

Preddiplomski studij "Biotehnologija"

**Tehnologija antibiotika
(Izborni A)**

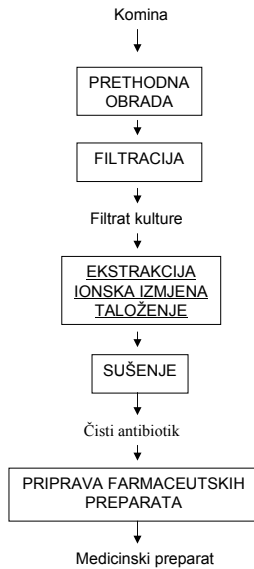
**Biotehnološka proizvodnja
antibiotika**

Dr. sc. Jagoda Šušković, red.prof.

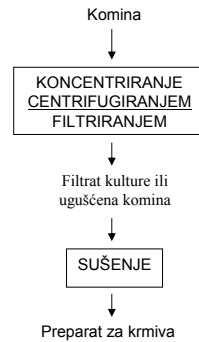
**IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE
ANTIBIOTIKA**

IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE ANTIBIOTIKA

IZOLACIJA ČISTOG ANTIBIOTIKA

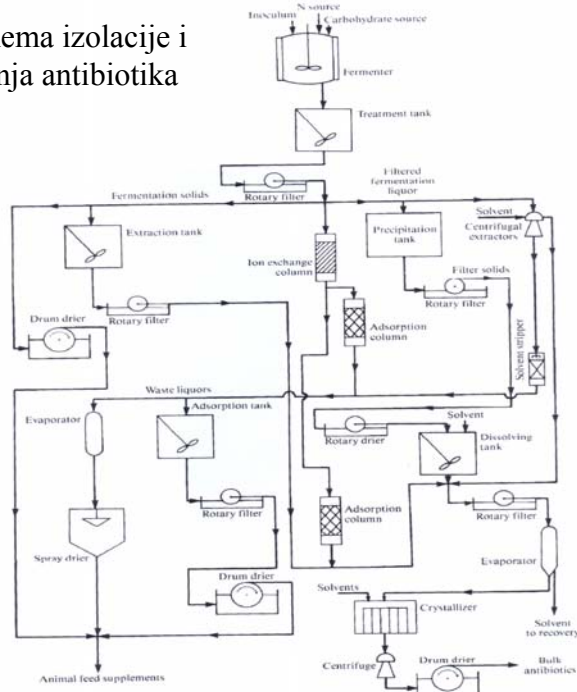


IZOLACIJA PREPARATA ZA KRMIVA



Cilj procesa izolacije antibiotika je dobivanje preparata visokog stupnja čistoće (za medicinsku uporabu) ili tehničkog preparata (za krmiva). Uobičajeno je priređivanje preparata u praškastom obliku (suhi preparat), budući da je u tom obliku najstabilniji.

Općenita shema izolacije i pročišćavanja antibiotika



PRETHODNA OBRADA KOMINE

Po završetku biosinteze antibiotik se može nalaziti u jednoj od faza komine:

- koloidnoj fazi tj. vezan uz biomasu,
- tekućoj fazi tj. u filtratu kulture,
- ili obje faze istovremeno.

Cilj prethodne obrade komine je što potpuniji prelaz antibiotika u jednu od faza (obično u tekuću fazu).

Antibiotik u otopljenom obliku u filtratu kulture:

često se nakon provedene filtracije provodi i obrada filtrata kulture.

Prethodna obrada komine ili filtrata kulture ovisi o:

- fizikalno-kemijskim osobinama antibiotika (topljivost, stabilnost),
- karakteristikama komine kao koloidnog sistema (oblik i koncentracija polimera),
- metodama izolacije koje se primjenjuju u idućim stupnjevima procesa.

Postupci u prethodnoj obradi:

- a) mijenjanje topljivosti antibiotika (promjenom pH, temperature) i prelaz u topivu formu, u filtrat kulture
- b) taloženje ili vezanje različitih iona-nečistoća
- c) hlađenje – sprječavanje razgradnje termolabilnih antibiotika
- d) uklanjanje tvari koje stabiliziraju emulzije pri ekstrakciji organskim otapalom (usporavaju ekstrakciju – proteini). Uklanjaju se iz filtrata kulture termičkom, polielektrolitskom ili kiselinskom koagulacijom.
- e) uklanjanje proteina zbog poboljšanja filtracije.

FILTRACIJA

Prvi stupanj u procesu izdvajanja antibiotika je filtracija tj. razdvajanje stanica mikroorganizama i ostalih krupnih suspendiranih čestica od filtrata kulture. Filtracija ovakvih koloidnih sustava znatno je kompliciranija od iste operacije u kemijskoj industriji.

Karakterizacija komina prema stupnju disperzije komine:

1. Komine pri kultivaciji nižih gljiva (plijesni)
 - grubo disperzni sustavi,
 - jednostavna filtracija,
 - nije potrebna prethodna obrada za olakšanje filtracije.
2. Komine pri kultivaciji streptomiceta (tetraciklini, streptomycin):
 - sadrže tanki sluzavi micelij i koloidne, fino dispergirane proteinske čestice,
 - otežana filtracija,
 - potrebno odstraniti dio proteina koagulacijom.
3. Komine pri kultivaciji bakterija (polipeptidni antibiotici, polimiksin):
 - sadrže jednorodne (po stupnju disperznosti) suspenzije,
 - lakša filtracija od komina pri kultivaciji streptomiceta.

Filtracija je postupak razdvajanja mikrobnih stanica od tekućeg dijela hranjive podloge pri čemu brzina prolaza tekućeg dijela kroz filter ovisi o:

1. Razlici tlaka
 2. Otporu filtracijskog materijala
 3. Viskoznosti tekućine
 4. Otporu koji pruža postojeći "kolač" koji se formirao na površini filtracijskog sredstva
- Šaržna filtracija biološkog materijala se provodi pri konstantnom tlaku (dovodjenje tekućine pumpom) u **rotacionim vakuum filterima** (filter preše rjede)
 - vrijeme (t) potrebno za filtraciju zadanog volumena nakon što je profiltriran volumen V (kolač) je:

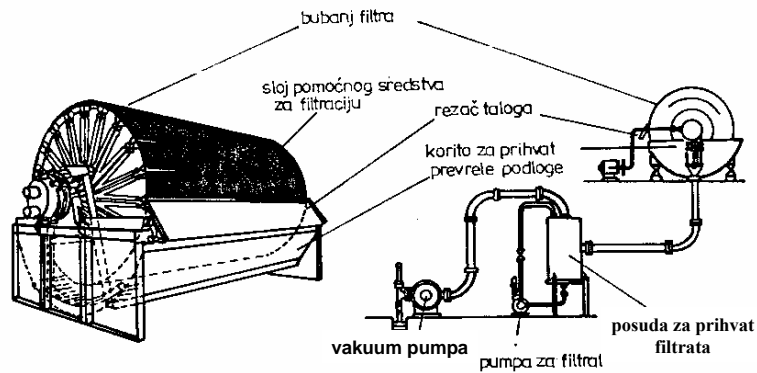
$$dt/dV = a V + b \quad t - \text{vrijeme, } V - \text{volumen}$$

$$a = h r_C W A^2 p \quad b = h r_S A p$$

h – viskoznost tekućine, r_C – specifični otpor kolača, A – površina filtera, p – konstantna razlika tlaka, r_S – specifični otpor sloja filtera, W – masa suhe tvari kolača po jedinici volumena.

- r_S – otpor koji pružaju: filtersko platno, pomoćno filtracijsko sredstvo, otpori u cjevovodima i spojevima
- početak filtracije je karakteriziran samo teorijskom konstantom filtracijskog sloja – **b** (iz jednadžbe je vidljivo da na početku otpor filtraciji ovisi samo o **b**)
- Produžavanjem filtracije stvara se kolač i otpor se povećava linearno (teoretski) u skladu s izrazom **a**

Rotacioni vakuum filter



- sastoji se od bubnja na koji je navučeno filtracijsko platno naplavljeno sa slojem pomoćnog sredstva za filtraciju (dijatomejska zemlja ili bentoniti)
- bubanj je preko razvodne glave spojen na vakuum sustav koji stvara podtlak, te kontinuirano odvodi filtrat
- bubanj je djelomično uronjen u korito u koje se dovodi podloga pri čemu zbog rotacije izranja na zrak gdje se odvaja tekući od čvrstog dijela podloge
- čvrsti dio podloge se skida sa filtera pomoću rezača taloga, te uvijek čista sekcija bubnja uranja u podlogu

Rotacioni vakuum filter



Operacija filtracije komine:

- kontinuirana filtracija velikih volumena suspenzija (komine) – stalno odvođenje filtrata,
- filtriranje pri konstantnom tlaku (uklanjanje kolača biomase nožem s filtracijskog bubnja),
- ispiranje taloga – poboljšanje izdvajanja antibiotika,
- poboljšanje filtracijske moći s pomoću filtracijskog sredstva (platno na bubnju) i pomoćnog filtracijskog sredstva (diatomejska zemlja se nanosi prije filtracije na platno)
- brzina šaržne filtracije se uglavnom mijenja zbog začepljenja, stlačivosti filtracijskog sloja i različite strukture pora kolača

Poboljšanje filtracijske moći komina:

- Optimiranjem vremena kultivacije: preduga kultivacija – autoliza micelija – oslobođeni proteini ometaju filtraciju i smanjuju iskorištenje izolacije,
- Prethodnom obradom komine koagulacijom proteina,
- Primjenom pomoćnih filtracijskih sredstava: diatomejska zemlja, bentoniti i dr.,
- Primjenom sredstava za flokulaciju stanica mikroorganizma – hitozan.

Drugi tipovi filtracije u proizvodnji antibiotika

Prema stupnju razdjeljenja suspenzije i količini dobivenog taloga imamo:

1. Razdvajanje suspenzije uz dobivanje znatnog sloja taloga – navedena filtracija komine
2. Ugušćivanje suspenzija (filtriranje taloga antibiotika, ugušćivanje komine pri izolaciji antibiotika za krmiva): filter preše; sedimentacione i košaraste centrifuge; nuče i tlačni filtri
3. Bistrenje otopina – čišćenje otopine antibiotika prije taloženja ili kristalizacije: filter preše, tlačni filtri, nuče i tangencijalna filtracija

IZDVAJANJE ANTIBIOTIKA

Pročišćavanjem antibiotika (izdvajanjem) u prvoj fazi se nužno i koncentrira proizvod, jer je količina antibiotika u filtratu kulture 2 – 6 %. Koncentriranjem se dostiže do 20% antibiotika u otopini te se smanjuje volumen i gubitci pri izolaciji.

Metode izdvajanja antibiotika iz tekuće faze:

1. ADSORPCIJA

Osniva se na molekularnoj adsorpciji na krute nosače (aktivni ugljen) i potom desorpciji. Iskorištenje je oko 50 %.

2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE/TEKUĆE

Metoda izmjene otapala. Primjenjuje se u izolaciji penicilina, cefalosporina, eritromicina i tetraciklina. Osnovica je različita topljivost različitih kemijskih formi molekule antibiotika u vodi i organskim otapalima (koja se ne miješaju s vodom). Osnovna zakonitost u uspostavljanju ravnoteže koncentracija otopljene tvari u dvije tekuće faze (koje se ne miješaju) pri određenoj temperaturi je data Nernstovim zakonom razdjeljenja:

NERNSTOV ZAKON RAZDJELJENJA

$$k = c_1/c_2$$

k = konstanta – koeficijent razdiobe

c_1 = koncentracija tvari u ekstraktu (organskom otapalu)

c_2 = koncentracija tvari u početnoj otopini

-k se određuje eksperimentalno. Idealno gledano, ova ovisnost je izoterma (stalna pri određenoj temperaturi). Odstupa zbog interakcije između molekula tvari i otapala.

Izračunavanje **stupnja koncentriranja** pomoću k:

$$j = \frac{1}{\frac{L}{G} + \frac{1}{k}}$$

j = stupanj koncentriranja (odnos koncentracije antibiotika u ekstraktu i početnoj otopini)

L = količina otapala za ekstrakciju

G = količina početne otopine

- viša vrijednost za k znači viši stupanj koncentriranja otopine

Za postizanje što boljeg prelaza antibiotika iz jedne tekuće faze u drugu potrebno je da su vrijednosti za radnu koncentraciju, što bliže vrijednosti za ravnotežnu koncentraciju (idealna), a definira se **Zakonom o prijenosu tvari**:

$$G = \frac{\Delta}{R} F t$$

G = koncentracija antibiotika koja prelazi iz jedne faze u drugu (koja se ekstrahira)

F = dodirna površina faza (voda – organsko otapalo)

R = otpor prenosu tvari (antibiotika), zbog unutarnjeg trenja među molekulama tvari

Δ = tzv. pokretna sila procesa ekstrakcije; srednja razlika između radne i ravnotežne koncentracije

t = vrijeme ekstrakcije

Povećanje koncentracije tvari koja se ekstrahira (G):

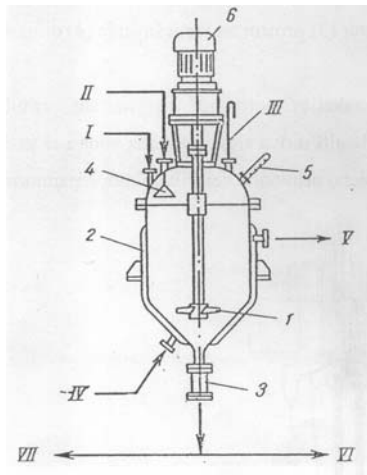
- povećanjem t (vrijeme) – ekstrakcija predugo traje,
- povećanjem F (dodirne površine faza) – fino dispergiranje jedne faze u drugoj – ekstraktori s miješanjem,
- povećanjem Δ (pokretne sile procesa) - povećanjem površine kontakta faza; *protustrujna ekstrakcija* – radna koncentracija ekstrahirane tvari se približava po vrijednosti ravnotežnoj.

Otapala za ekstrakciju:

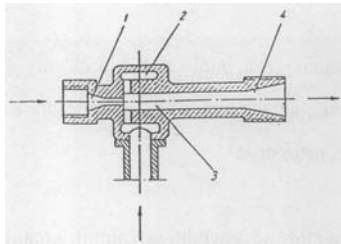
esteri, alkoholi (butanol, amil acetat, butil acetat, kloroform) otapala moraju biti: jeftina, nezapaljiva, da se ne miješaju s vodom, različite gustoće od vode, netoksična

Provedba ekstrakcije

Ekstrakcija tekuće/tekuće može se provoditi šaržnim ili kontinuiranim postupkom.

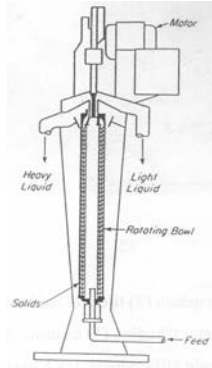


1. **Shema šaržnog ekstraktora:** (1) mješalo (2) tijelo ekstraktora (3) vodopokazno okno (4) dispergator tekućine (5) termometar (6) motor (I) otopina antibiotika (II) otapalo (III) odušak (IV) ulaz sredstva za hlađenje (V) izlaz sredstva za hlađenje (VI) ekstrakt (VII) iskorištena otopina antibiotika



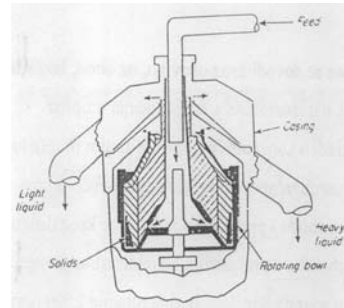
2. **Shema injekcionog ekstraktora.** Otapalo pod tlakom (lijevo); Usisavana otopina antibiotika (dolje); ekstrakt-emulzija (desno) (1) sapnica (2) usisni prostor (3) prostor za izmješavanje (4) difuzer.

Nakon provedene ekstrakcije potrebno je nastalu emulziju (stabiliziraju je proteini) razdvojiti u dva sloja (otpadna voda i ekstrakt u organskom otapalu) što se obično provodi u centrifugalnim separatorima.



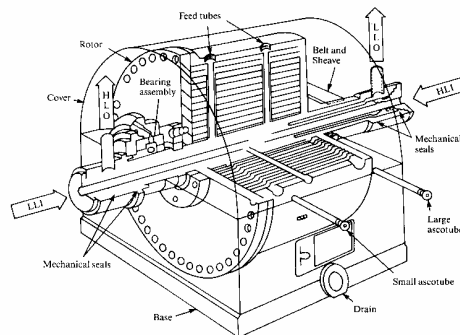
3. Shema cijevnog centrifugalnog separatora.

Heavy liquid – istrošena otopina antibiotika;
 Light liquid – ekstrakt antibiotika;
 Feed - emulzija



4. Shema protočnog centrifugalnog separatora

Potpuna ekstrakcija u jednom stupnju može se provesti u protustrujnim centrifugalnim ekstraktorima (tipa Podbielniak). Prikladni su za ekstrakciju osjetljivih antibiotika (vrijeme ekstrakcije 10-30 sekundi) i brzo razdvajanje emulzije. Postiže se također i visoki stupanj iskorištenja (do 98 %) zbog protustrujnog toka dviju tekućina, čime se osigurava razlika u koncentraciji antibiotika u dvjema tekućinama (gradijent koncentracije).



15. Shema protustrujnog centrifugalnog ekstraktora "Podbielniak" (LLI/HLI – ulaz lake/teške faze; LLO/HHO izlaz lake/teške faze)

Princip rada protustrujnog centrifugalnog ekstraktora

U centrifugalno polje rotora se dovodi kroz osovinu, uz obod, lakša faza (obično organsko otapalo), a u sredinu teža faza (vodena otopina antibiotika). Rotor je pregrađen koncentričnim perforiranim pregradama (ili sistemom cijevi). U centrifugalnom polju lakša faza kreće prema sredini rotora, a teža prema obodu i pri prolazu jedne faze kroz drugu provodi se ekstrakcija antibiotika u protustruji. Karakteristike su npr.: promjer rotora 66 cm; učin aparata 8 m³/sat; brzina rotacije 2500 o/min; tlak pumpi 2 – 4 bara; voda : otapalo = (3 do 6) : 1.

Nedostatak: može doći do začepljenja s koloidnim tvarima (proteini) i nerazrušivim emulzijama. Rješava se dodatkom deemulgatora.

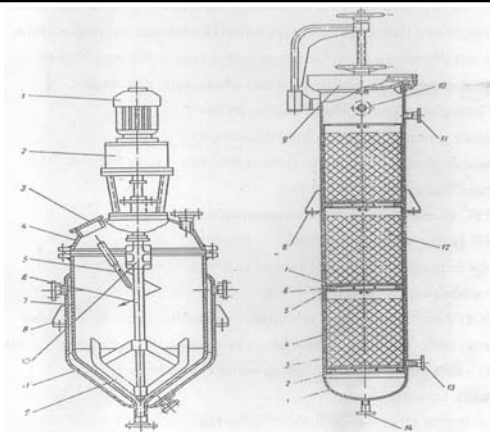
3. TALOŽNE METODE

Princip: sposobnost antibiotika da sa organskim ili anorganskim ionima i molekulama tvore lako razgradive komplekse koji se pri određenim fizikalno-kemijskim uvjetima u otopini (pH, temperatura, ionska jakost) – istalože. Izolacija, pročišćavanje i koncentriranje antibiotika kod taložnih metoda je vezano uz prevođenje u krutu fazu, te preradu istaloženog poluprodukta. Najvažnije operacije ove metode su: kristalizacija – taloženje, ekstrakcija kruto/tekuće i filtracija – separacija.

A) *Kristalizacija – taloženje* – operacija koncentriranja i pročišćavanja antibiotika. Postiže se promjenom topljivosti antibiotika; mijenjanjem pH, ionske jakosti i temperature; dodatkom organskog otapala; uparavanjem otopine. Uvjeti kristalizacije (pH, temperatura) su važni za postizanje određene veličine kristala, zbog postizanja nasipne mase i dobre topljivosti injekcijskih preparata.

B) *Ekstrakcija kruto/tekuće* – pročišćavanje antibiotika otapanjem taloga. Vrijede iste zakonitosti kao i kod ekstrakcije tekuće/tekuće. Optimalna veličina granula taloga 2-3 mm (veće granule – polagana ekstrakcija; manje granule – brza ekstrakcija – začepljivanje).

Iskorištenje, računato na koncentraciju antibiotika u komini, iznosi kod taložnih metoda od 70 do 80 %.



6. **Kristalizator** (lijevo): (1) elektromotor (2) reduktor (3) okno (4) poklopac (5) oklop termometra (6) osovina (7) tijelo ekstraktora (8) držač ekstraktora (9) miješalo (10) spojnica osovine (11) dvostruka stijenka.

7. **Ekstrakcijska kolona kruto/tekuće** (desno): (1) dno (2) držač sita (3) tijelo ekstraktora (4) patrona za čvrstu fazu (5) razdvajač (6) sito (7) gornji držač sita (8) držač ekstraktora (9) poklopac s odizačem (10) odušak (11) izlaz tekuće faze (12) čvrsta faza (13) slivnik (14) ulaz tekuće faze.

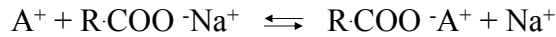
4. METODA IONSKE IZMJENE

Princip je specifično vezanje iona antibiotika s kiselim ili baznim funkcionalnim grupama ionskih izmjenjivačkih smola. Ionske izmjenjivačke smole su organske ugljikove makromolekule (polimeri) formirane u mnogoslojnim mrežastim strukturama s uklopljenim grupama koje imaju sposobnost elektrolitičke disocijacije. Ugljikov skelet smola daje: mehaničku čvrstoću i netopljivost (postojanost i dugovječnost).

Podjela (prema tipu grupa koje disociraju):

- a) **kationske izmjenjivačke smole** (kation aktivne) – vežu katione.
Ionizirajuće skupine smole su:
 - COO^-H^+ (karboksilne ionske izmjenjivačke smole)
 - SO_3^-H^+ (sulfo-ionske izmjenjivačke smole)
- b) **anionske izmjenjivačke smole** (anion aktivne) – vežu anione.
Ionizirajuće skupine:
 - NR_3^+OH^- (amonijeve baze; amonijske ionske izmjenjivačke smole)

Mnogi antibiotici u molekuli imaju kiselinske ili bazne grupe (ili su amfoterni) – disociraju u vodenim otopinama i vežu se na ionske izmjenjivačke smole:



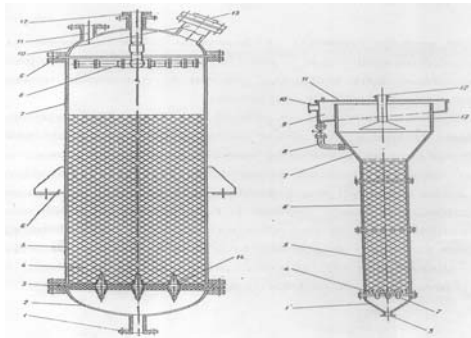
Kinetika i trajanje procesa ovise o mnogim faktorima, kao što su npr.

- difuzija u otopini
- difuzija unutar ionske izmjenjivačke smole
- elektrostatsko djelovanje između iona antibiotika, ionogenih grupa smole i molekula skeleta smole
- adsorpcija na površini smole (neionska)

Selektivnost sorpcije (vezanja) i desorpcije (eluacije) osigurava pročišćavanje otopine antibiotika, a ovisi o veličini, naboju i drugim svojstvima sorbiranog iona antibiotika. Aparati za provođenje ionske izmjene su **ionski izmjenjivački filtri ili kolone**.

Proces izolacije antibiotika se provodi pri dinamičkim uvjetima procesa sorpcije i desorpcije:

- Propušta se stalno svježa otopina antibiotika kroz sloj sorbensa (smola) do potpunog iscrpljenja antibiotika iz otopine, uz postepeno zasićenje sorbensa antibiotikom.
- Desorpcija (eluacija) antibiotika sa smole se provodi blagim kiselinama ili lužinama uz potpuno uklanjanje antibiotika sa smole. Rezultat je koncentriranija i pročišćena otopina antibiotika.
- Proces se provodi kontinuirano, u seriji (bateriji) kolona. Otopina antibiotika se propušta kroz prvu kolonu do zasićenja (antibiotik u izlaznoj otopini), a potom prelazi na drugu kolonu, a antibiotik se iz prve kolone eluira.
- Iskorištenje procesa je 90 – 95 %.



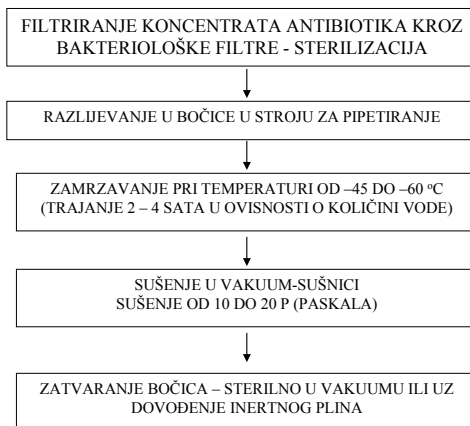
8. Kolona za ionsku izmjenu zatvorenog tipa (lijevo): (1) donji otvor za ulaz i izlaz tekućine (2) dno (3) dno s raspoređivačima protoka tekućine (4) ionska izmjenjivačka smola (5) tijelo kolone (6) držači kolone (7) sloj zaštitne boje (8) gornji raspoređivač tekućine (9) prirubnica poklopca (10) otvor (11) odušak (12) izlaz/ulaz za tekućinu (13) okno (14) čep s utorima za raspoređivanje tekućine.

9. Kolona za ionsku izmjenu otvorenog tipa (desno): (1) dno (2) donji raspoređivač tekućine (3) ulaz/izlaz tekućine (4) drenažni sloj (5) tijelo kolone (6) sloj ionske izmjenjivačke smole (7) proširenje za zaustavljanje toka tekućine (8) prelijevna cijev (9) džep za sakupljanje granula smole (10) izlaz tekućine (11) poklopac kolone (12) ulaz tekućine (13) gornji raspoređivač tekućine.

PROCES SUŠENJA ANTIBIOTIKA

Uklanjanje vode iz čistog preparata antibiotika zbog osiguranja stabilnosti (zadržavanja aktivnosti) kroz duže vrijeme. Antibiotici su uglavnom termolabilne supstance pa je sušenje pri višim temperaturama često neprihvatljivo.

Liofilizacija je sušenje sublimacijom leda u vakuumu. Podesna je za sušenje termolabilnih antibiotika. Shematski prikaz procesa liofilizacije:



Liofilizacija

- Proces je podijeljen u dva dijela:
 - a) zamrzavanje materijala u tankom sloju, pri temperaturi -15°C do -70°C
 - b) sušenje zamrznutog materijala u vakuumu pri niskim temperaturama (sublimacija)



- Temperatura se u vakuum sušnici održava pomoću tople vode koja cirkulira kroz police na kojima su bočice. Vodena para se kondenzira u kondenzatorima hlađenim rashladnim sredstvima.
- Sterilnost se mora osigurati tijekom cijelog procesa. Brzina sušenja ovisi o brzini isparavanja vodene pare iz leda. Isparavanje leda ovisi posebno o načinu zamrzavanja.

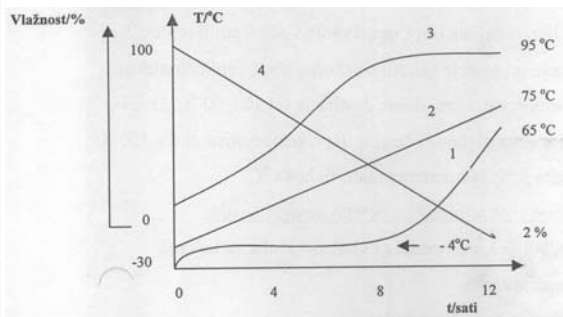
Proces zamrzavanja treba provesti što brže zbog:

- a) veličine kristala leda: manji kristali - veća površina isparavanja leda (brže zamrzavanje - manji kristali)
 - b) stupnja viskoznosti otopine antibiotika koja okružuje kristale leda nakon zamrzavanja. Viskoznija otopina pri sublimaciji zadrži porozniju formu – lakša sublimacija.
- Zamrzavanje se provodi naglim hlađenjem na temperaturu ispod -50°C .

Usporedba liofilizacije s drugim metodama

- Prednosti: - veća trajnost preparata
- dobro otapanje antibiotika
- Nedostaci: - postrojenje je skupo, glomazno i zahtjeva hermetičnost
- skuplji proces
- proces dugo traje (nekoliko sati)

Primjer: temperaturni dijagram sušenja streptomycin hidroklorida liofilizacijom



- 1 – temperatura u centru zamrznute mase antibiotika
- 2 – temperatura u aparatu za sušenje
- 3 – temperatura vode za održavanje temperature u aparatu za sušenje
- 4 – preostala vlaga u preparatu

Opadanjem brzine sušenja materijala izjednačavaju se temperatura preparata i okoliša. Proces sušenja završava kada su ove dvije temperature približno iste. Izbor konačne temperature sušenja ovisi o termostabilnosti antibiotika. Posljednjih 2 – 3 % vlage se teško uklanja – obično na temperaturi 60 – 70 °C, kroz 2-3 sata.

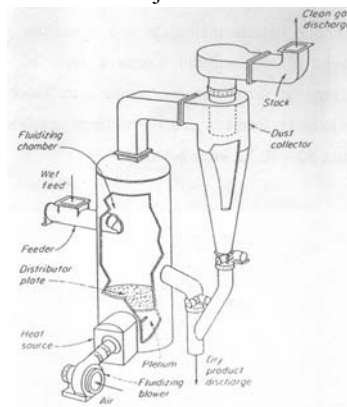
Sušenje u struji toplog zraka

Princip: raspršivanje otopine ili suspenzije antibiotika u čestice velike nekoliko desetaka µm i isparavanje vode u struji toplog zraka.

Trajanje procesa je nekoliko sekundi zbog velike kontaktne površine. Temperatura raspršenih čestica je od 40 – 50 °C. Ovisi o temperaturi zraka i vlažnosti čestica. Npr. temperatura zraka 150 °C; vlažnost zraka 3 %; temperatura materijala 45 °C.

Veličine koje je potrebno poznavati pri sušenju:

- najviša dozvoljena temperatura i vlažnost zraka za sušenje
- brzina strujanja zraka
- ukupni volumen potrebnog zraka
- % zraka koji se može reciklirati
- % vlažnosti ulaznog materijala
- sadržaj vlage izlaznog materijala



10. Kontinuirana sušnica s lebdećim slojem (sušenje u struji toplog zraka)