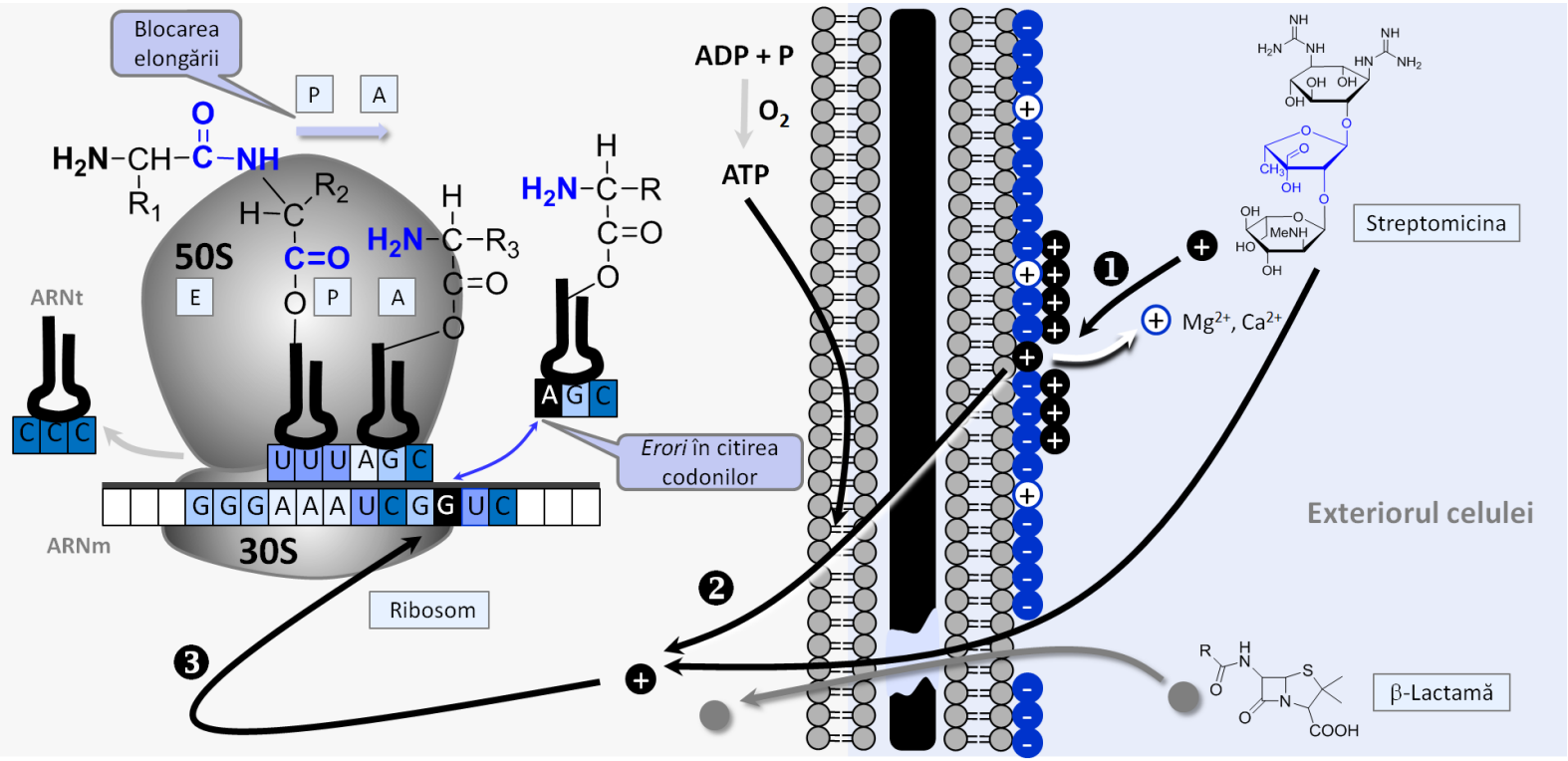


Figura A.6.2. Mecanismul de acțiune a aminoglicozidelor

Prima etapa presupune atracția electrostatică dintre aminoglicozide și lipopolizaharidele membranei externe a peretelui celular al bacteriilor G(-). În acest caz, aminoglicozidele substituie cationii metalelor bivalente din membrana externă care stabilizează stratul dublu lipidic și astfel penetrează membrana externă, ajungând în spațiul periplasmatic. Trecerea prin membrana internă (citoplasmatică) necesită suficientă energie (ATP) produsă în cadrul metabolismului aerob. Acest fapt explică de ce bacteriile anaerobe sunt rezistente la aminoglicozide. În celulă, aminoglicozidele se leagă de subunitatea 16S din unitatea 30S a ribozomilor în situsul acceptor (A). Astfel, antibioticul blochează, pe de o parte, procesul de elongare, transferul ARNt-peptidil din situsul A în P (peptidil) și, pe de altă parte, influențează precizia recunoașterii codon-anticodon, ceea ce determină biosinteza eronată de proteine. Centrele active care se leagă de ribozom sunt grupele amino C_1 și C_3 ale fragmentului deoxistreptaminic care stabilesc legături de hidrogen cu nucleotidele U^{1495} (U = uridin) și G^{1494} (G = guanozin), iar grupele hidroxil C_3 și C_4 stabilesc legături de hidrogen cu fragmentele fosfat ale nucleotidelor A^{1493} și A^{1492}.

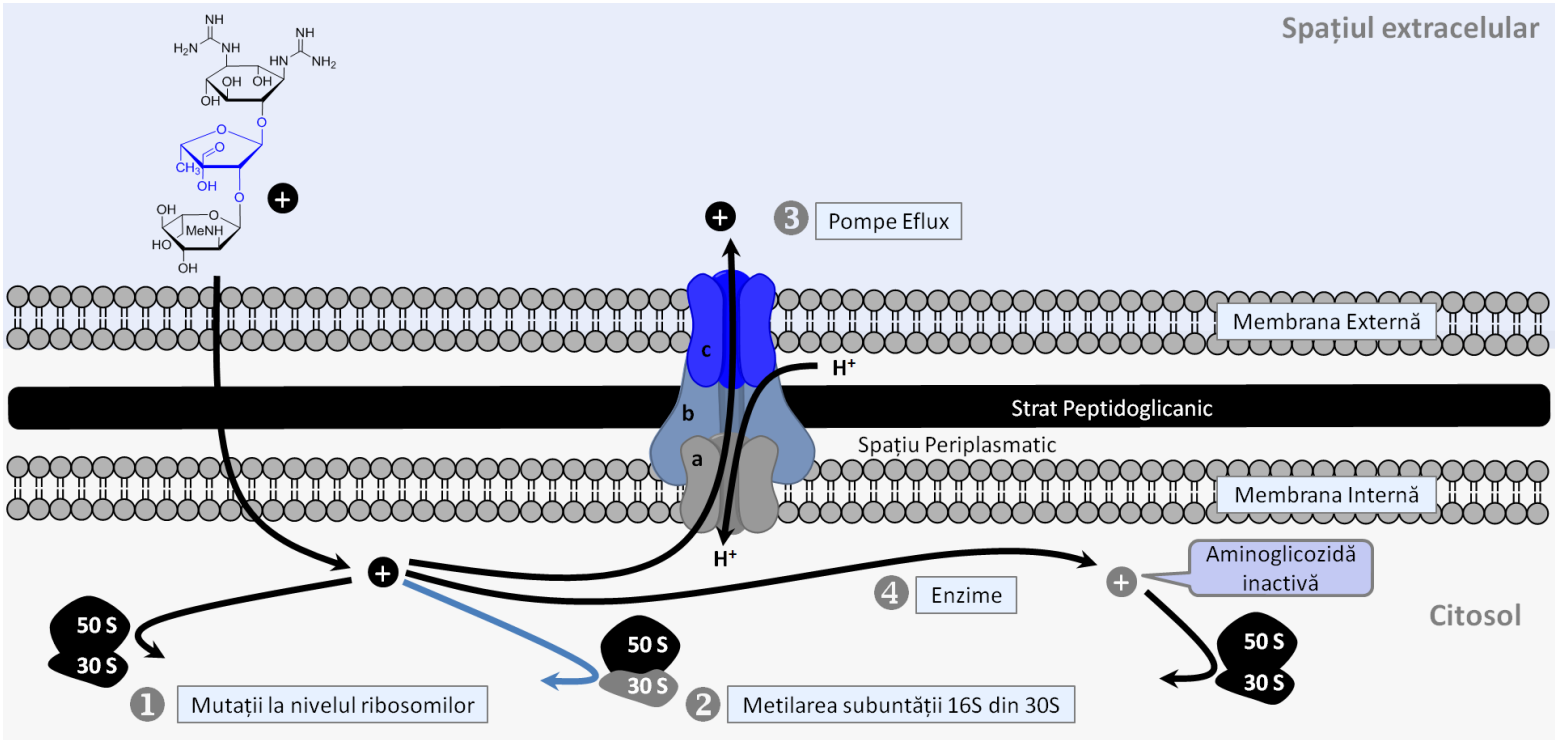


Figura A.6.3. Mecanismele schematice care explică rezistența bacteriilor la acțiunea aminoglicozidelor

Tabelul A.6.1. Mecanismele de rezistență a bacteriilor la aminoglicozide

Mecanism de rezistență	Descriere	Exemple de bacterii rezistente
Mutații la nivelul ribosomilor	Modificări genetice la nivelul genelor care codifică biosinteza componentelor ribozomale, reducând susceptibilitatea ribozomilor la aminoglicozide	*Mycobacterium tuberculosis* (mutații în gena ce codifică subunitatea 16S a unității 30S și proteina S12)
Metilarea subunității 16S din unitatea 30S	Metilarea nucleotidelor ribozomale sub acțiunea 16S ARNr metilazelor, împiedicând interacțiunea aminoglicozidelor cu ARNr	Metilarea N_7 a nucleotidelor G^{1405} → rezistență la gentamicină și amikacină; Metilarea N_1 a nucleotidelor A^{1408} → rezistență extinsă la neomicină și apramicină
Pompe de eflux	Transport activ al aminoglicozidelor în afara celulei prin sisteme de eflux formate din trei componente proteice: un por în membrana internă, un por în membrana externă și o componentă periplasmatică	Frecvent întâlnit la bacterii G(-)
Inactivarea enzimatică a aminoglicozidelor	Enzime codificate de genele plasmidice sau cromozomale modifică chimic aminoglicozidele, reducând afinitatea acestora pentru subunitatea 16S a ribozomilor. - **Acetiltransferaze** → acetilează grupele amino din structura aminoglicozidelor; - **Fosfotransferaze** → fosforilează grupările hidroxil; - **Adenoziltransferaze** → adenilează anumite poziții din structura aminoglicozidelor	Inactivare frecventă a kanamicinei A și a streptomicinei

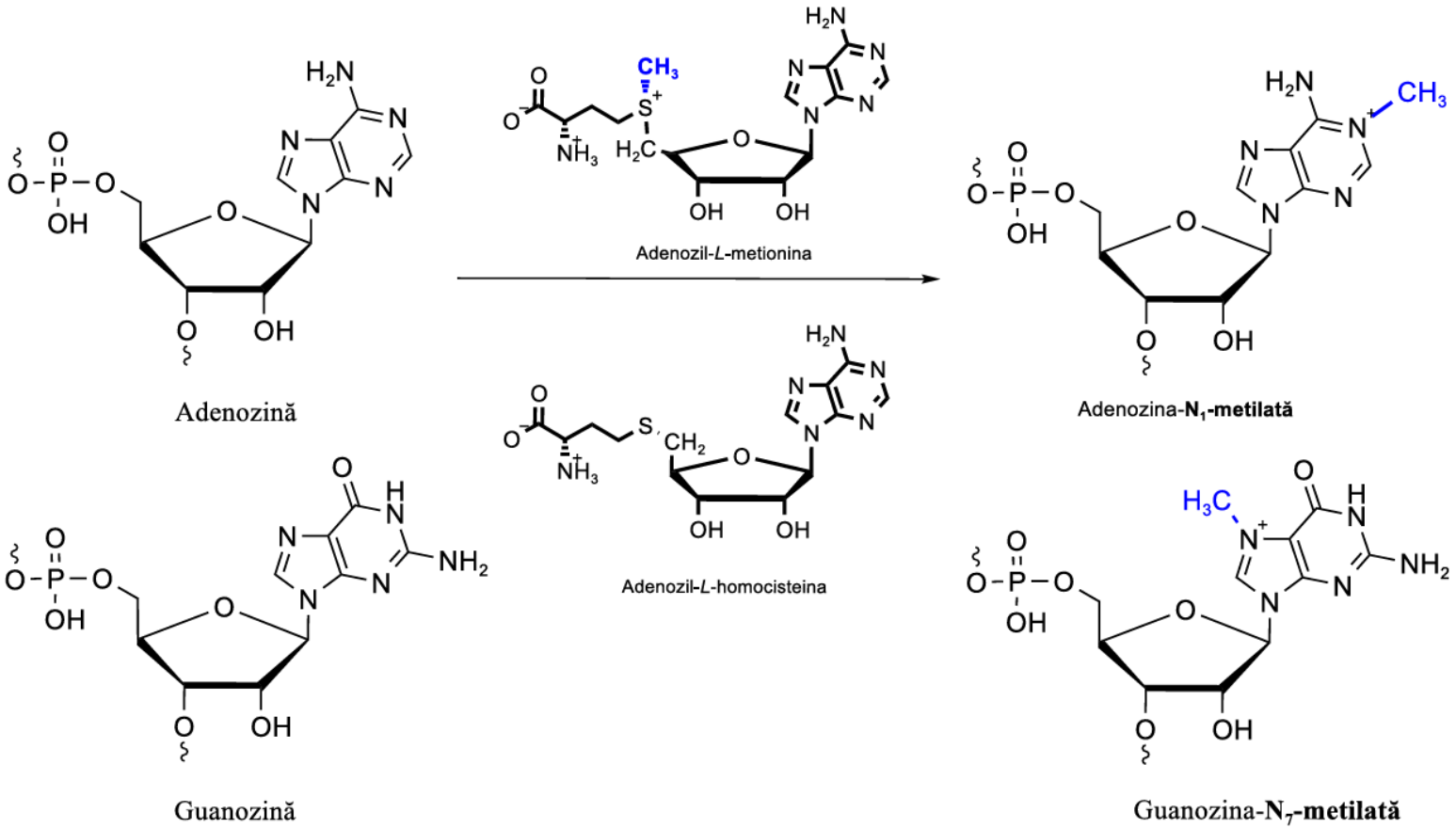


Figura A.6.4. Metilarea fragmentelor de adenozină și guanozină din ARNr

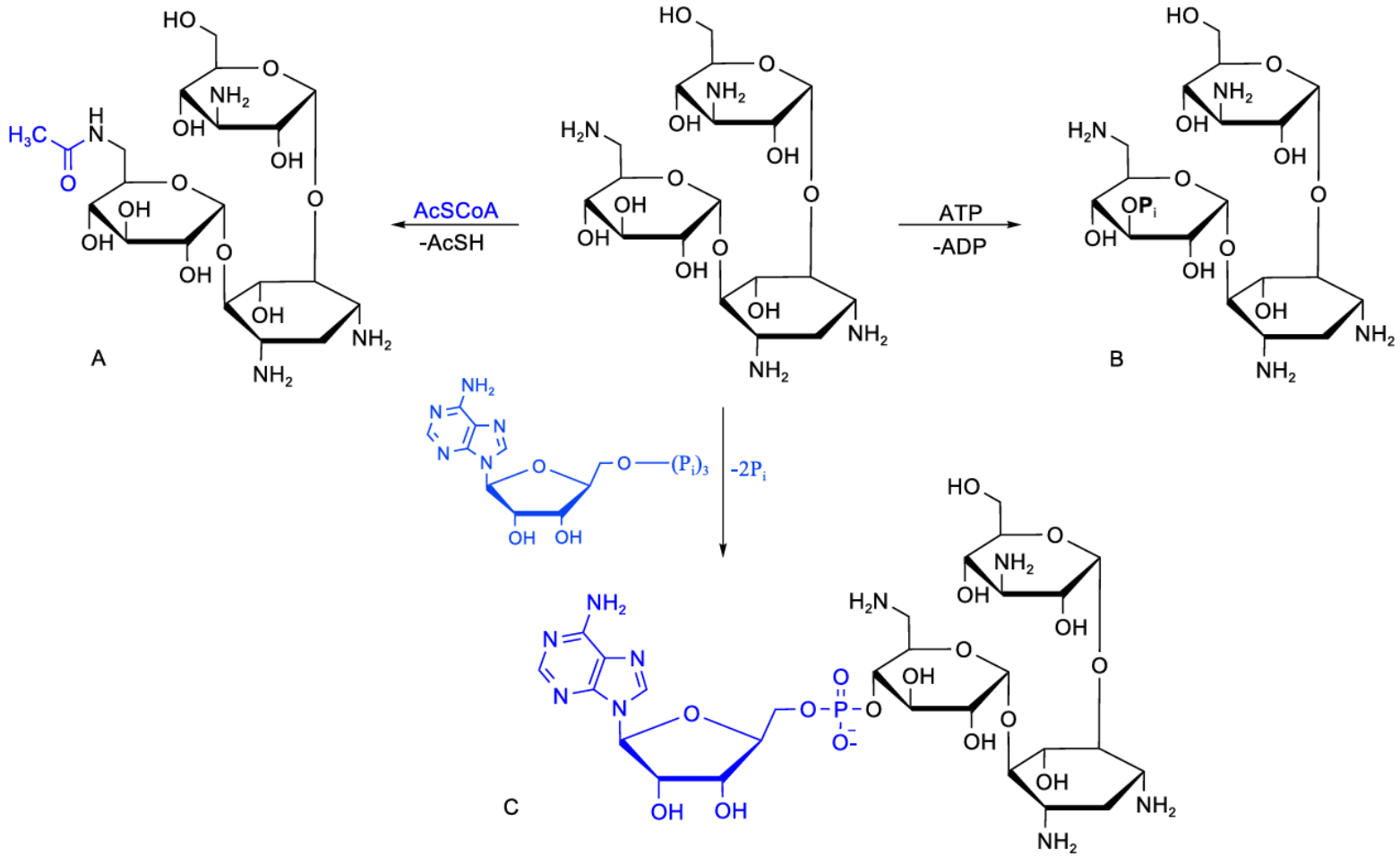


Figura A.6.5. Inactivarea enzimatică a kanamicinei A: acetilare (A), fosforilare (B) și adenilare (C)

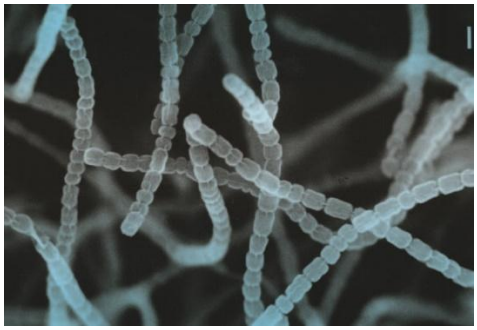


Figura A.6.6. Micrografia electronică a bacteriilor *Streptomices grizeus*

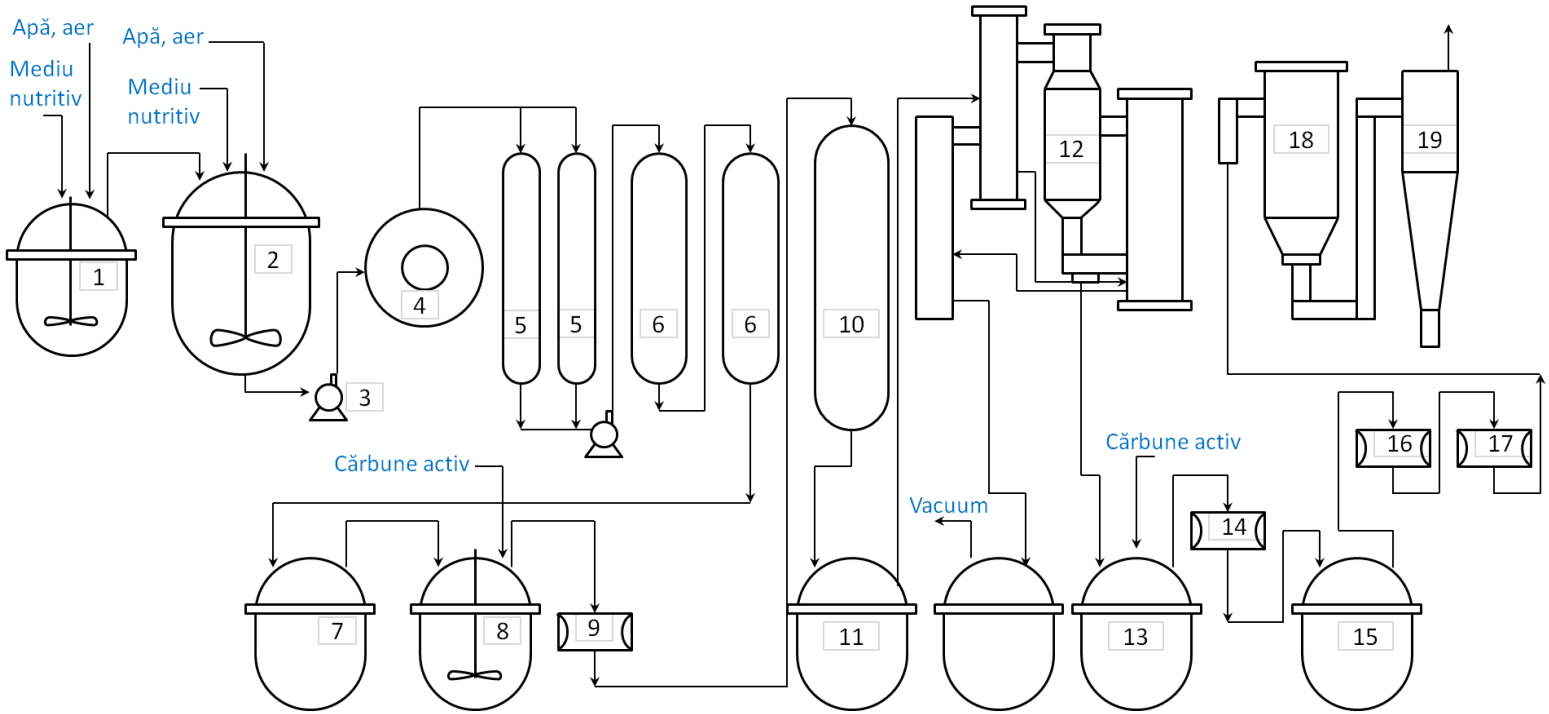


Figura A.6.7. Schema biotehnologică de producere a streptomicinei

*Bioreactor pentru inocul **(1)**, fermentator **(2)**, pompă **(3)**, filtru cu tambur rotativ **(4)**, coloane care conțin cationit de tip R-COONa **(5)**, coloană care conține anionit de tip R-NH_2 **(6)**, coloană care conține cationit de tip R-SO_3H **(6)**, vas colector **(7)**, vas decolorare cu CA **(8)**, filtru pentru filtrare sub presiune **(9)**, vas colector **(11)**, echipament pentru evaporare **(12)**, vas purificare **(13)**, filtru pentru filtrare sub presiune **(14)**, vas colector **(15)**, filtru **(16)**, filtru cu membrană **(17)**, atomizor **(18)**, ciclon **(19)**.*

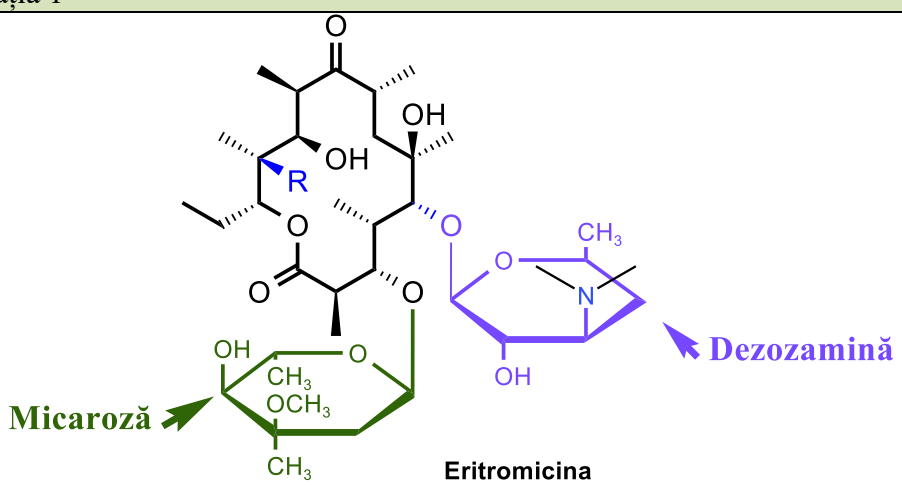
Tabelul A.6.2. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a streptomicinei

Mediul	Componenți	Conținutul,%
de inoculare	Agar-agar	1,500-2,000
de fermentare	Glucoză	20,000
	Hidrolizat de soia	2,000
	NaCl	0,200
	$(NH_4)_2SO_4$	5,000
	K_2HPO_4	0,200
	KNO_3	0,200
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005
	$CaCO_3$	0,020
	$FeSO_4$	0,001
	apă	72,374

ANEXA A.7

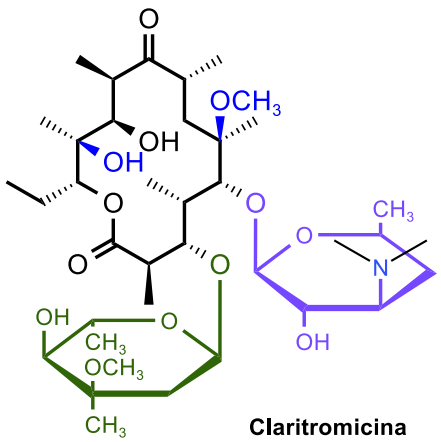
Tabelul A.7.1. Clasificarea formală a macrolidelor

Generația 1

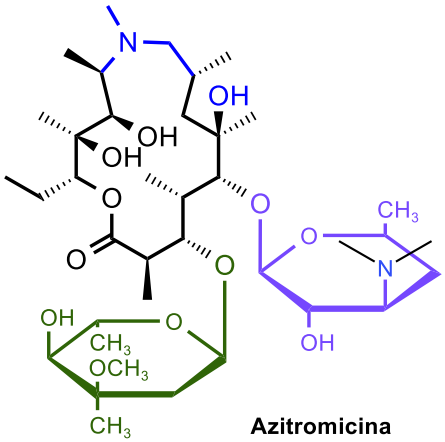


Eritromicina

Generația a 2[a]

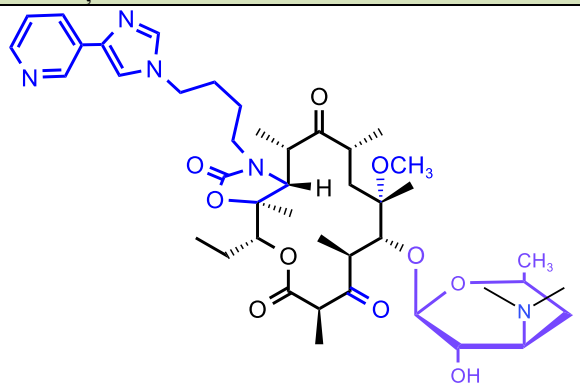


Claritromicina

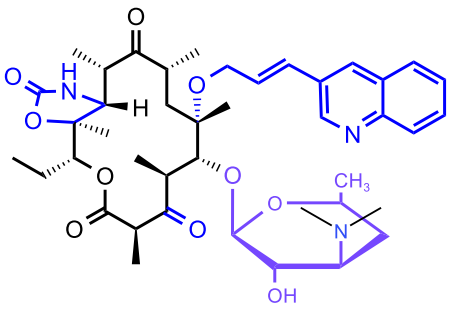


Azitromicina

Generația a 3[a]



Telitromicina



Cetromicina

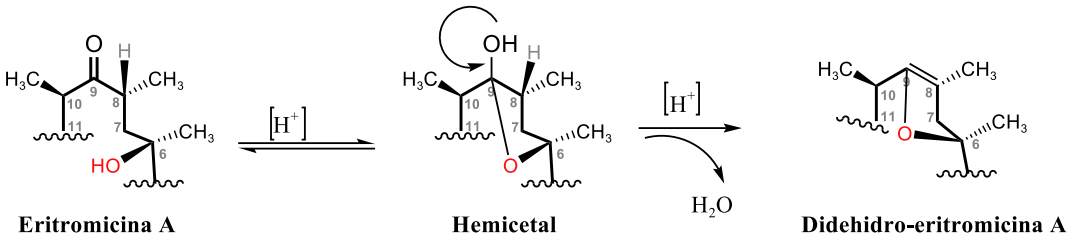


Figura A.7.1. Schema de inactivare a macrolidelor, pe exemplul eritromicinei A, în mediul acid

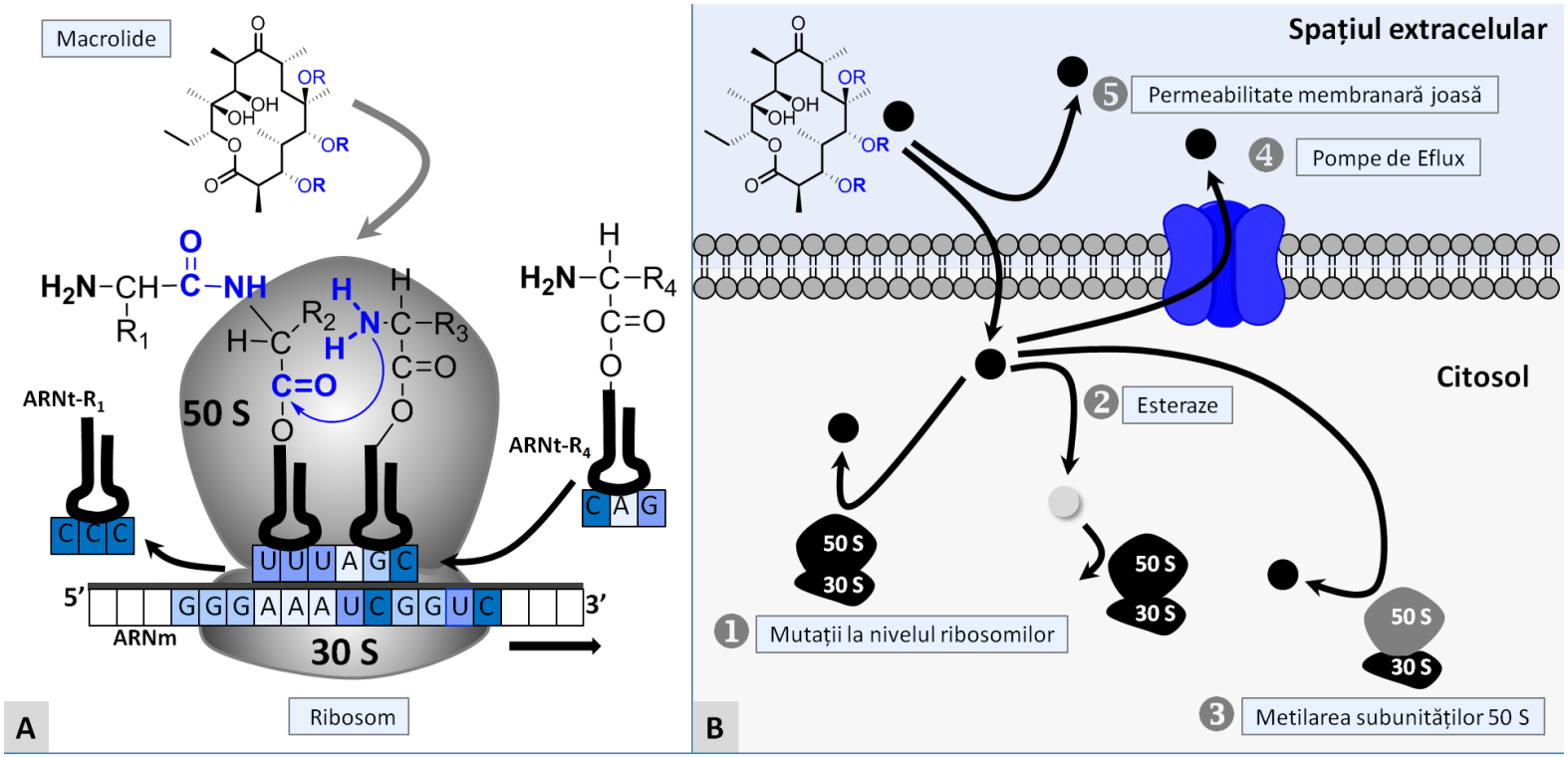


Figura A.7.2. A – Blocarea subunității ribosomale 50S de către macrolide (compartimentul peptidil), B – Mecanismele de dezvoltare a rezistenței la macrolide

1 – mutații la nivelul ribozomilor (rar); 2 – hidroliza enzimatică a grupei ester a macrolidelor și, deci, inactivarea acestora; 3 – metilarea subunității ribozomale 50S; 4 – efluxul macrolidelor; 5 – permeabilitatea membranară joasă față de macrolide a unor bacterii G(-).

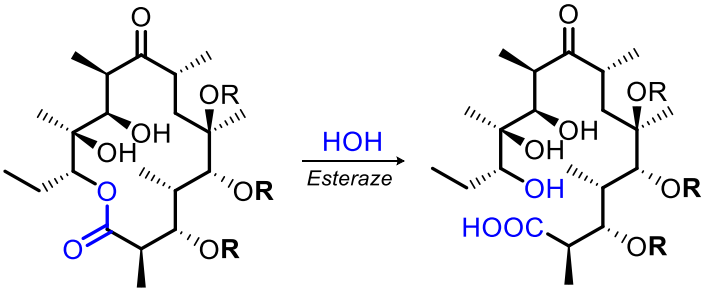


Figura A.7.3. Hidroliza macrolidelor sub acțiunea esterazelor

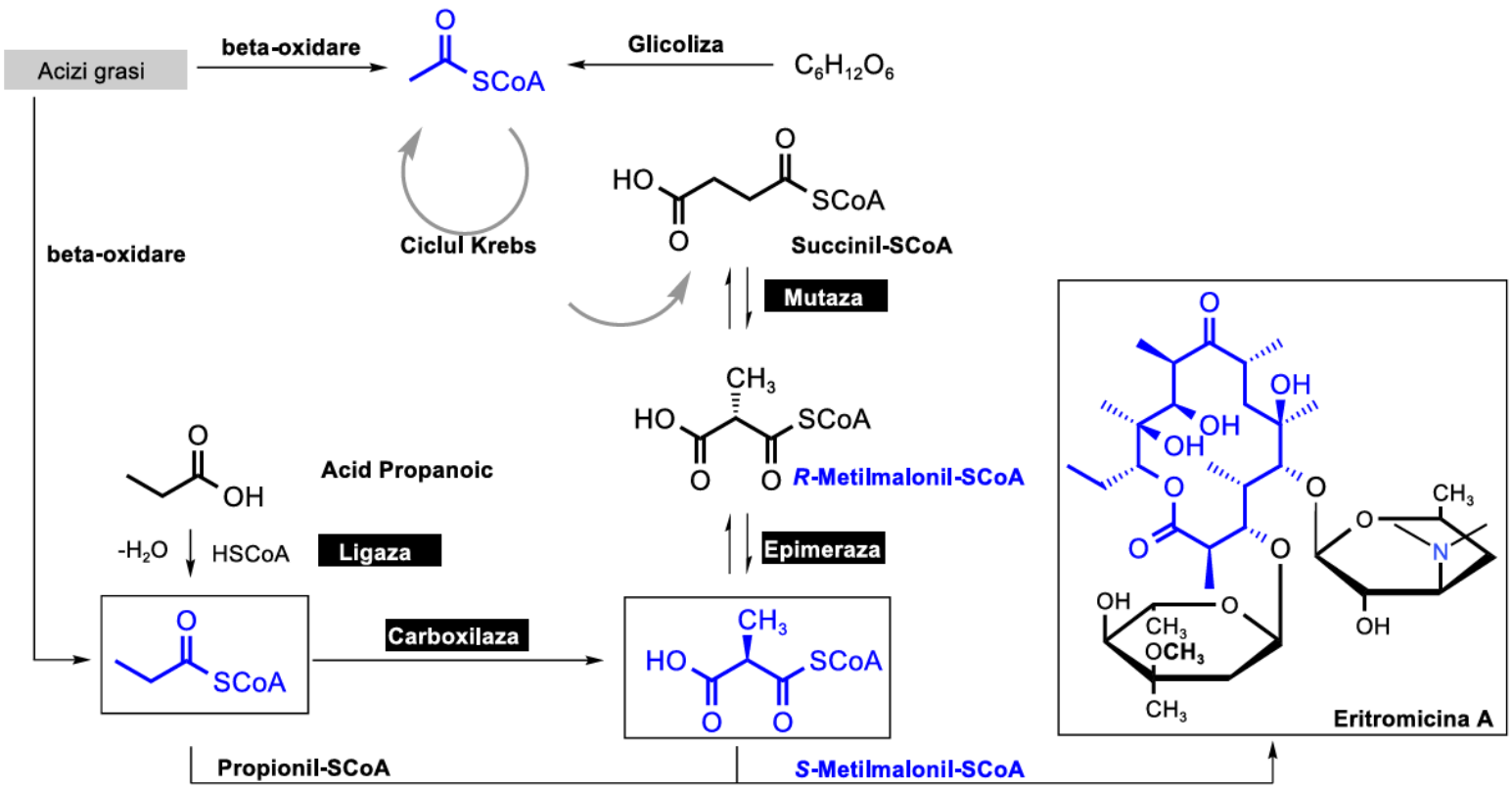


Figura A.7.4. Schema simplificată de biosinteză a eritromicinei A

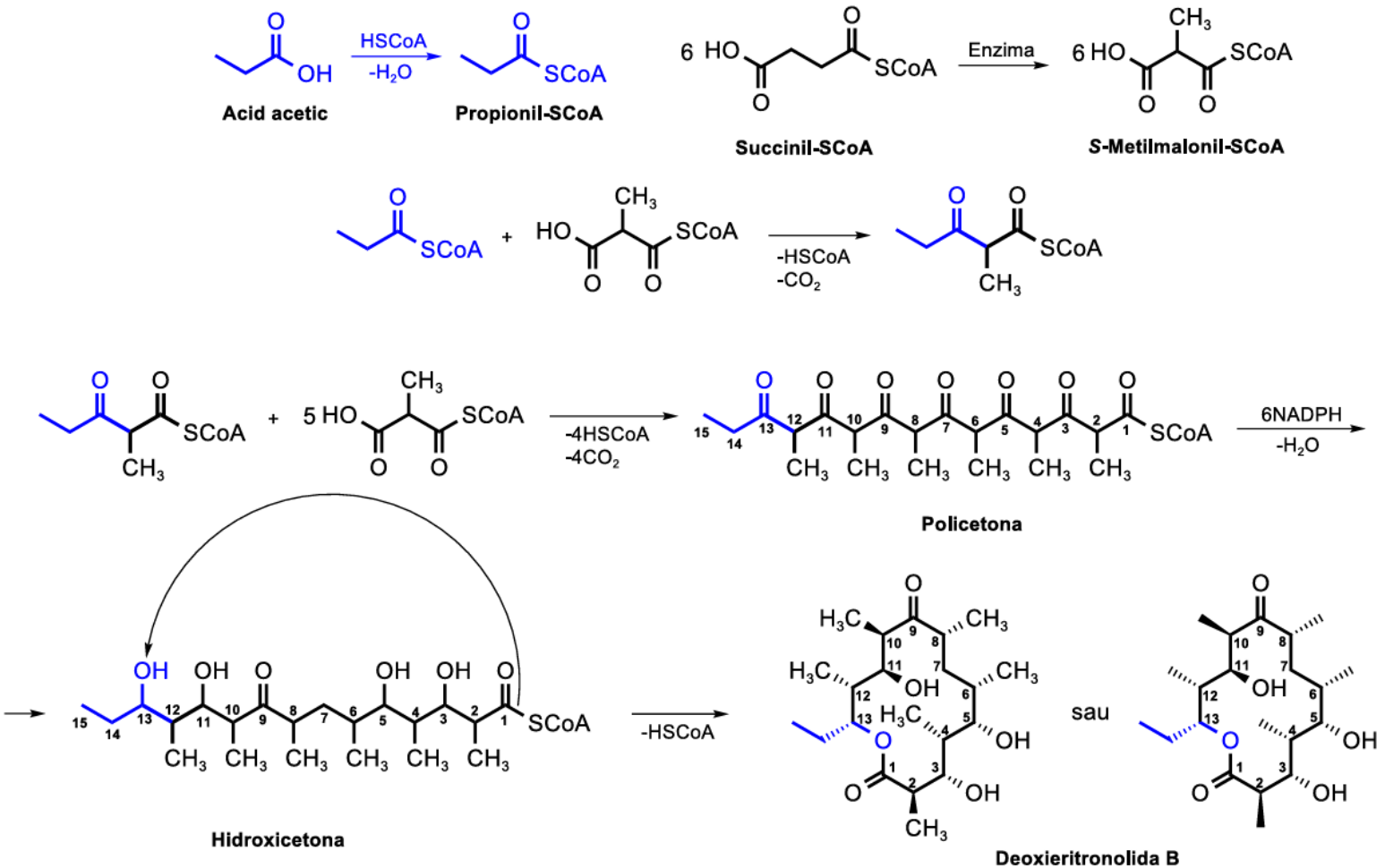


Figura A.7.5. Reacțiile de biosinteză a deoxieritronolidei B

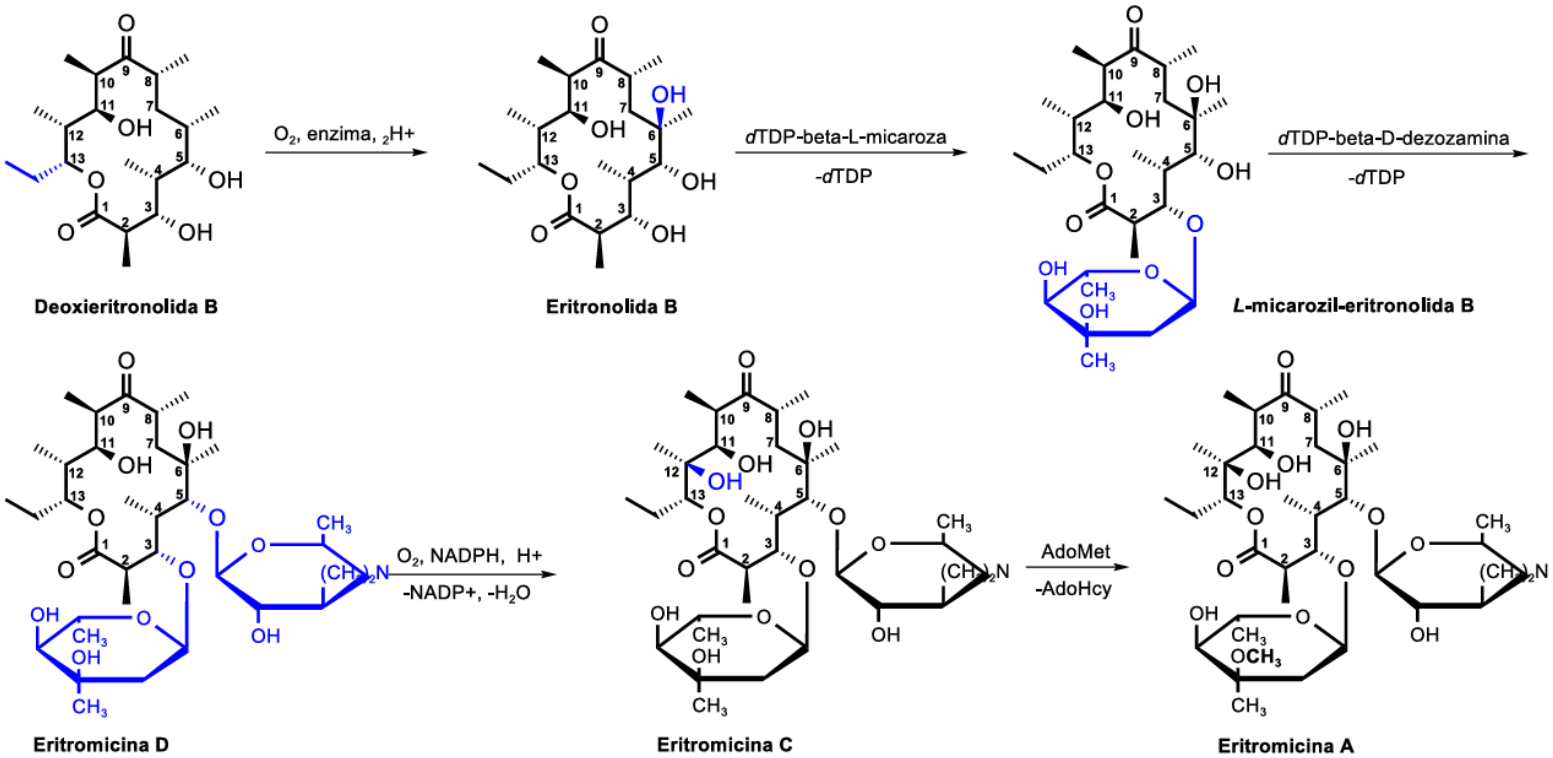


Figura A.7.6. Reacțiile de biosinteză a eritromicinei A

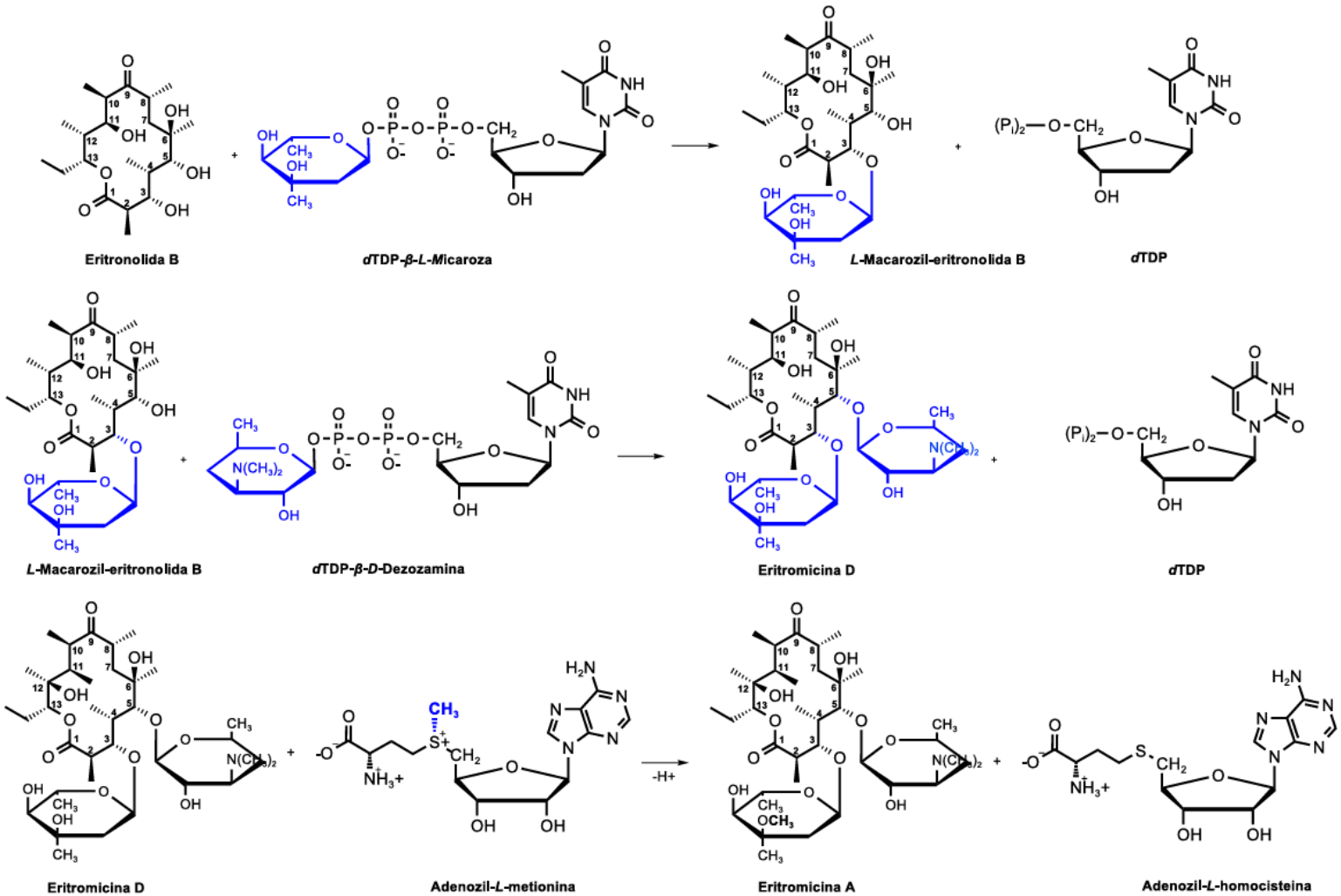


Figura A.7.7. Extensia reacțiilor de glicozilare și alchilare în biosinteza eritromicinei A

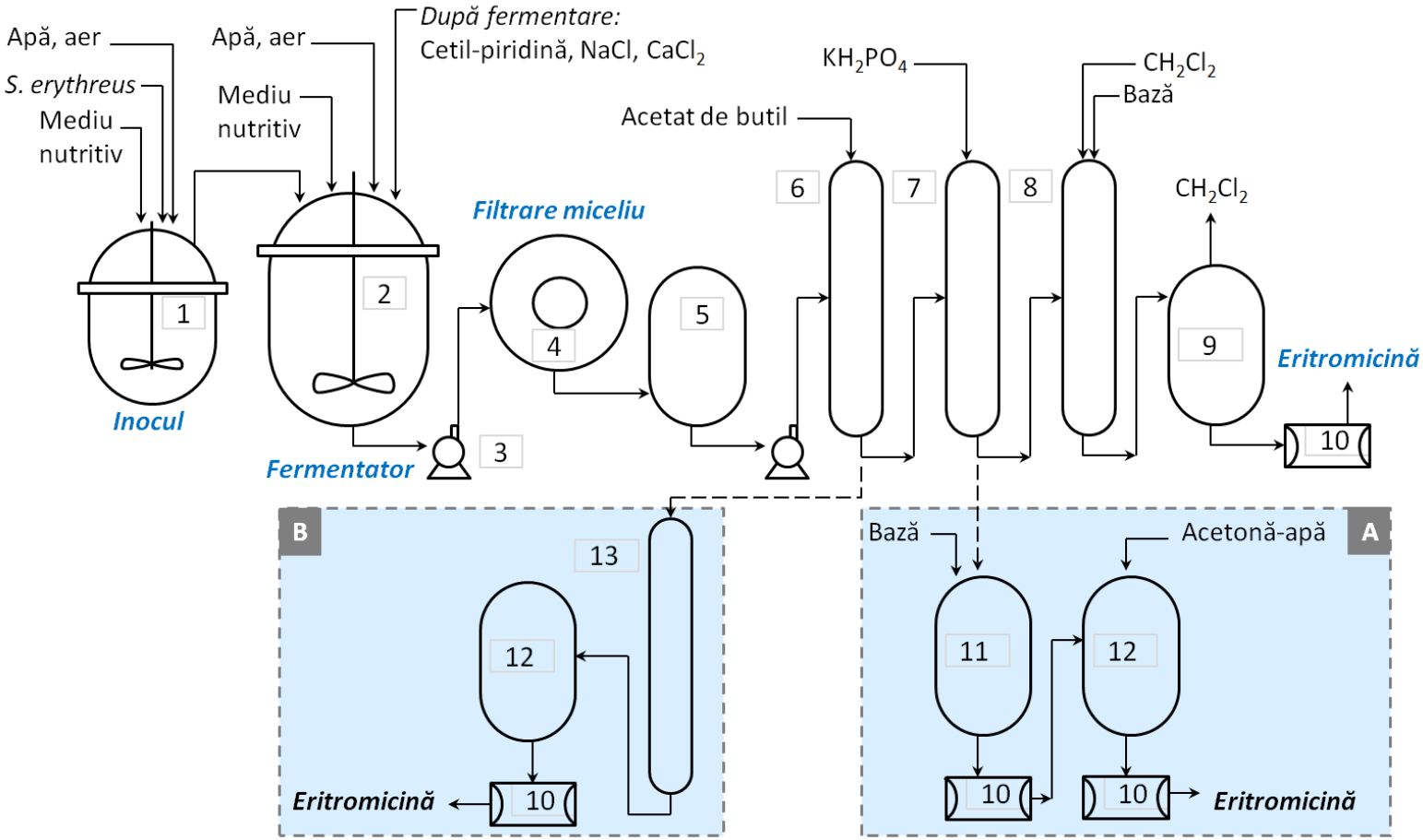


Figura A.7.8. Schema de producere a eritromicinei

Bioreactor inocul ***(1)****, fermentator* ***(2)****, pompă* ***(3)****, filtrare cu tambur* ***(4)****, rezervor filtrat* ***(5)****, extracție cu acetat de butil* ***(6)****, extracție soluție apoasă* KH_2PO_4 ***(7)****, extracție Bază/*CH_2Cl_2 ***(8)****, evaporare peliculară și cristalizare* ***(9)****, filtrare* ***(10)****. Separarea în cadrul altor procese:* ***A*** *– neutralizarea și precipitarea eritromicinei* ***(11)****, recristalizarea* ***(12)****;* ***B*** *– purificarea cromatografica* ***(13)*** *și recristalizarea* ***(12)****.*

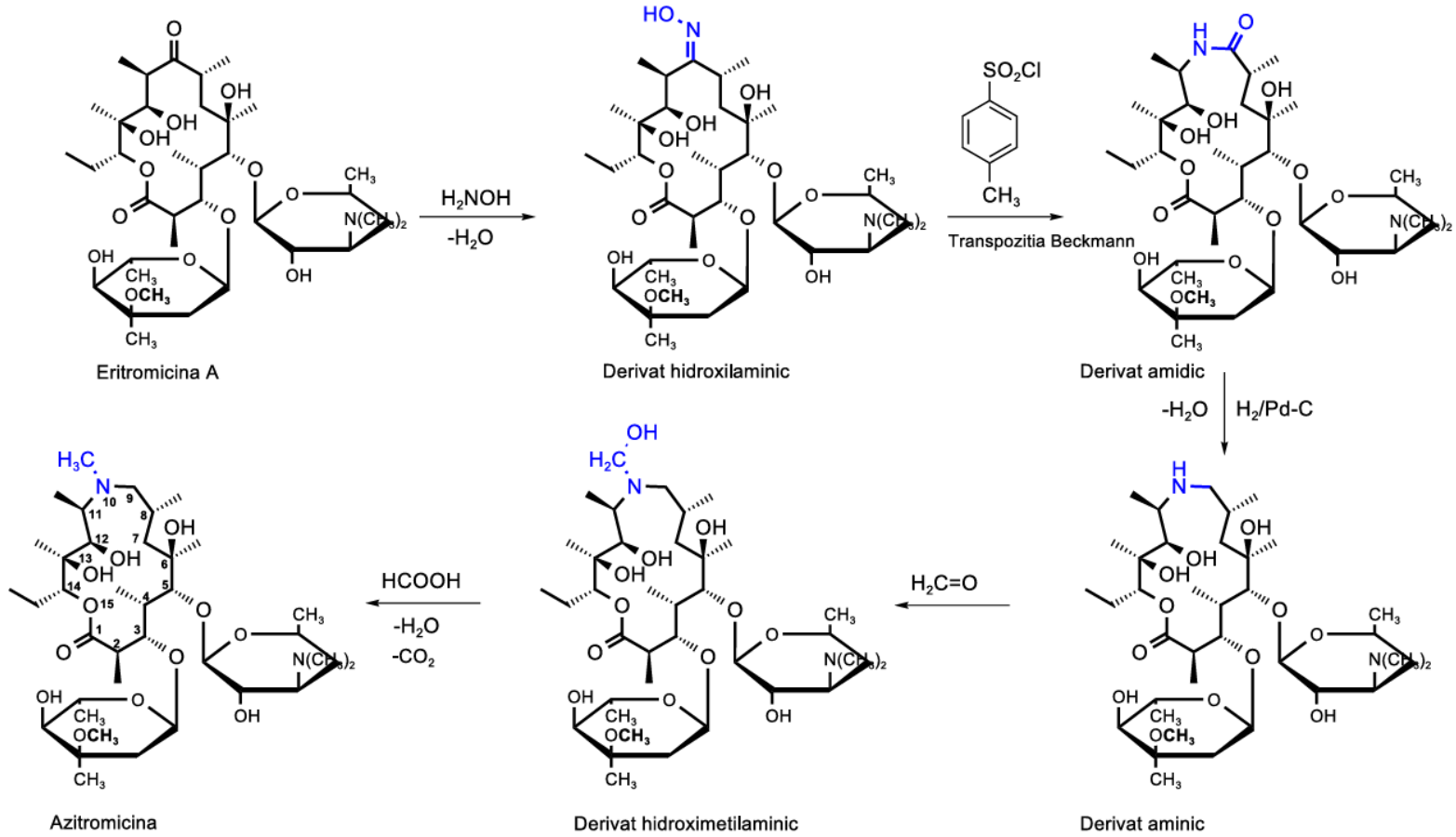


Figura A.7.9. Schema de sinteză a azitromicinei din eritromicina A

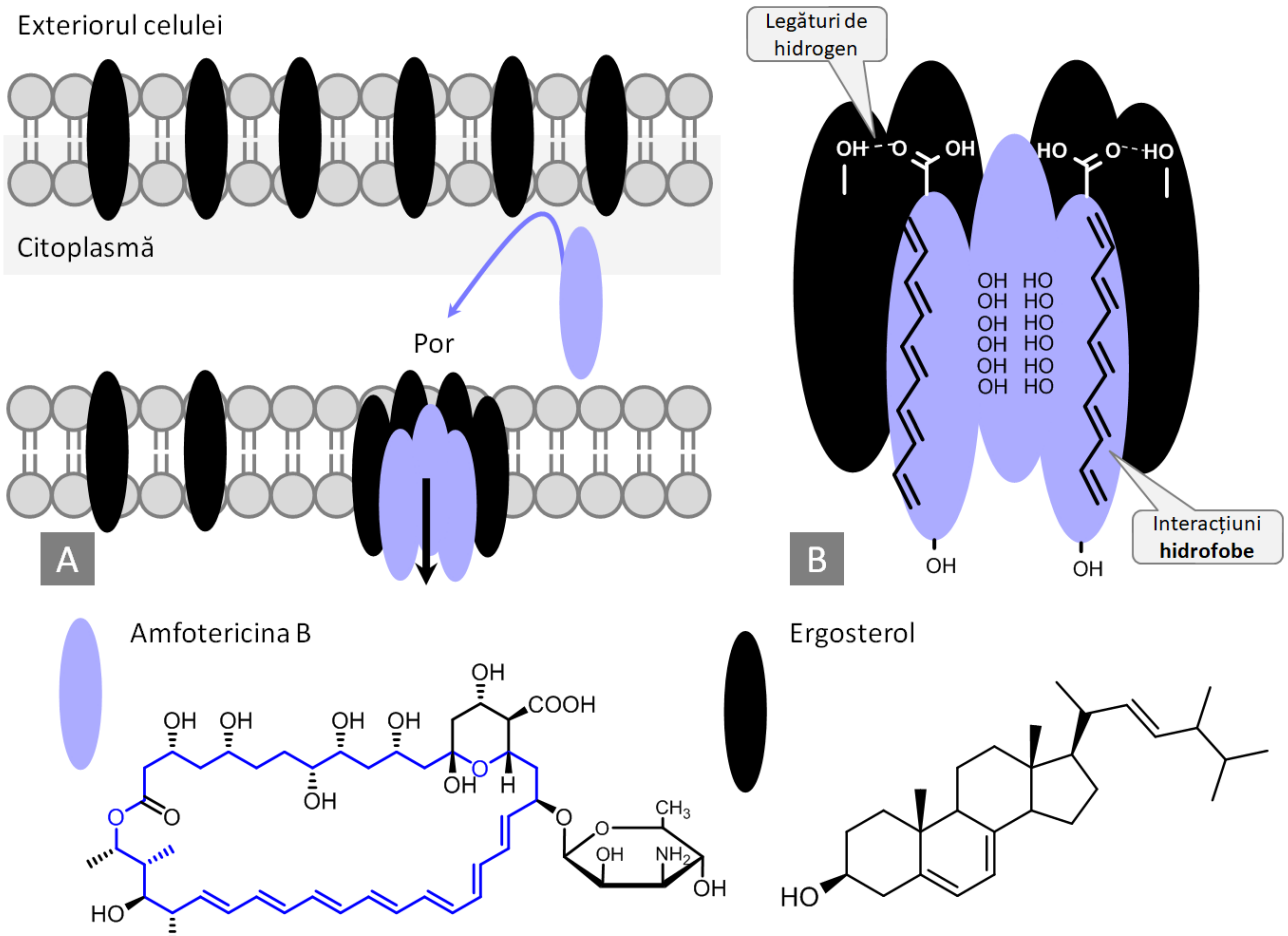


Figura A.7.10. Mecanismul schematic de acțiune a macrolidelor polienice

A – formarea complexului (por) între amfotericina B și ergosterol din biomembranele fungilor. B – complexul amfotericină B-ergosterol este stabilizat de interacțiunile hidrofobe stabilite între catena hidrocarbonat nesaturată a amfotericinei B și ergosterol și de legăturile intermoleculare de hidrogen dintre carboxilul antibioticului și hidroxilul ergosterolului.

Tabelul A.7.2. Mecanismele de acțiune a polienelor asupra fungilor

Mecanism de acțiune	Descriere
Legarea de ergosterol	Polienele se leagă de ergosterolul din membrana fungică, formând agregate care duc la crearea de pori transmembranari, destabilizând structura membranei.
Perturbarea integrității membranei	Formarea porilor determină pierderea ionilor esențiali (K^+, Na^+) și a metaboliților, crescând permeabilitatea membranei și afectând echilibrul osmotic, ceea ce duce la moartea celulei.
Deteriorarea funcțiilor membranei	Polienele afectează transportul transmembranar, activitatea enzimatică și căile de semnalizare celulară, compromițând funcțiile esențiale pentru supraviețuirea fungilor.
Toxicitate selectivă	Polienele au o afinitate mai mare pentru ergosterol decât pentru colesterolul din celulele animale, ceea ce permite o acțiune antifungică eficientă. Totuși, la doze mari, pot interacționa și cu colesterolul, provocând toxicitate umană.

Tabelul A.7.3. Mecanismele de rezistență a fungilor la poliene

Mecanism de rezistență	Descriere
Modificarea ergosterolului	Fungii pot înlocui ergosterolul cu alți steroli (ex., 24-metilen-dihidrolanosterol), reducând afinitatea de legare a polienelor. De asemenea, pot scădea cantitatea de ergosterol din membrană.
Modificări ale compoziției membranei celulare	Schimbările în compoziția lipidică, inclusiv creșterea fosfatidilinozitolului sau alterarea fluidității membranei, pot reduce interacțiunea polienelor cu ergosterolul.
Mecanisme de eflux îmbunătățite	Unii fungi utilizează pompe de eflux din familia transportoarelor ATP-binding cassette (ABC) pentru a elimina polienele din celulă, reducând astfel concentrația lor intracelulară.
Scăderea absorbției polienelor	Modificări în peretele celular, permeabilitatea membranei sau în proteinele de transport pot limita absorbția polienelor și acumularea lor în celulele fungice.
Mutații genetice	Mutațiile în genele care codifică enzime implicate în biosinteza ergosterolului pot altera structura sau sinteza acestuia, contribuind la rezistență.

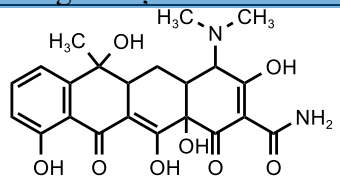
ANEXA 8

Tabelul A.8.1. Exemple de tetracicline în funcție de grupele funcționale atașate de inelele benzenice

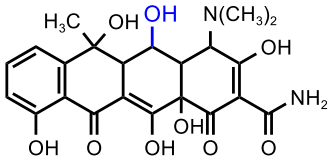
Tetracicline	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**
Clorotetraciclina	Cl	CH_3	OH	H
Oxitetraciclina	H	CH_3	OH	OH
Tetraciclina	H	CH_3	OH	H
Doxiciclina	H	CH_3	H	OH
Minociclina	$N(CH_3)_2$	H	H	H

Tabelul A.8.2. Clasificarea formală a tetraciclinelor

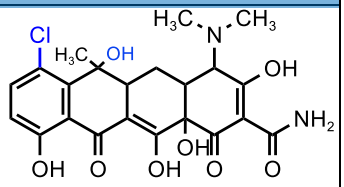
I-a generație



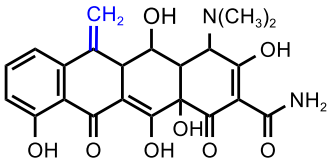
Tetraciclina



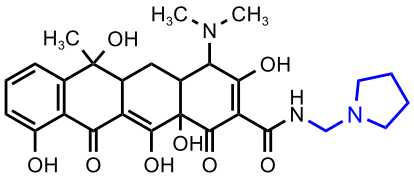
Oxitetraciclina



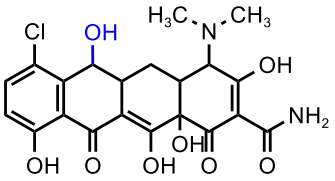
Cloroetraciclina



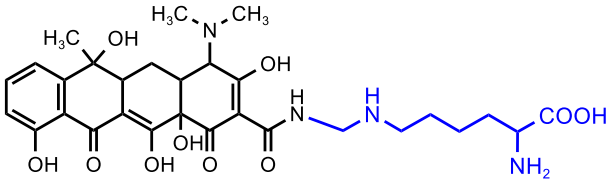
Metaciclina



Rolitetraciclina

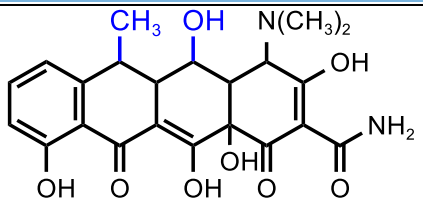


Demeclorciclina

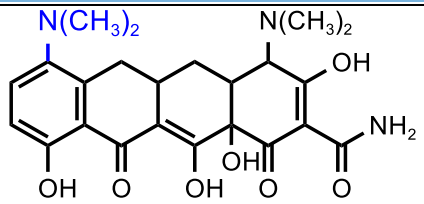


Limeciclina

A II-a generație

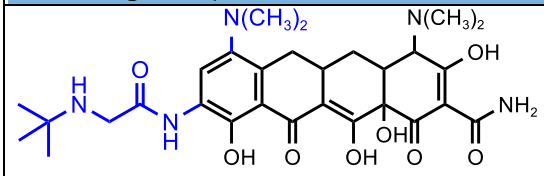


Doxiciclina

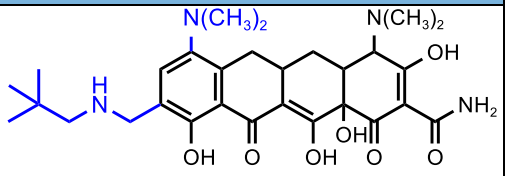


Minociclina

A III-a generație



Tigeciclina



Amadaciclina

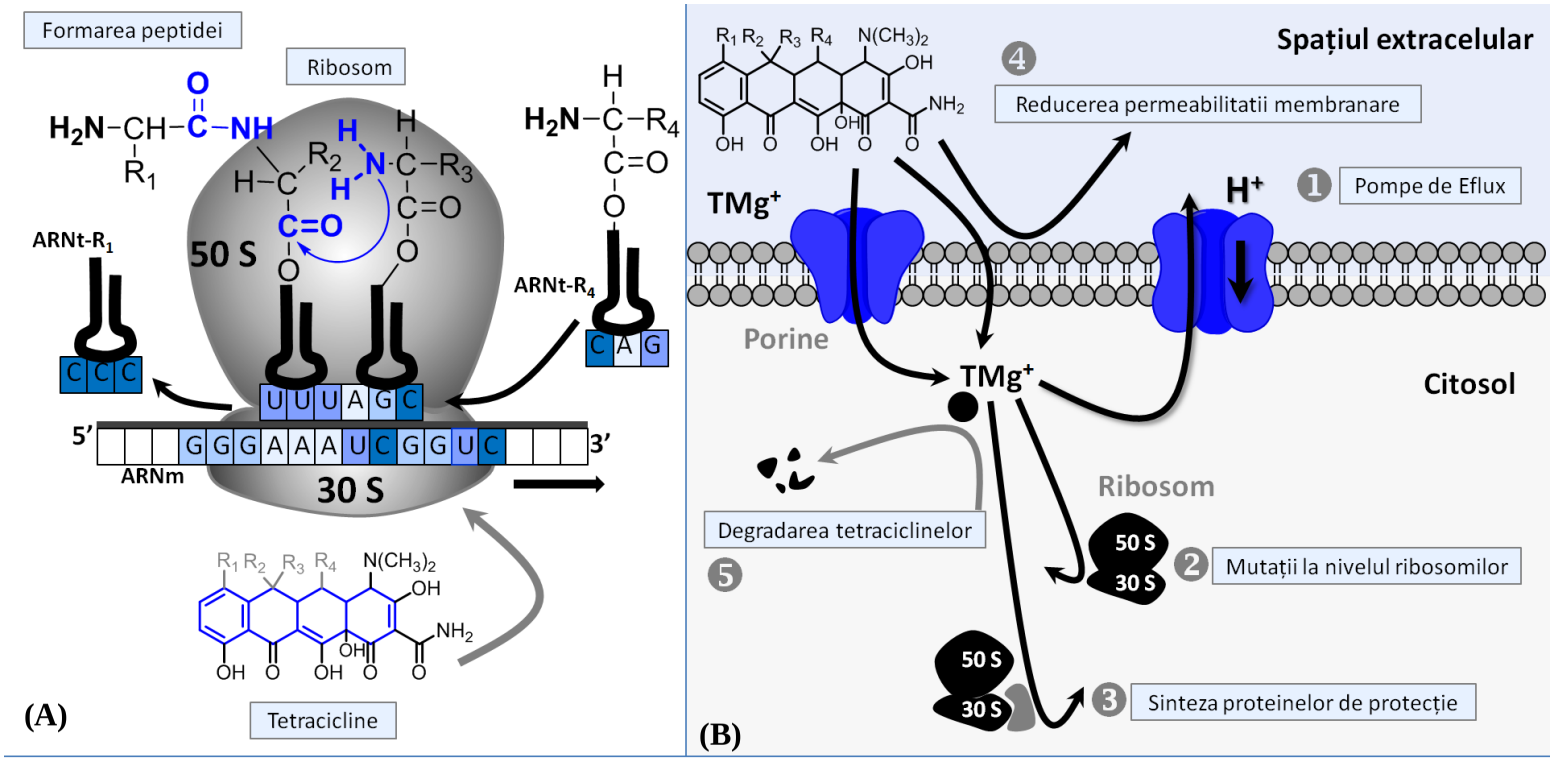


Figura A.8.1. A – Mecanismul de acțiune a tetraciclinelor asupra bacteriilor. B – Mecanismele prin care bacteriile pot dezvolta rezistență la tetracicline

Tabelul A.8.3. Mecanismele care explică rezistența unor bacterii la tetraciciline

Tipul mecanismului	Descrierea mecanismului
Pompe de Eflux	Pe această cale bacteriile micșorează cantitatea de tetraciclină intracelulară. Eliminarea tetraciclinei este cuplată cu intrarea protonilor: la fiecare moleculă de tetraciclină eliminată intră un proton.
Mutații la nivelul ribozomilor	Prin *mutații* la nivelul robozomilor are loc schimbarea ordinii aminoacizilor din zona de legare a tetraciclinelor, ceea ce determină apariția rezistenței la aceste antibiotice.
Sinteza proteinelor de protecție	În acest caz are loc producerea unor proteine citoplasmatice specifice care se vor lega cu tetraciclinele, prevenind astfel legarea tetraciclinelor de ribozomi.
Reducerea permeabilității membranare	Prin schimbări conformaționale la nivelul *porinelor* are loc diminuarea permeabilității acestora față de tetracicline.
Degradarea tetraciclinelor	În prezența unor enzime produse de bacterii are loc alterarea chimică a tetraciclinelor. Se obțin derivați inactivi.

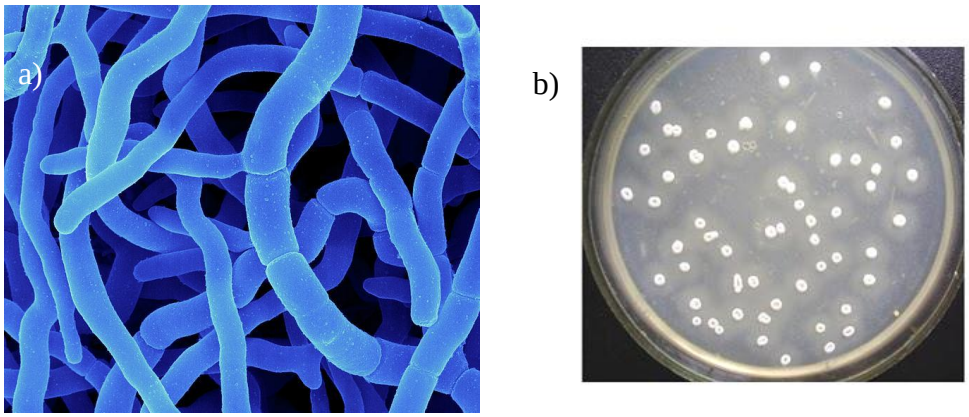


Figura A.8.2. Imaginea microscopică a tulpinilor de *Streptomyces:* *a – Streptomyces rimosus*, b – *Streptomyces aureofaciens*

Tabelul A.8.4. Compoziția mediului nutritiv în procesul de biosinteză a tetraciclinelor cu *Streptomyces*

Mediul	Componenți	Concentrație, g/L
de inoculare	Agar oxoid	**30,00**
	Zaharoză	3,00
	Dextrine	15,00
	Peptonă	5,00
	Extract din carne de vită	1,00
	Uree	0,10
	Extract de drojdie	2,00
	NaCl	0,50
	K_2HPO_4	0,50
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
	$FeSO_4$	0,01
	Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} (oligoelemente)	0,01
	Apă	până la un litru
de fermentare	Amidon	30,00
	Extract de porumb	15,00
	Extract de soia	10,00
	NaCl (producerea clorotetraciclinei)	10,00
	$CaCO_3$	5,00
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
	Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} (oligoelemente)	0,01
	Ulei de soia (antispumant)	2,00
	Apă	până la un litru

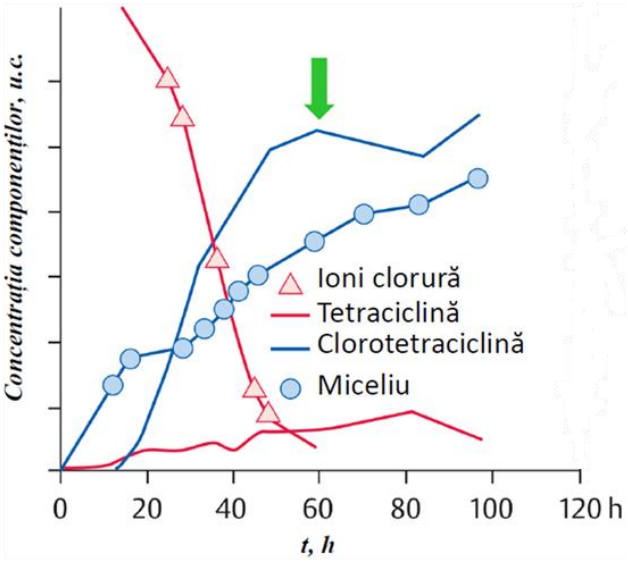
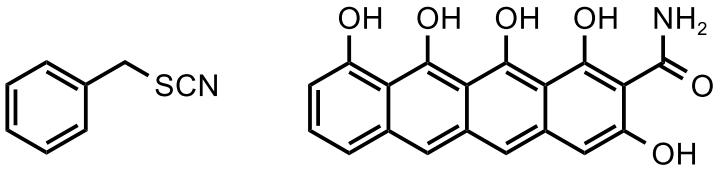


Figura A.8.3. Variația ionilor de clor, cloratetraciclinei, tetraciclinei și a miceliului (*Streptomyces rimosus*) în timpul procesului de fermentare

Odată cu formarea clorotetraciclinei se observă diminuarea conținutului ionilor de clor care se consumă pentru biosinteza antibioticului.



Benziltiocianat **Pretetramida**

Figura A.8.4. Formulele de structură a unor stimulatori organici folosiți în biosinteza tetraciclinelor

ANEXA A.9

Tabelul A.9.1. Clasificarea proteinelor recombinante în funcție de generație

Generație	Categorie	Exemple	Aplicație clinică	Caracteristici specifice	Anul aprobării
I	Hormoni recombinanți	*Insulina umană recombinantă*	Tratamentul diabetului	Structură nativă identică proteinei naturale	1982
		Hormonul de creștere uman (hGH)	Tratamentul nanismului hipofizar	Stimulează creșterea și dezvoltarea oaselor și țesuturilor	1985
		Eritropoetina	Tratamentul anemiei asociate insuficienței renale și chimioterapiei	Crește producția de eritrocite	1989
		Gonadotropina corionică umană	Tratamentul infertilității	Structură similară hormonului natural	1988
	Factori de coagulare	*Factor VIII recombinant*	Tratamentul hemofiliei A	Rol în cascada coagulării	1992
		Factor IX recombinant	Tratamentul hemofiliei B	Rol în cascada coagulării	1997
	Interferoni	*Interferonul α-2a/b*	Tratamentul hepatitei B și C, al leucemiei	Activitate antivirală și antiproliferativă	1986
		Interferonul γ-1b	Tratamentul bolii granulomatoase cronice	Crește activitatea fagocitară	1990
		Interferonul β-1a	Tratamentul sclerozei multiple	Reduce inflamația și activitatea imună	1993
		Interferonul β-1b	Tratamentul sclerozei multiple	Reduce inflamația și daunele mielinei	1993
	Citokine	*Interleukina-2 (IL-2)*	Tratamentul cancerului renal și al melanomului metastazat	Stimulează activitatea celulelor T și NK	1992

	Trombolitice	*Activator tisular de plasminogen (tPA)*	Dizolvarea cheagurilor de sânge în infarct miocardic sau AVC	Catalizează descompunerea cheagurilor de fibrină din sânge	1987
	Enzime	*Tripsina*	Utilizată în digestia proteică și îngrijirea rănilor	Structură naturală	1980
		Chimotripsina	Tratamentul inflamației și îmbunătățirea digestiei	Structură naturală	1980
		Pepsina	Tratamentul deficiențelor digestive	Structură naturală	1980
		Streptokinaza	Trombolitic pentru dizolvarea cheagurilor de sânge	Structură nativă, fără modificări	1982
		Dornaza α	Tratamentul fibrozei chistice	Descompune ADN-ul din mucus, facilitând expectorația	1993
	Factori de creștere	*Filgrastim*	Tratamentul neutropeniei asociate chimioterapiei	Stimulează formarea celulelor albe	1991
II	Hormoni	*Insulina glargină*	Tratamentul diabetului (acțiune prelungită)	Proprietăți farmacocinetice optimizate	2000
	Interferoni	*Peginterferonul α*	Tratamentul hepatitei C	Stabilizare și creșterea timpului de înjumătățire prin pegilare	2001
	Factori de coagulare	*Factor VIII cu timp de înjumătățire extins*	Tratamentul hemofiliei A	Biodistribuție și specificitate îmbunătățite	2014
	Citokine	*Interleukina-2 modificată*	Tratamentul cancerului	Specificitate crescută pentru celulele-țintă	2008

	Anticorpi monoclonali	*Rituximab*	Tratamentul limfomului non-Hodgkin și al leucemiei limfocitare cronice	Modificat pentru activitate citotoxică dependentă de anticorpi	1997
		Trastuzumab	Tratamentul cancerului mamar HER2-pozitiv	Inhibă receptorul HER2	1998
		Adalimumab	Tratamentul artritei reumatoide și al bolii Crohn	Blochează TNF-α	2002
		Bevacizumab	Tratamentul cancerului colorectal, pulmonar și al retinopatiei diabetice	Blocant VEGF, inhibă angiogeneza	2004
		Ranibizumab	Tratamentul degenerescenței maculare umede	Inhibitor VEGF, reduce permeabilitatea vasculară	2006
III	Anticorpi monoclonali	*Anticorpi bispecifici (Blinatumomab)*	Tratamentul leucemiei limfoblastice acute	Terapii avansate, eficiență crescută	2014
		Atezolizumab	Tratamentul cancerului (inhibă PD-L1, utilizează sistemul imun pentru combaterea tumorilor)	Îmbunătățirea eficienței tratamentului prin strategii de targetare a imunologiei	2016
		Durvalumab	Tratamentul cancerului (inhibă PD-L1, îmbunătățește răspunsul imun)	Modificări pentru a spori eficiența și siguranța în tratamentele anticancerigene	2017
	Proteine de fuziune	*Etanercept*	Tratamentul artritei reumatoide	Noi căi de administrare și formulări inovative	1998
	Enzime	*Elosulfase α*	Tratamentul mucopolizaharidozei tip IV (sindromul Morquio A)	Enzimă recombinantă care ajută la digestia carbohidraților în afecțiuni rare	2014

		PEG(-)adenozin deaminaza	Tratamentul bolilor rare (imunodeficiență SCID)	Formulare avansată cu siguranță sporită	2018
	Factori trombolitici	*Tenecteplază*	Dizolvarea cheagurilor de sânge în infarct miocardic	Specificitate crescută pentru fibrină și siguranță îmbunătățită	2000
	Proteine și nanoparticule	*Talimogene laherparepvec*	Terapie oncologică (utilizează virusuri modificate genetic pentru a distruge celulele tumorale)	Combină proteine recombinante și terapii virale pentru tratamente de ultimă generație	2015
	Administrare inovativă	*Emicizumab*	Tratamentul hemofiliei A (utilizează anticorpul pentru a restabili coagularea sângelui)	Anticorp cu o structură modificată care acționează în mod inovativ asupra factorilor de coagulare	2017

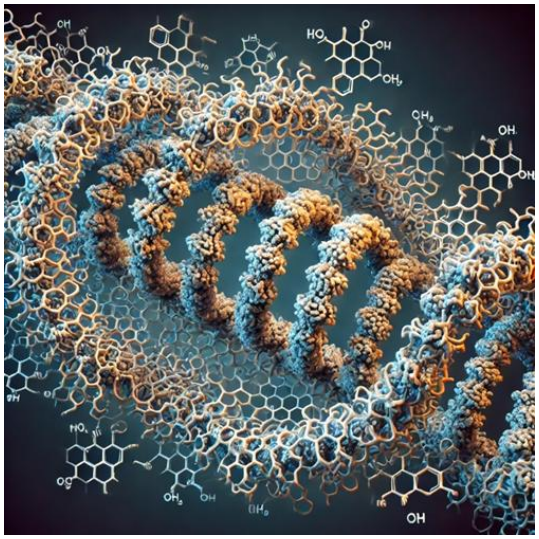


Figura A.9.1. Structura chimică grafică a colagenului recombinant

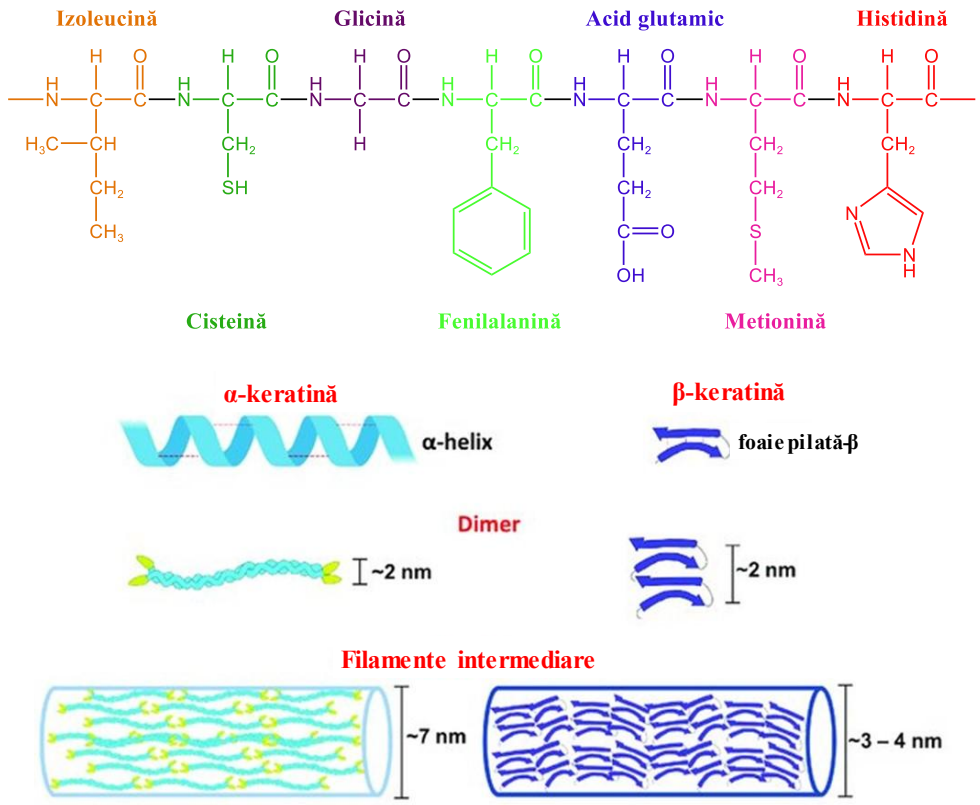
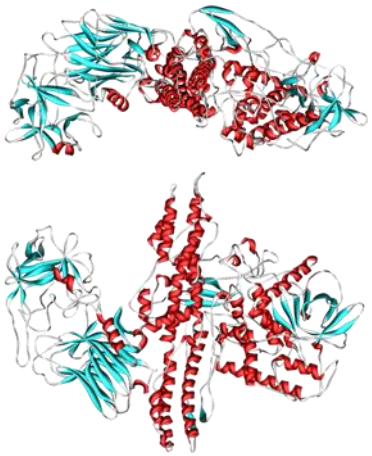
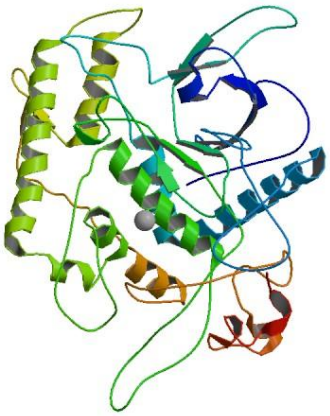


Figura A.9.2. Diagrama celor patru secvențe structurale ale cheratinei

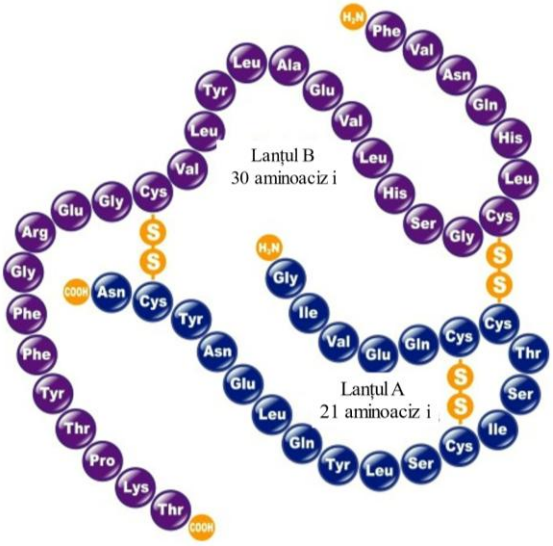
Secvența primară a cheratinei, care include cei mai des întâlniți aminoacizi (aminoacizii sunt configurați în formă L, dar stereochimia nu este prezentată). Secvența secundară a cheratinelor poate fi fie o α-helix, fie o foaie pilată β, clasificându-le în α-cheratine și, respectiv, β-cheratine. Secvența terțiară a ambelor tipuri de cheratine este heterodimeră. Secvența cuaternară este compusă din filamente intermediare, care au un diametru de 7 nm pentru α-cheratină și de 3-4 nm pentru β-cheratină.

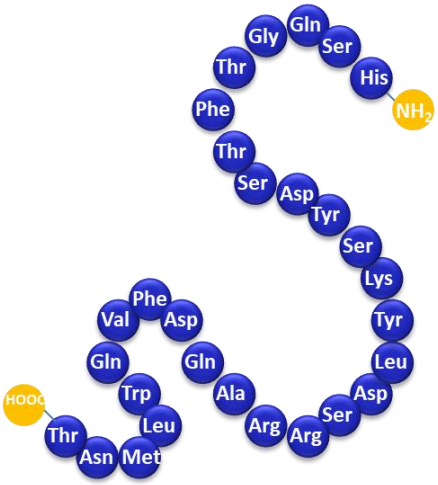




Toxina botulinică A *Toxina botulinică B*

Figura A.9.3. Structura chimică grafică a toxinei botulinice





Insulina **Glucagonul**

Figura A.9.4. Structură chimică a insulinei și a glucagonului

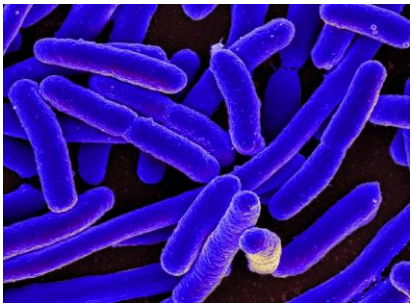
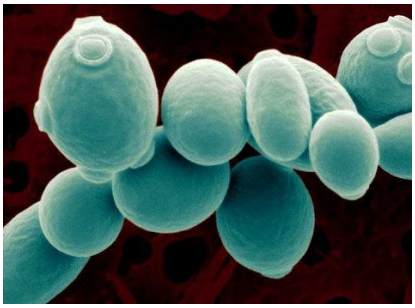
A)  B) 

Figura A.9.5. Micrografia electronică cu scanare colorată a bacteriilor *Escherichia coli (A)* și a fungilor *Saccharomyces cerevisiae (B)*

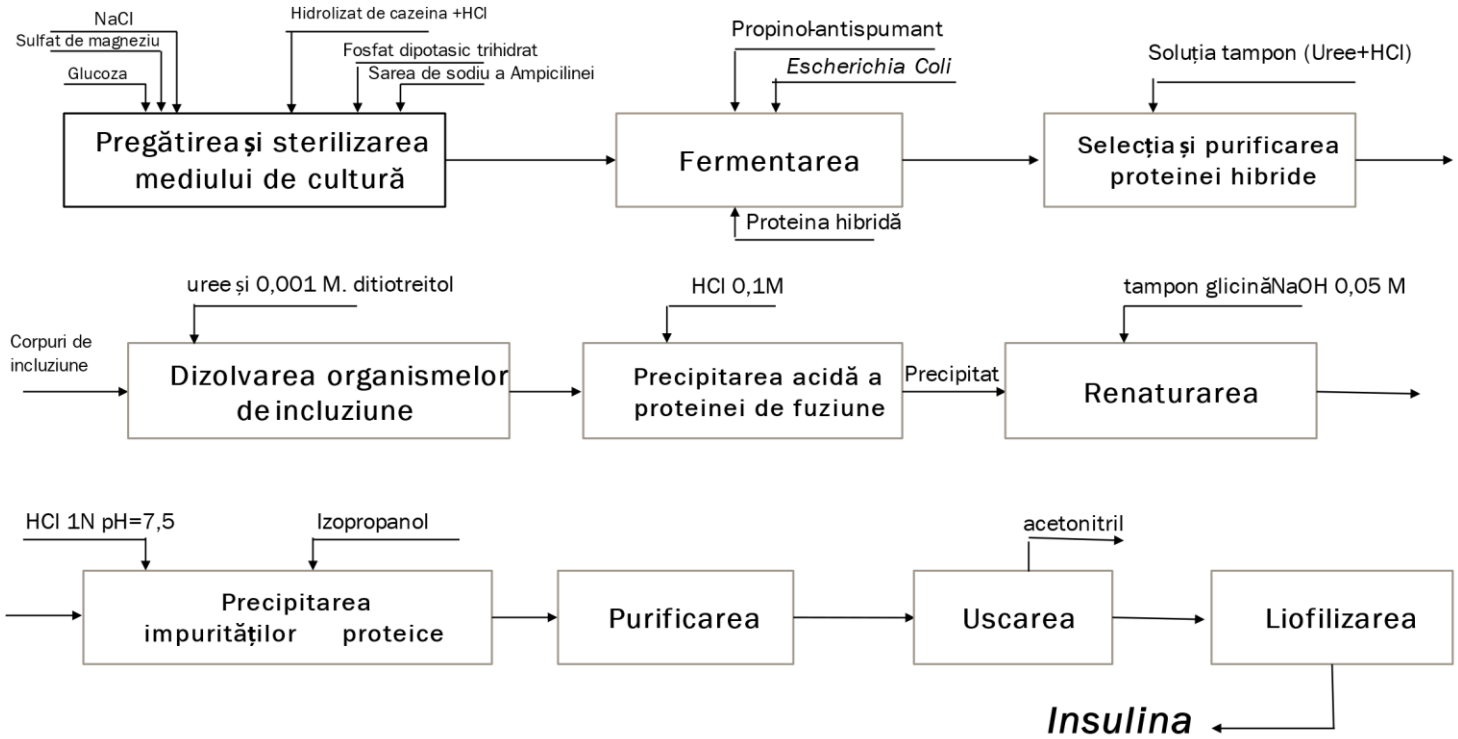


Figura A.9.6. Exemplu de flux tehnologic de obținere a insulinei din *E. Coli*



Figura A.9.7. Mecanismul schematic de obținere a insulinei cu ajutorul bacteriilor *E. coli*

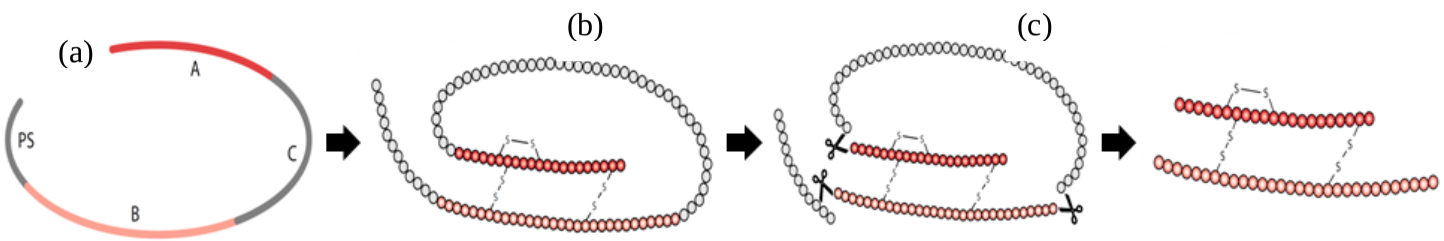


Figura A.9.8. Mecanismul schematic de restabilire a punților disulfurice proteice

ANEXA A.10

Tabelul A.10.1. Clasificarea vitaminelor hidrosolubile, liposolubile și rolul lor în industria farmaceutică și cosmetică

Clasificarea vitaminelor	Rolul în industria farmaceutică	Rolul în industria cosmetică
Vitamine hidrosolubile		
Vitamina B_1 (tiamina)	Contribuie la metabolismul energetic și la funcționarea sistemului nervos.	Îmbunătățește textura pielii și ajută la reducerea inflamațiilor.
Vitamina B_2 (riboflavina)	Suport pentru metabolismul celular și formarea hemoglobinei.	Ajută la menținerea pielii sănătoase, reducând semnele de oboseală și iritațiile cutanate.
Vitamina B_3 (niacina)	Utilizată pentru reducerea colesterolului și prevenirea bolilor cardiovasculare.	Îmbunătățește aspectul pielii prin reducerea porilor, hiperpigmentării și liniilor fine; hidratant.
Vitamina B_5 (acidul pantotenic)	Promovează vindecarea rănilor și regenerarea țesuturilor.	Hidratează intens pielea, reduce iritațiile și sprijină refacerea barierei cutanate.
Vitamina B_6 (piridoxina)	Tratează tulburările neurologice și reglează funcțiile imunitare.	Ajută la reglarea secreției de sebum, fiind utilizată în produsele pentru ten gras și acnee.
Vitamina B_7 (biotina)	Folosită pentru sănătatea părului, pielii și unghiilor; previne dermatita seboreică.	Întărește părul și unghiile, conferind rezistență; adesea inclusă în produsele pentru creșterea părului.
Vitamina B_9 (acidul folic)	Esențială pentru diviziunea celulară și prevenirea anomaliilor congenitale.	Contribuie la regenerarea celulară și la reducerea efectelor negative ale expunerii la UV asupra pielii.
Vitamina B_{12} (cobalamina)	Sprijină formarea globulelor roșii și menține sănătatea sistemului nervos.	Promovează hidratarea și regenerarea celulară, fiind folosită în produsele anti-îmbătrânire.
Vitamina C (acidul ascorbic)	Stimulează imunitatea și sinteza colagenului; antioxidant principal.	Reduce petele pigmentare, stimulează sinteza colagenului, protejează împotriva stresului oxidativ și îmbunătățește luminozitatea pielii.
Vitamine liposolubile		
Vitamina A (A_1 – retinol și A_2 – dehidroretinal)	Folosită în tratamente pentru acnee și psoriazis; susține sănătatea vederii.	Promovează regenerarea celulară, reduce ridurile și stimulează producția de colagen; adesea folosită în cremele anti-îmbătrânire și în seruri.

Vitamina D (D_2 – ergocalciferol și D_3 – colecalciferol)	Tratează afecțiuni precum rahitismul și osteoporoza; reglează metabolismul calciului.	Ajută la calmarea iritațiilor și la menținerea unui ten sănătos; utilizată în produse pentru piele sensibilă sau afectată de afecțiuni dermatologice.
Vitaminele E (tocoferolii *α*-, *β*-, *γ*-, *δ*- și tocotrienolii α-, *β*-, *γ*-, *δ*-)	Antioxidanți, protejează celulele de stresul oxidativ; susțin sănătatea sistemului cardiovascular.	Hidratează pielea, protejează împotriva razelor UV și a radicalilor liberi; promovează elasticitatea pielii și este utilizată în produsele antiîmbătrânire.
Vitaminele K (K_1 – filochinonă și K_2 – menachinonă)	Utilizate pentru prevenirea sângerărilor și întărirea pereților capilari.	Reduc cearcănele și roșeața pielii; îmbunătățesc aspectul pielii prin reducerea vizibilității vaselor de sânge superficiale și a vânătăilor.

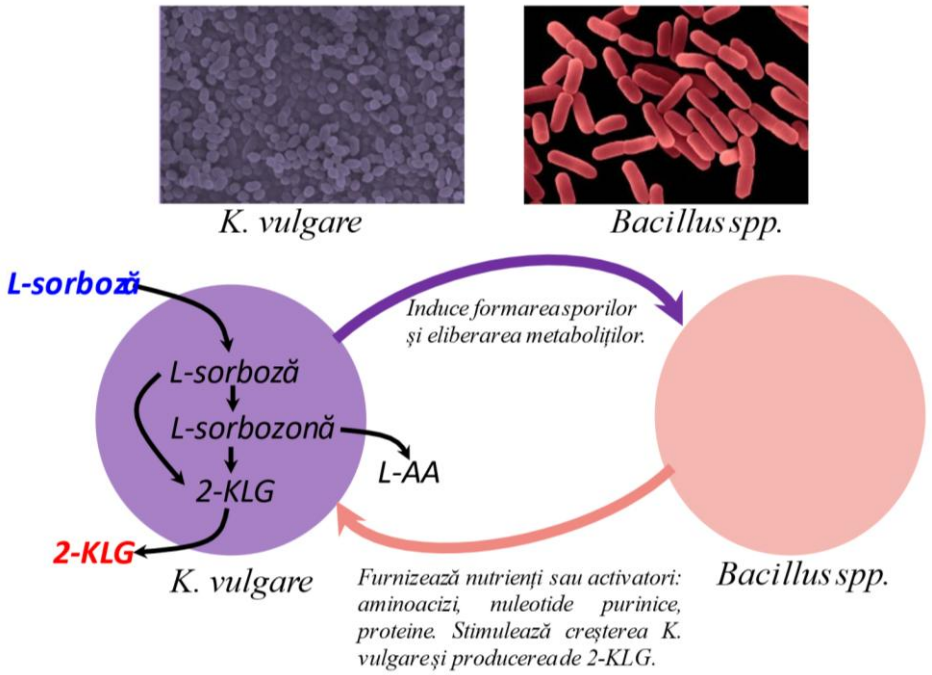


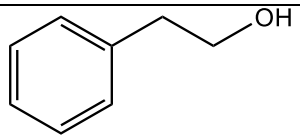
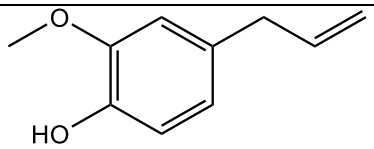
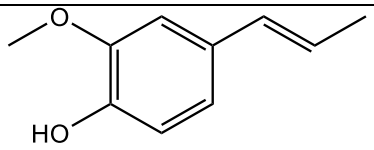
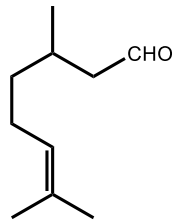
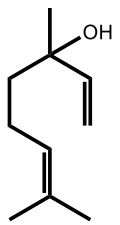
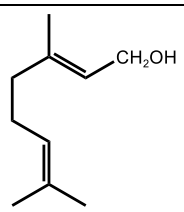
Figura A.10.1. Mecanismul schematic de transformare a *L*-sorbozei în acid 2-cetogulonic (2-KGA), prin fermentare în prezența bacteriilor *K. vulgare* și *Bacillus spp.*

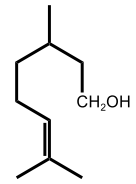
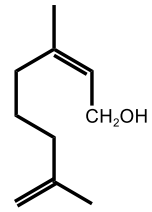
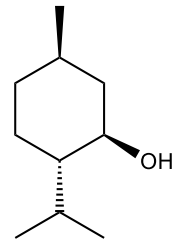
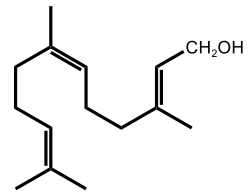
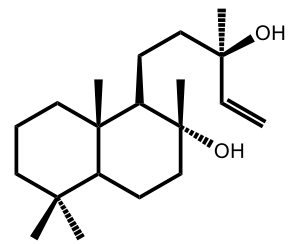
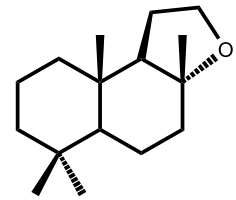
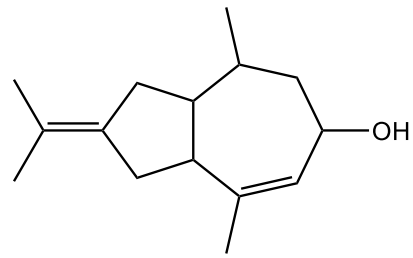
Tabelul A.10.2. Avantajele și dezavantajele obținerii AA prin metoda care implică două etape de fermentare în comparație cu metoda *Reichstein*

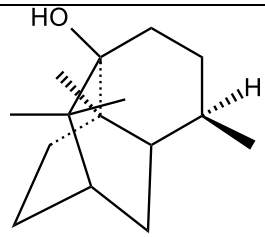
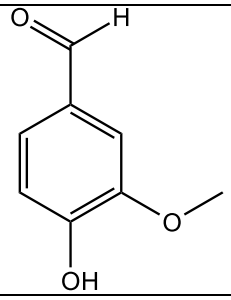
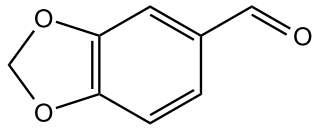
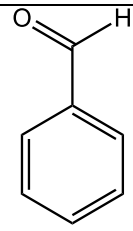
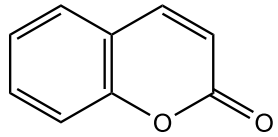
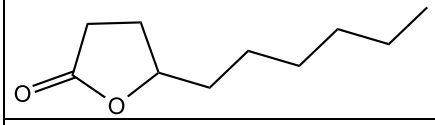
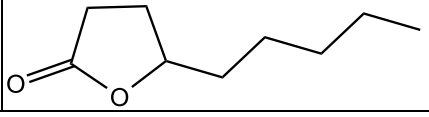
	Metoda *Reichstein*	**Sinteza ce implică 2 etape de fermentare**
Avantaje	Proces bine stabilit și optimizat	Randament global până la 90%
	Procesul este mai rapid	Mai economă
	Necesită o infrastructură mai simplă	Utilizarea microorganismelor reduce numărul de etape și, respectiv, pierderi mai puține și consum mai mic de energie
	Condițiile de reacție necesită o monitorizare mai lejeră	Mai ecologică
Dezavantaje	Implică multe etape chimice	Este în continuă optimizare
	Randament global până la 60-70%	Etapele biotehnologice sunt influențate de factori precum pH-ul, temperatura, oxigenarea și contaminarea microbiană
	Cantități mai mari de deșeuri, respectiv mai puțin ecologică	Integrarea etapelor biotehnologice și chimice necesită o infrastructură avansată
	Consum mare de energie	Procesul este mai îndelungat din cauza duratei fermentării

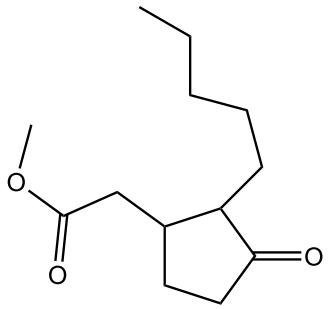
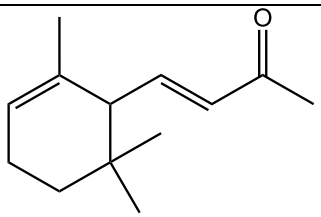
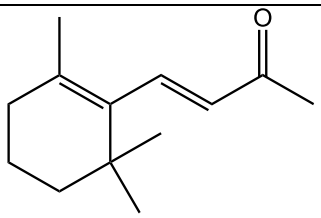
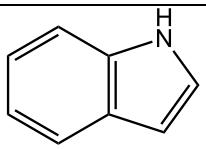
ANEXA A.11

Tabelul A.11.1. Clasificarea, structura chimică, proprietățile și utilizarea în industria cosmetică a aromelor obținute pe cale biotehnologică

Compuși chimici cu funcție de aromă	**Clasificare**	**Structura chimică**	**Proprietăți**	**Utilizare în industria cosmetică**
2-Feniletanol	alcool aromatic		miros plăcut, floral, asemănător trandafirului	creme, loțiuni, șampoane, parfumuri și săpunuri
Eugenol	terpenoizi		miros de cuișoare, picant	parfumuri, loțiuni, produse de igienă dentară
Izo-Eugenol			miros cald, condimentat, note orientale	parfumuri orientale
Citronelal			miros citric, proaspăt	parfumuri proaspete, spray-uri pentru corp
Linalool			miros floral, lemnos	parfumuri, produse de îngrijire a pielii
Geraniol			miros floral, de trandafir	parfumuri, creme

Citronelol			miros floral, proaspăt	produse de îngrijire personală, parfumuri
Nerol			miros floral, citric	parfumuri, produse de lux
Mentol			miros răcoritor, mentolat	produse de igienă orală, creme
Farnesol			miros dulce, lemnos	parfumuri, deodorante
Sclareol	diterpenoizi		miros lemnos, balzamic, note ambrate	parfumuri, baze de parfum
Ambroxan Ambrox			miros ambrat, lemnos, cald	parfumuri de lux
Vetiverol	sesquiterpenoizi		miros lemnos, pământiu, profund	parfumuri, produse pentru bărbați

Patchoulol			miros lemnos, pământiu	parfumuri pentru bărbați, baze de parfum
Vanilină	aldehide aromatice		miros dulce, cald, de vanilie	parfumuri, creme, loțiuni
Piperonal (heliotropină)			miros floral, dulce, note pudrate	parfumuri, loțiuni de corp
Benzaldehidă			miros de migdale, ușor dulce	parfumuri, produse de igienă personală
Cumarină	lactone aromatice		miros dulce, erbacee, fân	parfumuri, produse solare
γ-Decalactonă	lactone		miros de fructe, piersic	parfumuri, creme, loțiuni
γ-Nonalactonă			miros dulce, de cocos	parfumuri, produse tropicale

Hedionă (Dihidrojasmonat de metil)	cetone ciclice		miros floral, de iasomie	parfumuri complexe
α-Iononă	cetoalchene		miros de fructe, delicat, note de violete	parfumuri complexe, creme
β-Iononă			miros floral, de fructe	parfumuri complexe
Indol Compus heterociclic	alcaloizi aromatici		miros de varză	parfumuri complexe

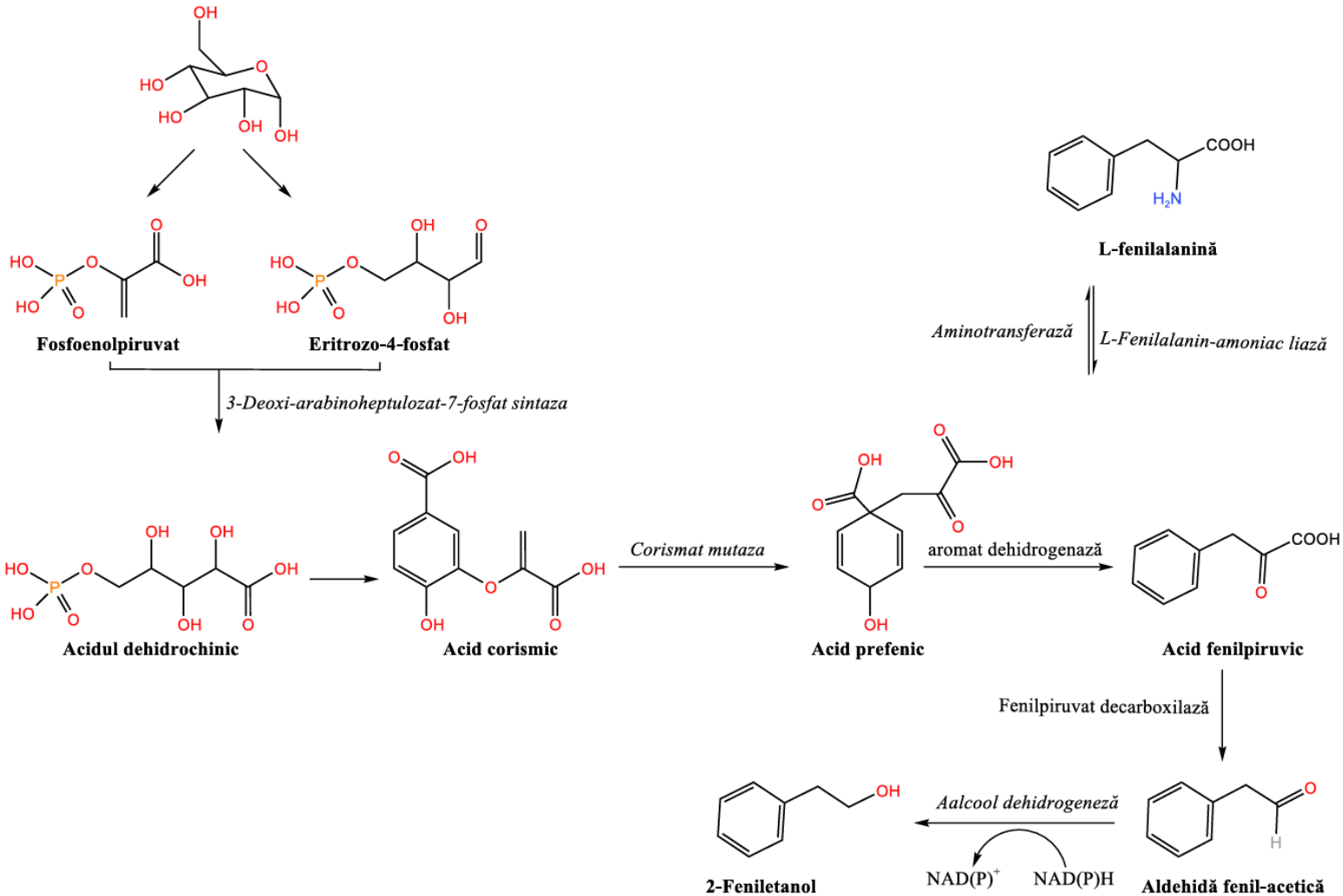


Figura A.11.1. Reacțiile de biosinteză a 2-feniletanolului pe calea biosintezei *de novo*

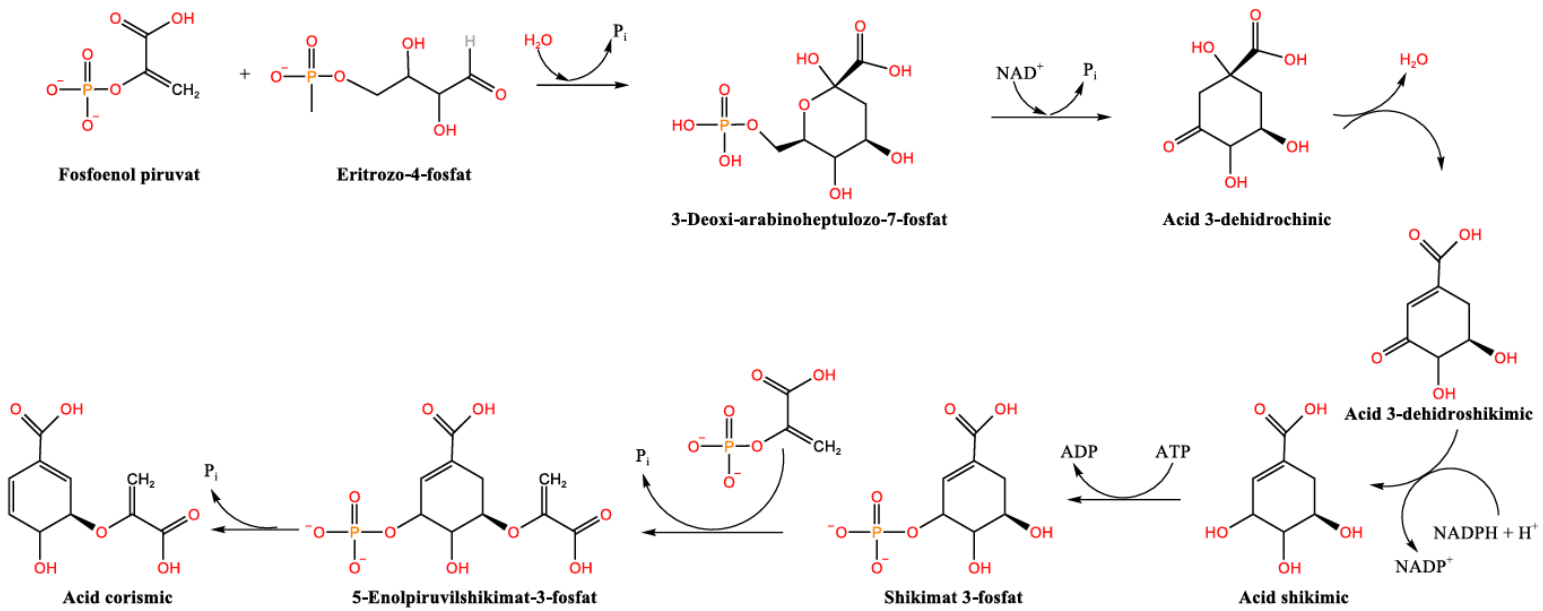


Figura A.11.2. Reacțiile de biosinteză a folaților și a aminoacizilor aromatici pe calea *shikimatului* (utilizată de microorganisme și plante)

ANEXA A.12

Tabelul A.12.1. Clasificarea polifenolilor

Categorie	Subclase	Exemple și proprietăți
Flavonoide	Flavone, Flavonoli, Flavanone, Isoflavone, Flavanoli, Antocianidine	Quercetina (antioxidant), Apigenina (antiinflamator), Cianidina (colorant natural)
Acizi fenolici	Acizi hidroxibenzoici, Acizi hidroxicinamici	Acid galic (antioxidant), Acid ferulic (absorbant UV)
Stilbene	Stilbene simple	Resveratrol (anti-îmbătrânire, antioxidant)
Lignani	Secoisolariciresinol, Matairesinol	Secoisolariciresinol (antioxidant, fitohormonal)
Taninuri	Taninuri hidrolizabile, Taninuri condensate	Proantocianidine (protecție UV, antioxidant)

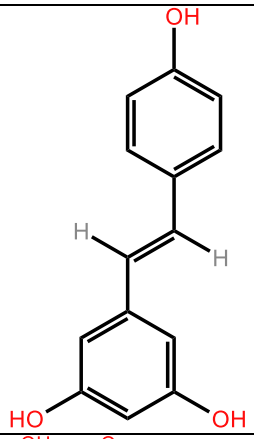
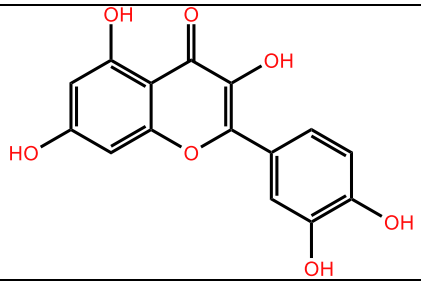
Tabelul A.12.2. Clasificarea terpenelor

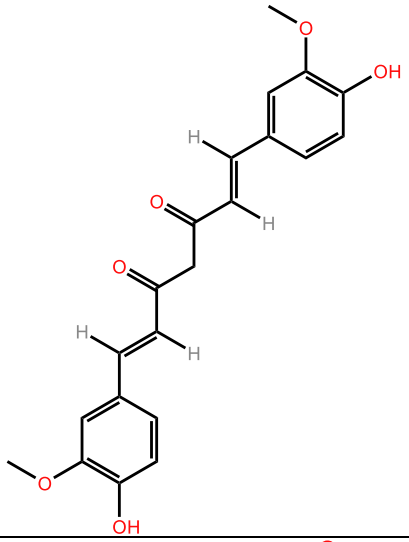
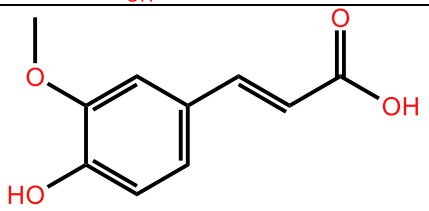
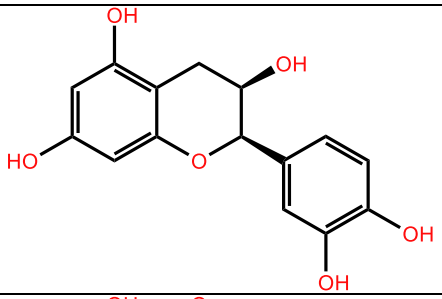
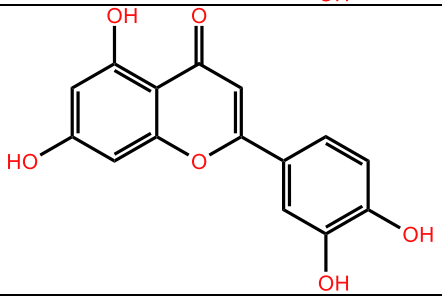
Categorie	Exemple	Proprietăți și utilizare
Hemiterpene (C_5)	Dimetilalil pirofosfat, Metilizobutilketonă, Acidul izovalerianic	Antioxidante, antimicrobiene, aromatizante. Formularea produselor aromatice, antioxidante și antimicrobiene
Monoterpene (C_{10})	Limonen, Geraniol, Citral	Aromatizante, antimicrobiene, revitalizante. Parfumuri, deodorante, creme hidratante
Sesquiterpene (C_{15})	Bisabolol, Farnesol	Calmant, antiinflamator, antimicrobian. Produse pentru pielea sensibilă, creme calmante
Diterpene (C_{20})	Fitol, Retinol (vitamina A)	Antioxidante, regenerante. Seruri anti-aging, produse pentru regenerarea pielii
Triterpene (C_{30})	Squalen, Betulin	Hidratante, antioxidante. Produse de hidratare intensă, loțiuni pentru pielea uscată
Tetraterpene (C_{40})	Astaxantina, Licopen, Zeaxantina	Antioxidante, fotoprotectoare. Creme de protecție solară, produse anti-îmbătrânire
Politerpene	Cauciuc natural	Elasticitate, rezistență. Materiale pentru aplicații cosmetice speciale

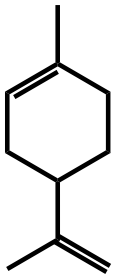
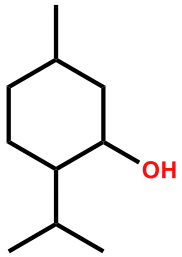
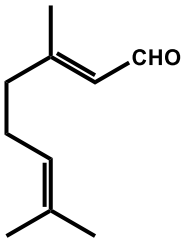
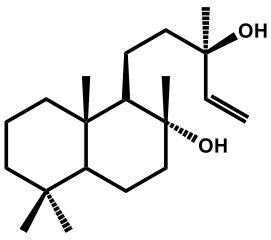
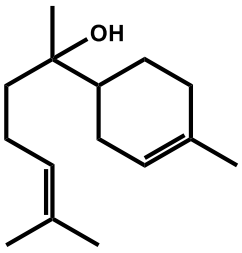
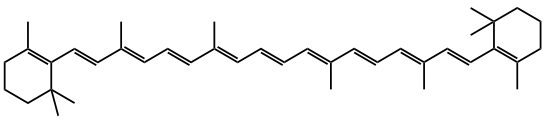
Tabelul A.12.3. Clasificarea carotenoidelor

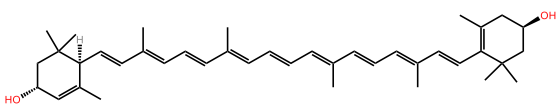
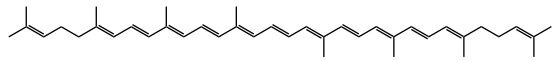
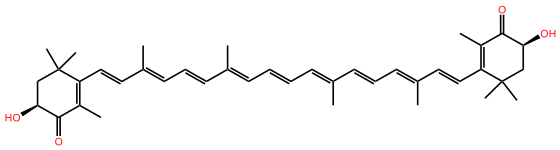
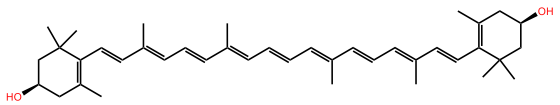
Categorie	Exemple	Proprietăți și utilizare
Caroteni (hidrocarburi)	*β*-Caroten, *α*-Caroten, Licopen	Antioxidante, fotoprotectoare, precursoare ale vitaminei A. Creme antiîmbătrânire, produse de protecție solară, suplimente nutritive.
Xantofile (oxicarotenoide)	Luteină, Zeaxantină, Astaxantină	Antioxidante, protecție împotriva luminii albastre, beneficii pentru sănătatea ochilor. Produse pentru îngrijirea ochilor, creme de regenerare, suplimente alimentare.
Apocarotenoide	Crocetină, Safranal	Aromatizante, antioxidante. Arome în cosmetice, ingrediente active în produse de îngrijire premium.

Tabelul A.12.4. Polifenoli, terpene și carotenoide obținute pe cale biotehnologică – clasificare, structură, proprietăți și utilizare în industria cosmetică

	Exemple	Clasificare	Structură Chimică	Proprietăți	Utilizare în industria cosmetică
Polifenoli	Resveratrol	Stilbene		Antioxidant, anti-aging, antiinflamator	produse anti-aging, creme regeneratoare
	Quercetina	Flavonoide		Antioxidant, antiinflamator, absorbant UV	creme de protecție solară, produse antiinflama-toare

	Curcumina	Curcuminoide		Antioxidant, antimicrobian, antiinflamator	produse pentru pielea sensibilă, loțiuni antiseptice
	Acid ferulic	Acid fenolic		Absorbant UV, antioxidant	seruri cu protecție UV, produse anti-aging
	epi-Catehină	Flavonoide		Antioxidant, reducerea stresului oxidativ	creme pentru ten, loțiuni revitalizante
	Luteolina	Flavonoide		Antioxidant, calmant, antiinflamator	creme calmante, produse pentru pielea iritată

Terpene	Limonen	Monoterpenă		Antimicrobian, revitalizant, aromatizant	produse de curățare, creme hidratante
	Mentol	Monoterpenă		Cu efect de răcorire, antimicrobian, calmant	produse de îngrijire a părului, loțiuni pentru pielea sensibilă
	Citral	Aldehidă		Antimicrobian, aromatizant, antiinflamator	parfumuri, deodorante, produse pentru piele grasă
	(-)-Sclareol	Alcool		Fixativ natural, antioxidant	parfumuri, creme regenerante
	α-Bisabolol	Sesquiterpenă alcool		Antiinflamator, calmant, antimicrobian	produse pentru pielea sensibilă, creme calmante
Carotenoide	*β*-Caroten	Provitamina		Antioxidant, absorbant UV	creme de protecție solară, produse anti-aging

	Luteină	Xantofilă		Antioxidant, protecție împotriva stresului UV	produse pentru îngrijirea ochilor, creme pentru protecție solară
	Licopen	Caroten		Antioxidant, protecție împotriva radicalilor	produse anti-aging, creme pentru pielea matură
	Astaxantină	Xantofilă		Antioxidant puternic, antiinflamator	seruri premium anti-aging, produse pentru regenerarea pielii
	Zeaxantină	Xantofilă		Protecție UV, antioxidant	creme pentru protecția pielii, produse pentru îngrijirea ochilor

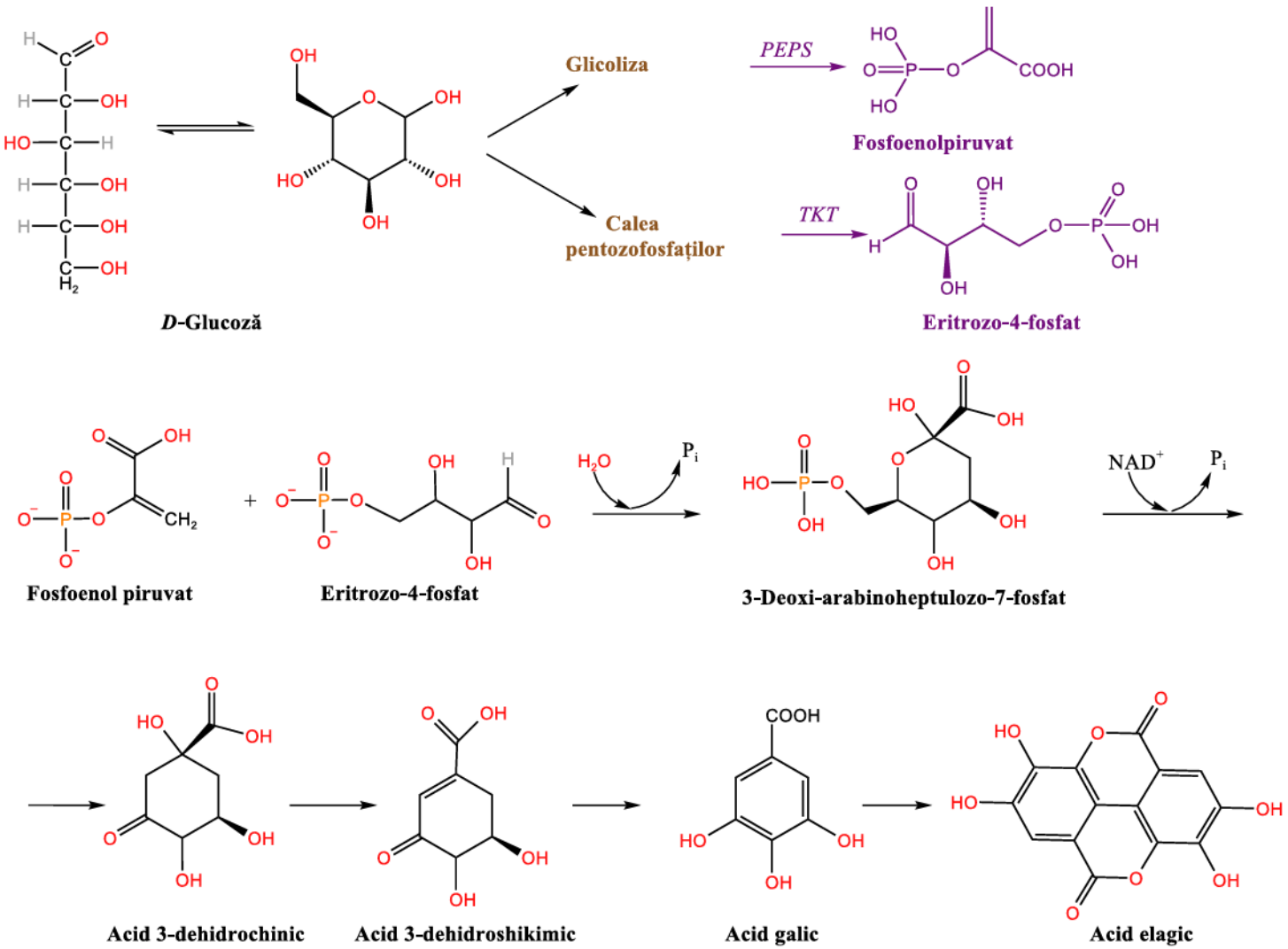


Figura A.12.1. Reacțiile de biosinteză a acidului elagic pe calea shikimatului

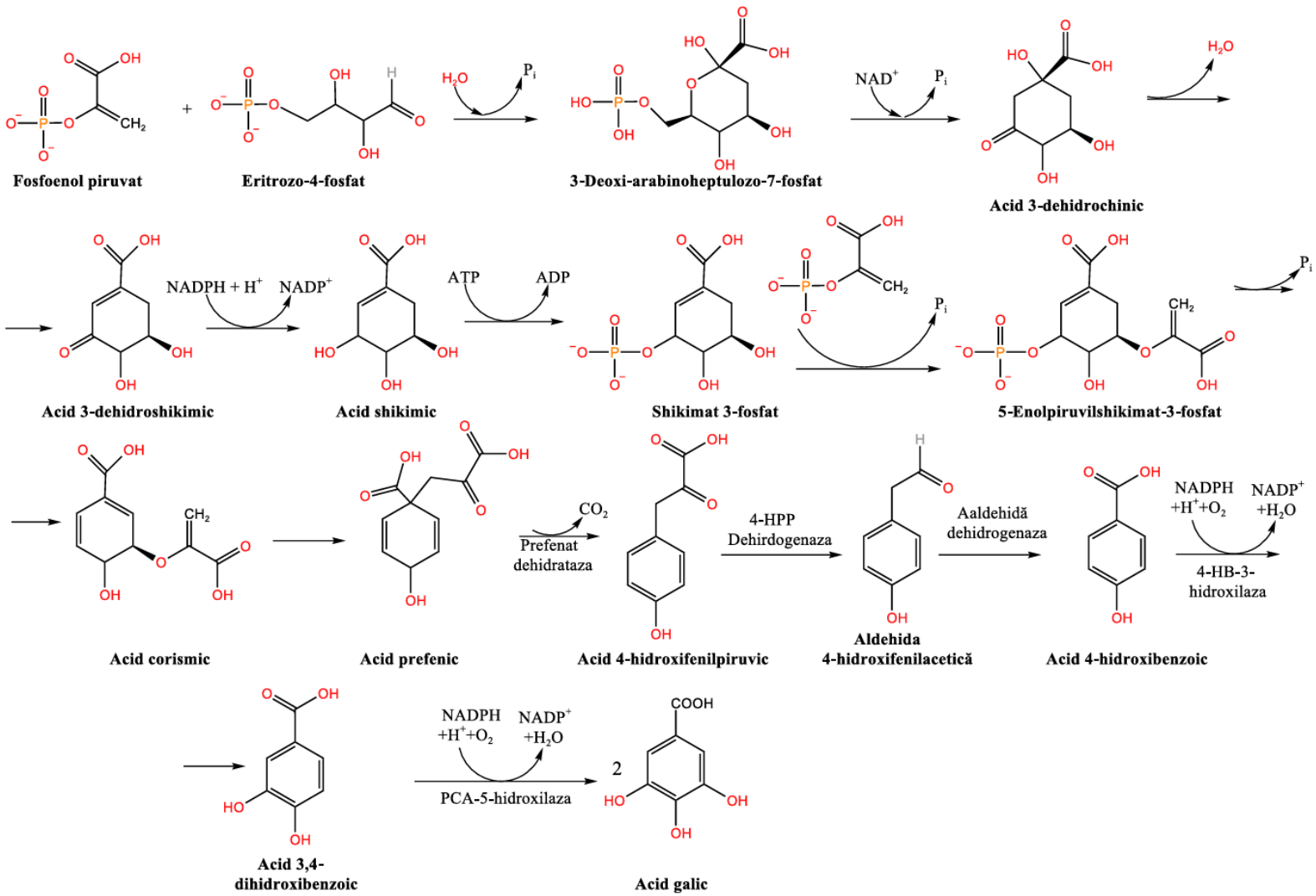


Figura A.12.2. Reacțiile de biosinteză a acidului galic pe calea shikimatului

Angela LIS, Vladislav BLONSCHI, Elena BUNDUCHI

BIOTEHNOLOGIA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE ȘI COSMETICE

Note de curs

Redactare – Ariadna Strungaru

Bun de tipar 03.11.2025. Formatul 60X84 1/16.
Coli de tipar 22,0. Coli editoriale 20,0
Comanda 40. Tirajul 20 ex.
Centrul Editorial – Poligrafic al USM
Str. Al. Mateevici, 60, Chișinău, MD-2009
e-mail: editurausm@gmail.com