



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS ENZIMATICA DE AMPICILINA

TESIS

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

LAURA LOPEZ DIAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
I INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	10
III ANTECEDENTES	12
IV MATERIAL Y METODOS	20
V RESULTADOS	34
VI DISCUSION DE RESULTADOS	44
VII CONCLUSIONES	56
VIII BIBLIOGRAFIA	59
IX APENDICE I (figuras)	63
X APENDICE II (tablas)	82

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

Un antibiótico se define en el sentido estricto como un compuesto químico producido por microorganismos, que presenta la propiedad de inhibir temporal o totalmente el crecimiento de otros microorganismos. (Wallhausser, 1969). Como se observa esta definición excluye a agentes químicos terapéuticos tales como las sulfas ó a aquellos agentes antimicrobianos producidos por organismos superiores (v.gr. helechos). Sin embargo comunmente a estos se les considera como antibióticos.

Los antibióticos pueden ser naturales, semisintéticos ó sintéticos. Los antibióticos naturales se obtienen mediante procesos fermentativos, generalmente por hongos y en algunas ocasiones por bacteria.

Los antibióticos semisintéticos son aquellos productos microbianos cuya estructura ha sido modificada química ó enzimáticamente. Estos antibióticos en su mayoría, presentan algunas ventajas sobre sus precursores naturales, ya que mediante esta modificación su actividad intrínseca, espectro de acción y/o estabilidad aumentan.

Por último se tienen los antibióticos sintéticos producidos exclusivamente por síntesis química, como el cloramfenicol.

Los antibióticos pueden ser clasificados en base a diversos criterios como: taxonomía del microorganismo productos, vías metabólicas involucradas en su síntesis, nivel o modo de acción del antibiótico, espectro de acción o estructura química. Tomando en consideración este último criterio se encuentra la siguiente clasificación:

Grupo	Antibiótico
I	β - Lactámicos
II	Peptídicos
III	Aminoglucosídicos
IV	Macrólidos no poliénicos
V	Macrólidos poliénicos

La presente investigación está enfocada en el grupo de los -- Antibióticos β -lactámicos, especialmente en la Ampicilina, que es una de las penicilinas semisintéticas que mayor importancia presenta a nivel mé^{di}co y de producción.

Antibióticos β -lactámicos

Al grupo de los antibióticos β -lactámicos pertenecen las denominadas penicilinas, cuya estructura general corresponde a un anillo -- β -lactámico que recibe el nombre de ácido 6-amino penicilánico (6-APA) -- (Fig. 1) y una cadena lateral. Las penicilinas pueden ser naturales ó -- semisintéticas. Las penicilinas naturales se obtienen por proceso fermen^tativo utilizando generalmente al hongo Penicillium chrysogenum ó nonatum. Precursores químicos son adicionados durante la fermentación, los cuales constituyen las diferentes cadenas laterales, dando lugar así a las diver^sas penicilinas naturales (Tabla 1).

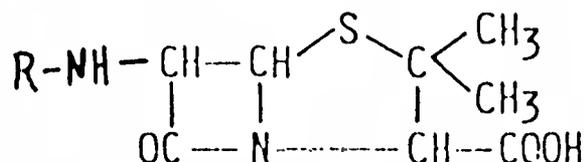


Fig. 1 Estructura general de las penicilinas

R = cadena lateral

Unicamente las penicilinas G y V han llegado a convertirse en agentes importantes terapéuticamente. La penicilina G presenta una intensa actividad contra bacterias gram (+) y muy poca contra gram (-); es lábil en medio ácido por lo que su administración debe ser por vía parenteral. La penicilina V es menos activa que la penicilina G, presentando -- igual espectro de acción, en cambio es estable en medio ácido. Ambas penicilinas son inactivadas por la enzima penicilasa.

Las penicilinas semisintéticas (Tabla II) son obtenidas a partir de las penicilinas naturales mediante modificaciones por vía química -- ó enzimática en la cadena lateral.

En este grupo se encuentra la ampicilina, la cual ocupa un -- lugar importante dentro de los antibióticos, en cuanto a uso médico se refiere. Esto se debe a las propiedades que presenta como son: Estabili--

dad en medio ácido lo que permite su administración por vía oral, mayor actividad intrínseca para algunos microorganismos y espectro de acción -- más amplio que el de la penicilina G.

En la molécula de la ampicilina, la cadena lateral corresponde a fenilglicina. (Fig. 2). Su fórmula condensada es $C_{16}H_{19}O_4 N_3S$. Se encuentra en varias formas hidratadas como: Monohidratada; cristales incoloros, descompone a $202^\circ C$, $[\alpha]_D^{24} = + 281^\circ$. Trihidratada, descompone a $200 - 202^\circ C$ y Anhidra que presenta diferente estructura cristalina -- siendo más estable y menos soluble en H_2O y CH_3SO_2 .

Este antibiótico es conocido bajo diferentes nombres comerciales: Amblosin, Amplital, Austanapen, Binotal, Penbritol, Penbritin, -- Pentrox, Pentrexy, Polycillin y Totapen.

La ampicilina es estable en medio ácido, es usada contra bacterias gram (+) y (-) y micobacterias; ligeramente menos activa que la penicilina G contra gram (+), sin embargo presenta una actividad 4 a 8 veces mayor contra bacterias gram (-).

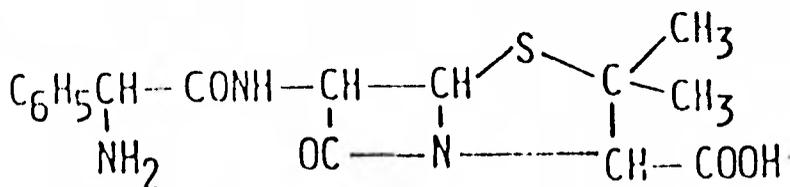
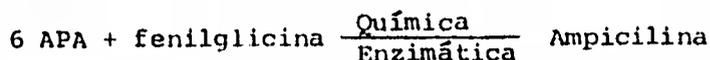
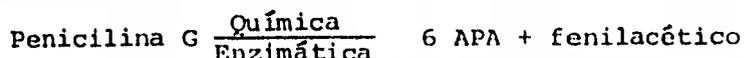


Fig. 2. Estructura de la ampicilina

Producción de Ampicilina

La ampicilina puede ser producida por vía química o enzimática ó una combinación de ambas vías como se muestra a continuación:



El 6-APA es la materia prima para la producción de las penicilinas semisintéticas. Este ácido era obtenido anteriormente por proceso fermentativo, sin embargo dada la dificultad en su separación y purificación este proceso resultó obsoleto, siendo sustituido por el de hidrólisis de la penicilina G. Esta hidrólisis puede ser llevada a cabo por vía química o enzimática.

La hidrólisis química de la penicilina G (Fig. 3) para la producción del 6-APA consta de cuatro reacciones:

1. Sililación
2. Tratamiento de los silil estéres con PCl_5 y piridina para formar un intermediario de cloruro de imino (-60°C)
3. Adición de un alcohol al intermediario para obtener un imino eter
4. Adición de agua para efectuar la hidrólisis a 6-APA (-17°C)

Como se observa, en este proceso se requiere de compuestos tóxicos y difíciles de manejar como son los silanos y el PCl_5 . Las condiciones de temperatura son extremas y la recuperación de los disolventes resulta incosteable (Queener y Swatz, 1979).

Mientras que la hidrólisis enzimática de la penicilina G, se lleva a cabo con la enzima penicilino amidasa, consta de un solo paso y para ello es necesario poner en contacto a la enzima con su sustrato en un rango de temperatura de 25 - 55°C en buffer de fosfatos. (Casas, T., 1981).

Por lo expuesto anteriormente, se observa que la hidrólisis por vía enzimática resulta más práctica que por vía química.

La ampicilina se obtiene haciendo reaccionar el grupo amino del 6-APA con el grupo carbonilo de la fenilglicina. Esta reacción de acilación puede llevarse a cabo por vía química o enzimática.

ACILACION POR VIA QUIMICA

El proceso de acilación por vía química consta de tres pasos fundamentales (Fig. 4).

1. Sililación
2. Acilación
3. Hidrólisis

y pasos posteriores de separación y purificación. A continuación es descrito dicho proceso.

Al 6-APA disuelto en cloruro de metileno se le agrega el dimetildiclorosilano a una temperatura de 32°C, con objeto de proteger el grupo amino, para evitar su reacción y aumentar la solubilidad del 6-APA en el medio orgánico. Posteriormente se agrega el cloruro del clorhidrato de la α -fenilglicina.

La ampicilina sililada no es soluble en la mezcla de reacción. Una vez que el producto se encuentra formado se vierte agua en el reactor obteniéndose así un sistema de dos fases.

Se neutraliza con NH_4OH y en esta forma se separan las impurezas (6-APA, fenilglicina, dimetilanilina). Se agrega posteriormente el α -naftalen-sulfonato de sodio, el cual reacciona con la ampicilina formando el naftalen-sulfonato de ampicilina que es insoluble.

El producto se lava con abundancia de agua, la cual arrastra todos los clorhidratos y la dimetilanilina obteniéndose un producto bastante puro con aproximadamente 20 ppm de dimetilanilina.

El naftalen-sulfonato de ampicilina no se retira del reactor, al cual se alimenta trietilamina para eliminar el naftalen-sulfonato. Se obtiene ampicilina anhidra si el medio es de isopropanol o hidratada si el medio es acuoso. Posteriormente se seca en un horno de charolas. (Quinonas de México). (Encyclopedia of Chemical Technology).

ACILACION POR VIA ENZIMATICA

Actualmente este proceso se encuentra en fase de investiga--

ción en varias partes del mundo. La enzima que cataliza la síntesis de la ampicilina denominada penicilino amidasa ó acilasa, es la misma que se utiliza para realizar la reacción de hidrólisis de la penicilina G en la obtención del 6-APA.

El proceso de hidrólisis por vía enzimática ha sido ampliamente desarrollado y actualmente se usa a nivel industrial para la obtención del 6-APA, por lo que resulta atractivo investigar la reacción de síntesis catalizada por esa enzima; así con el mismo catalizador enzimático se realizaría la reacción de hidrólisis de penicilina G para obtener el 6-APA y en forma continua se proseguiría con la síntesis de las penicilinas semisintéticas adicionando el agente acilante adecuado, cambiando únicamente las condiciones de pH y temperatura. La reacción de síntesis se llevaría en un solo paso, para lo cual bastaría poner en contacto a la enzima con los sustratos a determinado pH y en un rango de temperatura de 25 - 45°C.

Desde el punto de vista académico resulta importante el estudio de la reacción de síntesis, ya que en este tipo de reacción se encuentran involucrados más de un sustrato y se requiere de un aporte de energía, razones por las cuales pocas reacciones de síntesis por vía enzimática logran tener aplicación a nivel industrial.

Mercado de las Penicilinas

Los antibióticos β -lactámicos presentan un amplio mercado a nivel mundial.

De la cantidad total de penicilina producida en 1975, el 80% corresponde a la Penicilina G. El 43% de la producción de ésta penicilina es usado para la obtención de las penicilinas semisintéticas, el 38% es vendido para consumo humano; el 12% para uso veterinario y el 2% es usado para sintetizar el ácido 7 amino deacetoxicefalosporánico utilizado como materia prima en la elaboración de otros antibióticos semisintéticos -- (Queener y Swartz, 1979).

La producción de penicilinas en Latino América es realizada - en Brazil, Argentina y México. En nuestro país se lleva a cabo por la compañía CIBIOSA situada en Coahuila.

Las penicilinas semisintéticas producidas en México son:

- 1) Ampicilina
 - a) trihidratada
 - b) anhidra
 - c) sódica
 - d) potásica
 - e) benzatínica
- 2) Dicloxacilina
- 3) Cefalexina
- 4) Metampicilina
- 5) Hetacilina
- 6) Amoxicilina

La ampicilina ocupó el primer lugar en cuanto a ventas de penicilina semisintética se refiere durante los años de 1975 a 1977 en México. (Tabla III). Así mismo, ésta presenta un lugar importante dentro de la producción de antibióticos. (Tabla IV). (BIOFER).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1) Estudiar la reacción de síntesis de ampicilina por vía enzimática, utilizando células intactas de Escherichia coli ATCC 9637 que contienen a la enzima penicilino amidasa.
- 2) Establecer las condiciones fisicoquímicas óptimas para la síntesis del antibiótico con tres diferentes agentes acilantes.
- 3) Determinar la factibilidad técnica de la vía enzimática para la producción de la ampicilina.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Para llevar a cabo la reacción enzimática deben ser considerados los efectos de los siguientes factores:

- 1) Enzima. Propiedades y fuente de obtención
- 2) Sustrato
- 3) Condiciones de pH y temperatura
- 4) Parámetros termodinámicos de la reacción

Enzima

La enzima que lleva a cabo la reacción de síntesis de penicilinas semisintéticas, ha recibido diferentes nombres entre los cuales tenemos: "penicilino amidasa", "penamidasa", "bencil penicilino amidasa ó acila--sa", "enzima de síntesis ó hidrólisis de penicilina" y "bencil penicilino amidohidrolasa" (EC 3.5.1.11) siendo éste último inadecuado por dos razones: 1) es similar al nombre de la penicilina β -lactamasa (ES 3.5.2.6) - que es penicilino amido hidrolasa y 2) sugiere que la bencilpenicilina es el mejor ó el único sustrato de la enzima, lo cual es erróneo. (Hamilton - Miller, 1966). El nombre más usual es el de "penicilino amidasa", siendo éste, como se referirá en el presente trabajo.

Esta enzima es producida por una gran variedad de microorga--nismos, existiendo dos clases de penicilin amidasa, la de tipo I producida por hongos y la de tipo II producida por bacterias. Para la reacción de síntesis e hidrólisis de penicilinas se ha utilizado principalmente la en

zima de tipo II producida por Escherichia coli, Achromobacter sp., Bacillus megaterium, Xanthomonas citri y Kluyvera citrophila.

Entre las diferencias que presentan estas dos enzimas está la especificidad de sustrato. La penicilino amidasa tipo I hidroliza a la Penicilina V a una velocidad mayor que a la Penicilina G, mientras que con la penicilino amidasa tipo II ocurre lo contrario (Hamilton - Miller, -- 1966).

La reacción de síntesis catalizada por la enzima penicilino - amidasa fué demostrada por primera vez por Kaufmann y Bauer (1960) en la obtención de la penicilina G. A partir de este momento se da inicio a -- las investigaciones para la síntesis de diferentes antibióticos semisintéticos por vía enzimática.

La enzima penicilino amidasa ha sido utilizada tanto contenida en los diferentes microorganismos ya sean libres ó inmovilizados; ó -- bien la enzima purificada libre ó inmovilizada.

En los primeros estudios realizados para la síntesis de penicilinas semisintéticas Cole (1969) utiliza células intactas libres de -- E. coli NCIB 8743, mientras que Morikawa (1980) utiliza células inmovilizadas de Kluyvera citrophila con recirculación de medio de cultivo para mantenerlas vivas y aumentar la actividad de la penicilino amidasa.

Sin embargo el número de investigaciones realizadas con enzima purificada superarán a los efectuados con células intactas. La enzima que más ha sido estudiada es la extraída de E. coli. Como se observa en

las investigaciones sobre la reacción de síntesis con la misma enzima son muy pocas en comparación con la reacción de hidrólisis. (Tabla V).

Sustrato

Los sustratos de la enzima en la reacción de síntesis de penicilinas semisintéticas corresponden al 6-APA y al agente acilante. En el caso específico de la ampicilina el agente acilante es el aminoácido fenilglicina.

Sin embargo, la síntesis de ampicilina procede a velocidades mayores cuando son utilizados derivados de la fenilglicina con mayor contenido energético (Cole 1969a). Se ha encontrado que entre los agentes más eficientes están los ésteres metílicos ó etílicos y las amidas de la fenilglicina (Tabla VI).

Cole (1969a) reporta que la síntesis de ampicilina puede llevarse a cabo en poco tiempo sin necesidad de catalizador enzimático, únicamente al utilizar el ácido D- α -aminofenilacetilglicólico; sin embargo el rendimiento aumenta cuando se utiliza a la enzima; mientras que con los demás agentes acilantes no sucede lo mismo, en donde la presencia del catalizador enzimático es imprescindible para llevar a cabo la reacción en un tiempo razonable.

Otro punto importante referente al agente acilante es la relación molar de éste con respecto al 6-APA. Cole (1969a) encuentra que dicha relación debe ser mayor de 1:1 de lo contrario se favorece la reacción de hidrólisis.

Se tiene preferencia en aumentar la concentración de agente acilante, con objeto de mantener un suplemento prolongado de grupos acililos. No obstante éste aumento se encuentra limitado por la baja solubilidad de los agentes acilantes utilizados.

Condiciones de pH y Temperatura para la Reacción de Síntesis

Las condiciones óptimas de pH y temperatura para la síntesis de ampicilina dependen del sistema enzimático y del agente acilante utilizado en la reacción.

Se tiene una gran variedad de valores al respecto, sin embargo, en forma general puede establecerse que la reacción de síntesis es favorecida termodinámicamente a pH ligeramente ácido (5) al emplear el ácido libre de la fenilglicina como agente acilante, mientras que con derivados de éste, el pH es más alto (6.5 - 7.0), lo cual se debe al pK del agente acilante y a la relación existente entre el pH y la energía libre de la reacción (Berezin, 1977).

El pH de la reacción está determinado por una parte por el pH óptimo termodinámicamente que es ácido (5) y por otra parte por el pH de actividad y estabilidad de la enzima que son 8.15 y 6.9 respectivamente. Por tanto el pH debe estar dentro de éste intervalo de valores, para asegurar éxito en la reacción.

Con respecto a la temperatura óptima de dicha reacción; se observa mayor flexibilidad teniendo un rango que oscila entre 25-40°C.

En la Tabla V se puede apreciar la diversidad en valores de pH y temperatura óptimos para la reacción de síntesis llevada a cabo con diferentes sistemas enzimáticos.

Condiciones Termodinámicas de la Reacción

Los parámetros termodinámicos de una reacción son: cambio de energía libre estandar ΔG° , cambio de entropía estandar ΔS° y cambio de entalpía estandar ΔH° , las cuales son definidos como los cambios en cantidades termodinámicas requeridas para producir una mol de cada uno de los productos a partir de los reactantes, cuando los reactantes y productos están en estado estandar, esto es en actividad unitaria (para soluto aproximadamente 1 M). Estas cantidades se obtienen a partir de la constante de equilibrio (K) de la reacción y su dependencia con la temperatura, de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

$$\Delta H^\circ = -R \left(\frac{d \ln K}{dT} \right)$$

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T$$

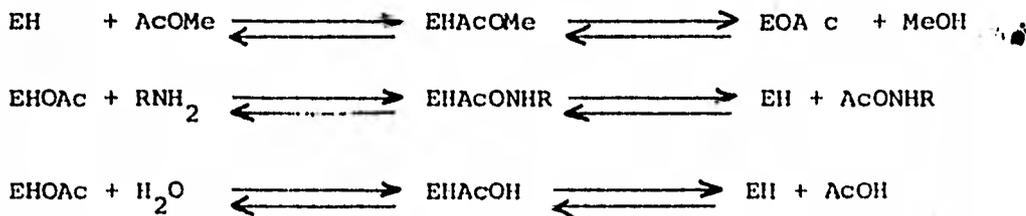
donde R es la constante de los gases y T la temperatura (K°). (Dunnill -- P. 1980).

Los primeros estudios al respecto para la síntesis de penicilinas semisintéticas fueron realizados por Berezin et al. (1977) quien determina el pH óptimo desde el punto de vista termodinámico en base a la relación existente entre el pH y la energía libre de la reacción, encontrando un pH óptimo termodinámico de 4.5 para la síntesis de antibió-

ticos β -lactámicos. Posteriormente Svedas y Berezin (1980) calculan valores de cambios de energía libre estandar ($\Delta G^\circ = -Rt \ln K$) para la hidrólisis de estos antibióticos. También calculan ΔG° dependiente del pH, involucrando microconstantes de ionización y pK de los compuestos. Llegan a la conclusión que no hay razón termodinámica para que la síntesis de estos antibióticos no se lleve a cabo.

No obstante, el rendimiento del producto a un determinado tiempo no sólo depende las condiciones termodinámicas sino de la cinética de la reacción.

Konecny et al. (1980a) propone un mecanismo para que la reacción se lleve a cabo. Este mecanismo consta de dos etapas, involucrando en ambas un intermediario acil-enzima como se muestra a continuación:



donde:

E = Enzima

AcOMe = Ester metílico del agente acilante

RNH₂ = 6-APA

EHAcOMe
EHAcONHR = Intermediario acil-enzima

Como se observa la enzima transfiere el radical acilo al RNH_2 ó H_2O compitiendo ésta última como receptor.

En este caso Kato (1980) hace algunas observaciones:

1. La hidrólisis de AcOMe para dar el ácido está sujeta a inhibición no competitiva por RNH_2 .
2. Al aumentar la concentración de RNH_2 , la velocidad de formación de AcONHR se aproxima a un valor límite igual a la velocidad de la hidrólisis del éster en ausencia de RNH_2 .
3. La suma de las velocidades de formación de AcONHR y AcOH son independientes de la concentración de RNH_2 .

La reacción de síntesis de penicilinas semisintéticas se encuentra limitada por dos aspectos importantes: 1) reversibilidad de la reacción, 2) posible inhibición por producto; lo que conduce a bajos rendimientos en la producción del antibiótico sintetizado.

Svedas et al. (1980a) obtiene en la síntesis de penicilina G un rendimiento no mayor al 15%, utilizando N-fenilacetilglicina como agente acilante y enzima libre.

Hasta el momento no se tiene algún estudio termodinámico y cinético para la reacción de síntesis de penicilinas semisintéticas.

Respecto a los % de conversión de 6-APA a penicilina semisintética, Berezin et al. (1979) y Cole (1966) reportan que se encuentran limitadas por la baja solubilidad del agente acilante. Específicamente para la ampicilina solo se encuentran los valores publicados por Cole (1969a) y Marconi (1975) del 60 y 40% respectivamente.

M E T O D O L O G I A

MATERIAL Y METODOS

La reacción de síntesis de ampicilina se llevó a cabo en --
buffer de fosfatos 0.1 M con células intactas de Escherichia coli --
ATCC 9637 como catalizador enzimático.

La reacción se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer 125 ml con
un volumen de trabajo del 8% a excepción de los últimos experimentos que
se llevaron a cabo en matraces de 1000 ml con un volumen de trabajo del -
10% (100ml). 0.03 % de 6-APA y la cantidad necesaria de agente acilante --
para mantener la relación molar deseada eran solubilizados en el buffer,
posteriormente se adicionaban entre 5 - 10 mg/ml de proteína celular, se
agitaba y se ajustaba el pH. Los matraces Erlenmeyer se colocaban en --
baño de agua con agitación y temperatura controlada.

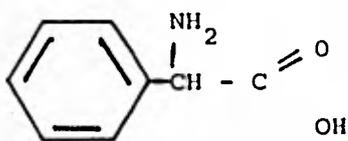
La reacción fue seguida mediante la determinación de la dismi-
nución de uno de los sustratos (6-APA) por el método colorimétrico del --
p-dimetil aminobenzaldehido y la aparición del producto (ampicilina) por
el método espectrofotométrico de Smith, para lo cual se muestreaba cada -
determinado tiempo y se hacían las determinaciones correspondientes.

El tiempo total de duración de la reacción variaba entre 4 a
24 hrs dependiendo del agente acilante probado. Todo experimento y de--
terminación fue llevado a cabo por duplicado y dos veces.

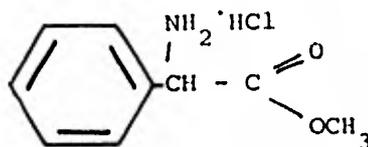
La cepa de Escherichia coli ATCC 9637 fué obtenida de la co--
lección de cepas propiedad del laboratorio donde se llevó a cabo la inves-
tigación. Estas células se reproducían en Medio Mínimo a Temperatura de

29°C, pH de 7 y agitación de 200 rpm, posteriormente se cosechaban mediante centrifugación y se resuspendían en solución salina, manteniéndolas de esta forma a 4°C.

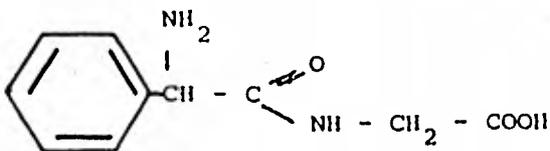
Los agentes acilantes probados fueron tres: el ácido libre de la fenilglicina y dos derivados de éste; el éster metílico y el N-amino --
ácidos:



(1) Fenilglicina



(2) Clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina



(3) N-aminofenil acetilglicina

El compuesto (1) y el 6-APA fueron proporcionados por Sigma, mientras que los compuestos (2) y (3) fueron sintetizados en el laboratorio.

Equipo

1. Balanza analítica cap. 100 g (S 2000) Bosch
2. Baño de agua con agitación rotatoria (Modelo G 76) New Brunswick Scientific Co.
3. Centrífuga clínica 5000 rpm (Sol - Bat). Aparatos Científicos
4. Centrífuga de alta velocidad con refrigeración (Sorvall RC-5 B) Du Pont Instruments.
5. Colorímetro (Spectronic 20) Bausch & Lomb.
6. Espectrofotómetro (Modelo 35) Beckman
7. Potenciómetro (pH meter 125) Cornig

METODOS

I Método p-dimetilaminobenzaldehido para la determinación del 6-APA --
(Balansingham. et. al. 1972).

Fundamento:

Esta determinación se basa en la formación de un compuesto -
de color amarillo (Base de Schiff) resultante de la reacción del grupo -
amino del 6-APA con el carbonilo del p-dimetilaminobenzaldehido, presen-
tando una máxima absorbancia en una longitud de onda correspondiente a -
415 nm.

1) Reactivos

Alcohol etílico absoluto Q.P. (Baker)
p-dimetilaminobenzaldehido Q.P. (Baker)
Acido sulfúrico Q.P. (Baker)

2) Preparación:

Solución de p-dimetilaminobenzaldehido

Disolver 1 g. de p-dimetilaminobenzaldehido en 40 ml. de --
alcohol etílico al 60%, añadir 0.5 ml. de ácido sulfúrico -
concentrado, dejar enfriar y llevar a 100 ml. con alcohol
etílico al 60% (color ligeramente amarillo).

3) Procedimiento:

a. Tomar 0.2 ml de muestra, agregar 4.8 ml. de alcohol --
etílico absoluto.

- b. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos
- c. Decantar y al sobrenadante agregar 2.5 ml del reactivo - p-dimetilaminobenzaldehido; reposar 10 min. y leer a una longitud de onda de 415 nm.
- d. Determinar la densidad óptica de unas muestras de concentración conocida de 6-APA (0-1mg/ml 6-APA), corrigiendo las lecturas de las muestras, por la del blanco de reactivos.
- e. Graficar densidad óptica vs concentración de 6-APA (Fig. 5) para obtener la curva estandar.
- f. Obtener el valor de la concentración de la muestra para - interpolación en la gráfica.

II Método espectrofotométrico para la determinación de Ampicilina (Smith et al., 1967).

Fundamento:

Se basa en la formación de un compuesto entre el ión cobre y parte de la molécula de 6-APA que presenta máxima absorbancia a 320 nm. Siendo fundamentales en la determinación la temperatura y el tiempo de calentamiento. No se tiene interferencia en esta determinación de otras penicilinas o de 6-APA.

1) Reactivos:

Fosfato de sodio dibásico Q.P (Baker)
Acido cítrico Q.P. (Baker)
Sulfato de cobre $\cdot 5 H_2O$ Q.P. (Baker)

2) Preparación:

2.1) Solución 0.393% de sulfato de cobre

Pesar 393 mg. de sulfato de cobre, disolverlos y aforar a --
100 ml con agua destilada.

2.2) Solución buffer pH 5.2 de sulfato de cobre.

a) Disolver 15.22 gr. de fosfato de sodio dibásico en agua
para obtener 536 ml.

b) Disolver 10.5 de ácido cítrico en 500 ml. de agua.

c) Agregar la solución (b) a la solución (a) hasta que el -
pH sea de 5.15 a 5.25 (+ 436 ml.).

d) Tomar 985 ml. de la solución anterior para mezclarla con
15 ml. de la solución de sulfato de cobre y obtener un -
litro.

3) Procedimiento:

a. Pesar 100 mg. de ampicilina anhidra

b. Disolver y diluir a 100 ml. con agua destilada.

c. Pipetear 2 ml. a un matraz.

d. Diluir y aforar a 100 ml. con solución buffer pH 5.2 de
sulfato de cobre (d).

e. Tomar 10 ml. en un matraz aforado de 10 ml.

f. Calentar 30 min. a 75°C en baño de agua.

g. Enfriar rápidamente en baño de agua de hielo hasta alcan-
zar temperatura ambiente.

h. Si es necesario, ajustar el volumen a 10 ml. con agua --
destilada.

- i. Medir la densidad óptica a 320 nm. en celda de 1 cm. usando como referencia la solución que no se calentó.
- j. Determinar la densidad óptica de unas muestras de concentración conocida de ampicilina (0-200 ug./ml de ampicilina) para obtener la curva standar graficando densidad óptica vs. concentración (Fig. 6).
- k. Por interpolación en gráfica se obtiene el valor de la concentración de la muestra.

Para determinar posible interferencia de alguno de los constituyentes en la mezcla de reacción en la determinación de ampicilina a 320 nm., se llevaron a cabo los siguientes controles que consisten en:

- I Buffer + células + 6-APA
- II Buffer + células + ampicilina
- III Buffer + células + agente acilante
- IV Buffer + 6-APA
- V Buffer + células
- VI Buffer + agente acilante

III Método de Bioensayo para determinar Ampicilina (Pharmacopeia XIX E.U., 1976).

Fundamento:

Es un método alternativo para la determinación de ampicilina que se basa en la inhibición del crecimiento de un microorganismo muy sensible al antibiótico a determinar.

La inhibición del crecimiento será directamente proporcional a la concentración del antibiótico.

1) Reactivos:

Bacto peptona	(Difco)
Bacto Dextrosa	(Difco)
Extracto de carne	(Difco)
Agar	(Difco)
Cloruro de sodio Q.P.	(Baker)
Fosfato de potasio monobásico Q.P.	(Baker)
Fosfato de potasio dibásico Q.P.	(Baker)
Microorganismo: <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341.	
Discos Analytical Paper. "# 740-E 1/2"	

2) Preparación:

2.1) Agar nutritivo

Formulación:

Peptona	5 g.
Dextrosa	5 g.
Extracto de carne	3 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	p/1000 ml.

Disolver todos los ingredientes y ajustar el volumen a 1000 ml y el pH a 7.3

2.2) Buffer fosfatos 0.1 M pH de 8. Pesar 58.555 g. de --
fosfato de potasio dibásico y 1.8305 g. de fosfato de pota--
sio monobásico; disolverlos en 100 ml. de agua destilada y -
aforar a 1000 ml.

2.3) Cajas Petri. Vertir 10 ml. del medio agar nutritivo -
en cada caja Petri.

3) Procedimiento:

- a. Colocar los discos de papel en una caja de Petri inverti
da.
- b. Aplicar la muestra diluída a cada disco (20 ul).
- c. Transferir los discos a las cajas con el medio solidifica
do con pinzas estériles, presionando firmemente.
Todos los discos deberán ser colocados dentro de 1 a 2 --
minutos. Dejar las cajas 2 hrs. a 4°C para que la difu--
sión de la muestra se lleve a cabo.
- d. Rociar homogéneamente una suspensión del microorganismo -
(Sarcina lutea (crecida en medio infusión de cerebro-cora
zón), sobre la superficie de la caja y colocarlas en su--
perficie horizontal a 37°C durante 24 hrs.
- e. Realizar una curva estandar de 0 - 50 ug/ml. de ampicilina,
procediendo de igual forma que en muestras desconocidas.
Las diluciones se llevan a cabo con buffer de fosfato --
0.1 M pH de 8. Graficar logaritmo de la concentración --
vs. diámetro de la zona de inhibición (Fig. 7).

- f. Determinar el diámetro de la zona de inhibición e interpolarlo en la curva estandar para obtener la concentración del antibiótico.

IV. Determinación de solubilidad

1) Reactivos:

Acetato de Etilo Q.P.	(Baker)
Acetato de Butilo Q.P.	(Baker)
Dioxano Q.P.	(Baker)
Isopropanol Q.P.	(Baker)
Ampicilina Q.P. (Quinonas de México)	
Fenilglicina Q.P.	(Sigma)
6-APA Q.P.	(Sigma)

2) Procedimiento:

Adicionar de gramo en gramo la sustancia a probar (ampicilina, fenilglicina, 6-APA) a 100 ml. de disolvente a temperatura de 40°C; agitar durante 10 minutos, filtrar en papel filtro Watman # 1 previamente pesado, secar en estufa, pesar y por diferencia obtener la cantidad de sustancia no solubilizada.

V. Obtención de Células de Escherichia coli ATCC 9637

Las células de Escherichia coli ATCC 9637 fueron crecidas en medio Mínimo y medio Luria, pH de 7 y temperatura de 29°C durante 72 hrs. a 200 rpm; posteriormente se centrifugan y determina su actividad específica de hidrólisis de la enzima penicilino amidasa como índice de la --

existencia de dicha enzima.

Formulación del Medio:

Mínimo		Luria	
	g/l		g/l
$K H_2 PO_4$	1.3	Extracto de levadura	5
$Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$	0.2	Peptona	10
K_2SO_4	2.6	Cloruro de sodio	10
$Ca Cl_2$	0.1	Fenil acético	2
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.0005		
$NH_4 Cl$	8		
Fenil acético	2		
Agua destilada	p/1000 ml.		

Las células se conservaban en suspensión con solución salina (0.9%) a 4°C.

VI. Determinación de la Actividad Enzimática Específica de Hidrólisis en Células de Escherichia coli

Fundamento:

Esta determinación de la actividad de hidrólisis se basa en - que la enzima hidroliza el enlace peptídico de la penicilina, dando como productos el ácido fenilacético el 6-APA, éste último es cuantificado por el método p-dimetilaminobenzaldehído referido con anterioridad.

1) Procedimiento

- a. Tomar 10 ml. del medio del cultivo con células y centrifugar a 300 rpm durante 15 minutos.
- b. Decantar y resuspender en 1 ml. de buffer de fosfatos -- 0.03 M pH de 8.
- c. Tomar 0.01 ml. para determinar proteína.
- d. Agregar 0.1 ml. de penicilina para tener una concentración inicial de 25 mM en la reacción.
- e. Mantener la mezcla de reacción por espacio de 30 minutos, a una temperatura de 40°C.
- f. Tomar 0.2 ml. de muestra y proceder conforme el método -- para la determinación de p-dimetilaminobenzaldehído.

El control de células se hace tomando 0.2 ml. de la mezcla de reacción en el momento en que se pone en baño de 40°C.

La unidad específica de la enzima se reporta como:

$\frac{\mu\text{Moles de 6-APA}}{30 \text{ min. mg. proteína}}$ a temperatura de 40°C pH de 8. (Casas T., 1981).

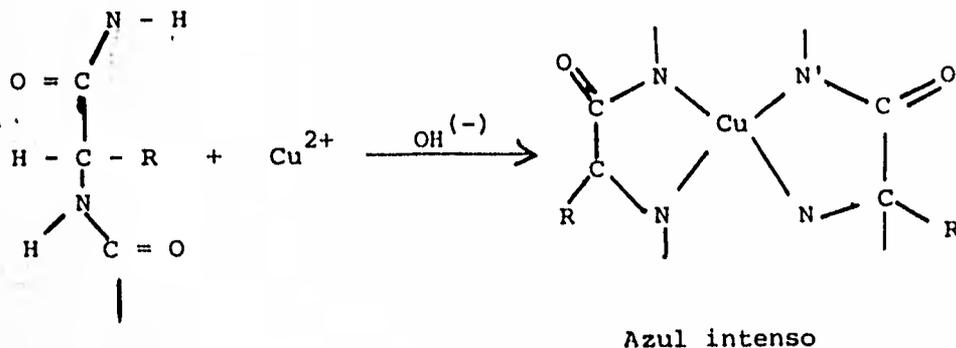
VII. Determinación de Proteína

Esta determinación se lleva a cabo por el método de Lowry -- (Lowry et al., 1951). Es uno de los métodos más sensibles (0-200 ug/ml - de Proteína), siendo 10 veces más sensible que el de Biuret.

Fundamento:

Método colorimétrico. La coloración final es el resultado --

de una reacción de Biuret; de la proteína con el ión Cu^{2+} en medio alcalino y una reducción del reactivo fosfonolibdicofosfotúngstico por la tirosina y el triptófano de la proteína.



1) Reactivos:

$\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ Q.P.	(Baker)
$\text{Na}_2 \text{CO}_3$ Q.P.	(Baker)
Na OH Q.P.	(Baker)
Tartrato de Sodio y Potasio Q.P.	(Baker)
Folin Q.P.	(Sigma)

2) Preparación de soluciones:

- 2.1) Solución A. Pesar 2 g de $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ y aforar a 100 ml. -- con Na OH 0.1 N
- 2.2) Solución B. Pesar 0.5 g de $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y aforar a -- 100 ml. con agua destilada.
- 2.3) Solución C. Pesar 1 g de tartrato de sodio y potasio, aforar a 100 ml. con agua destilada.

- 2.4) Mezcla D. Solución C + solución B 1:1
- 2.5) Mezcla E. Tomar 1 ml. de la mezcla D y agregar 50 ml. de la solución A. Desechar después de 24 hrs.
- 2.6) Reactivo de Folin. Diluir 1:2 con agua destilada antes de usarla.

3) Procedimiento:

- a. Tomar 1 ml. de muestra y añadir 5 ml. de la mezcla E -- agitar y reposar 10 min.
- b. Añadir 0.5 ml del reactivo de Folin, diluido, agitar y -- reposar 30 min.
- c. Leer a 590 nm. Corregir lecturas con blancos de reactivos.
- d. Determinar la densidad óptica de diferentes concentraciones de proteínas 0-200 ug/ml. de albúmina. Graficar densidad óptica vs curva estandar (Fig. 8).

VIII. Determinación de Proteína en Suspensión de Células

Tomar 0.01 ml. de la suspensión y aforar a 1 ml. con agua -- destilada, seguir procedimiento anterior.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

Producción de la Enzima

Con objeto de seleccionar el medio para producir las células de E. coli ATCC 9637 que contienen a la enzima penicilino amidasa, se probaron dos medios determinando crecimiento celular y actividad enzimática de hidrólisis con relación al tiempo.

Los medios probados fueron medio Luria con fenilacético como inductor de la enzima y medio Mínimo con fenilacético como única fuente de carbono e inductor de la enzima. El crecimiento microbiano se siguió mediante el incremento en densidad óptica a 540 nm y la actividad enzimática se determinó de acuerdo a lo establecido en la sección de Materiales y Métodos.

Se encontró que la actividad enzimática específica en ambos medios presenta la misma tendencia; esto es, disminuye durante la fase lag de crecimiento, siendo mayor esta disminución en el medio Luria que en el medio Mínimo, posteriormente permanece constante a lo largo de la fase de crecimiento (Fig. 9 y 10). La velocidad de crecimiento en medio Mínimo es 4 veces menor que la presentada en medio Luria, sin embargo la actividad enzimática de las células en ese medio es 2-3 unidades mayor.

De acuerdo a estos resultados, se utilizó el medio Mínimo en la producción de células, las cuales eran cosechadas antes de llegar a la fase estacionaria, correspondiente a una densidad óptica de 2, lo que ocurre entre 36 - 48 hrs de fermentación.

Medios para la Reacción de Síntesis de Ampicilina

Como fué señalado en los antecedentes, uno de los factores limitantes en la síntesis de ampicilina, es la baja solubilidad en agua del agente acilante, lo que condujo a evaluar la posibilidad de llevar a cabo la reacción en medio no acuoso, presentando así una ventaja en la separación del producto si éste ~~era~~ insoluble, mientras los sustratos fuesen -- solubles.

Para tal propósito, se determinó la solubilidad de los reactivos (6-APA y fenilglicina) y producto (ampicilina) en cuatro disolventes orgánicos seleccionados en base a facilidad de manejo y disponibilidad -- (ver Sección de Material y Métodos para más detalles).

Se encuentra que tanto en el acetato de etilo como en el de - butilo los reactivos y productos permanecen insolubles; en el dioxano, la fenilglicina y ampicilina son solubles, más no así el 6-APA; mientras que en el isopropanol, el 6-APA y ampicilina son solubles pero no la fenilglicina. (Tabla VII). Como se puede observar en ninguno de los disolventes probados se obtuvo la condición buscada (sustratos solubles) decidiéndose llevar a cabo la reacción en medio acuoso.

Condiciones de pH y Temperatura para la Reacción de Síntesis de Ampicilina con Diferentes Agentes Acilantes

Como fué señalado en Material y Métodos se probaron tres agentes acilantes para llevar a cabo la reacción de síntesis. El aminoácido fenilglicina y dos derivados de éste el N-aminofenilacetilglicina y el --

clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina.

Aminoácido Fenilglicina

La reacción de síntesis de ampicilina se llevó a cabo con la fenilglicina como agente acilante, en un rango de pH de 5-6.5 y temperatura de 30 - 35°C.

Como se mencionó anteriormente la reacción se siguió mediante la aparición de ampicilina determinada por método espectrofotométrico.

Se observa que la densidad óptica permanece constante tanto en el matraz de reacción como en los controles, durante todo el tiempo en que se llevó a cabo la reacción (Fig. 11), presentándose la misma situación en todas las combinaciones de pH y temperatura, lo cual implica que la reacción de síntesis no procede con dicho agente acilante.

N-aminofenilacetilglicina

En esta ocasión la reacción de síntesis de ampicilina se llevó a cabo con el segundo agente acilante N-aminofenilacetilglicina, en un rango de pH de 5.5 a 7.5 y temperatura de 35°C.

La densidad óptica permaneció constante tanto en el matraz de reacción como en los controles, durante todo el tiempo de reacción (Fig. 12). Como en el caso anterior tampoco se tienen síntesis de ampicilina con este agente acilante.

Clorhidrato del Ester Metílico de la Fenilglicina

Por último la reacción de síntesis de ampicilina se llevó a cabo con el segundo derivado de la fenilglicina (éster metílico) en un rango de pH de 5-6 y temperatura de 25 - 40°C.

Se observa que a pH de 5 la densidad óptica de la mezcla de reacción y controles permanece constante por lo que no hay síntesis de ampicilina; mientras que a pH de 5.5 la densidad óptica de la reacción aumenta y la de los controles permanece constante este aumento corresponde a 23.3 ug/ml de ampicilina sintetizada y a pH de 6 la cantidad de ampicilina sintetizada disminuye a 6.9 ug/ml. (Fig. 13).

Una vez fijado el pH óptimo se procedió a determinar la temperatura óptima; para lo cual se llevó a cabo la reacción de síntesis de ampicilina a pH de 5.5 en un rango de temperatura óptima de 25 - 40°C. Encontrándose que la temperatura óptima para la síntesis de ampicilina es de 35°C. (Fig. 14).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el punto anterior (Tabla VIII); se tiene que el clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina es el único agente acilante de los tres probados con el que se puede llevar a cabo la reacción de síntesis de ampicilina por vía enzimática. Las condiciones óptimas son: temperatura de 35°C y pH 5.5, siendo éste último un factor determinante para la reacción. La conversión molar de 6-APA a ampicilina bajo estas condiciones correspondió a 5.15%.

Dado lo anterior, el estudio de la reacción de síntesis se -
llevó a cabo con el clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina. -
Se procedió a determinar la energía de activación y el efecto de la con-
centración de agente acilante en la reacción de síntesis.

La energía de activación de una reacción se obtiene a partir
de la ecuación de Arrhenius expresada como:

$$v = \Lambda e^{-E_a/RT}$$

donde:

v = velocidad de reacción

Λ = constante de activación

E_a = energía de activación

R = constante universal de los gases
1.98 cal/mol °K

T = Temperatura (°K)

Al graficar $\ln(v)$ vs. $1/T$ se obtiene una recta cuya pendiente
corresponde a $-E_a/RT$ y de ésta ecuación se obtiene el valor de la energía
de activación. (Laidler R. and Bunting S., 1981).

La energía de activación de la reacción de síntesis de ampici
lina llevada a cabo con el clorhidrato del éster metílico en las condicion
es óptimas presenta un valor de 21.246 Kcal/mol. (Fig. 15).

Efecto de la Concentración de Agente Acilante sobre la Velocidad de Reacción en la Síntesis de Ampicilina

Con objeto de determinar la influencia de la concentración de agente acilante en la reacción de síntesis de ampicilinas se llevaron a cabo experimentos en los cuales se varió la cantidad del agente acilante.

Las concentraciones probadas del éster metílico fueron de 2.7, 5.5, 8.3 y 11 μM , la del 6-APA de 1.3 μM permaneciendo constante en todos los experimentos realizados. La reacción de síntesis se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura obtenidas anteriormente.

En todos los experimentos se registró el mismo valor máximo de concentración de ampicilina sintetizada (15.13 $\mu\text{g/ml}$) y la posterior disminución, lo que indica que la cantidad máxima de ampicilina sintetizada es independiente de la concentración de agente acilante que se tenga; no así la velocidad inicial la cual aumenta conforme se incrementa la concentración de agente acilante. En el caso de la concentración de 2.7 μM del éster correspondiente a una relación molar de 1:2 de 6-APA/ agente acilante, la velocidad de reacción es muy baja y aún a las 5 hrs. no se llegó al valor máximo de ampicilina sintetizada (Fig. 16).

Al graficar Log. de la velocidad inicial (V_0) vs. tiempo (Fig. 17), se observa que la V_0 depende de la concentración del sustrato y va aumentando hasta llegar a un valor máximo constante, el cual ya es independiente de la concentración del sustrato. La velocidad inicial --

máxima alcanzada en la reacción de síntesis fué de 0.125 ug ampilina/ml. min., teniéndose 4.5% de conversión molar de 6-APA a ampilina.

Uno de los aspectos importantes en el estudio de la reacción de síntesis es el hecho de llegar a un valor máximo en la concentración de ampilina y su posterior disminución, lo que se presentó en todos los experimentos realizados a mayor ó menor tiempo dependiendo de la concentración de agente acilante que se tuviera. Esto condujo a pensar en la probabilidad de tres situaciones: posible inhibición por producto ya que no siempre la disminución era inmediata, degradación del producto ó reversibilidad de la reacción.

Efecto de la Concentración Inicial de Ampilina en la Síntesis de esta

La reacción de síntesis de ampilina se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas obtenidas con el éster metílico de la fenilglicina, sin embargo en esta ocasión son adicionadas 5, 15, 25 ug/ml de ampilina al inicio de la reacción, con objeto de observar el efecto de la concentración del producto en la reacción de síntesis.

Se observó (Fig. 18) que la cantidad de ampilina sintetizada y velocidad inicial de la reacción disminuyen a medida que aumenta la concentración de ampilina inicial y cuando ésta concentración es alta ya no se tiene síntesis de ampilina (Tabla IX).

Para comprobar la reversibilidad de la reacción se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de ampilina bajo las mismas condiciones

en que se efectuaron los experimentos anteriores; esto es, pH de 5.5, temperatura de 35°C y concentración inicial de ampicilina de 25 ug/ml. En este caso además de los controles antes mencionados se llevó a cabo otro, consistiendo únicamente en ampicilina más buffer de fosfatos 0.1 M pH de 5.5.

Se observó disminución en la densidad óptica en el matraz de reacción; mientras que en los controles permaneció constante, lo que significa que la ampicilina bajo esas condiciones es estable y que la desaparición de ampicilina es debida únicamente a la hidrólisis enzimática --- (Fig. 19).

Una vez establecidas las condiciones de pH, temperatura, relación molar 6-APA/agente acilante y haber estudiado la reacción de síntesis, se pretendía entre los objetivos fijados, realizar la reacción en cantidades mayores.

La reacción se llevó a cabo en un volumen mayor 1:10 (100 ml.) a los efectuados ordinariamente manteniendose las mismas condiciones de pH y temperatura, una relación molar 6-APA/agente acilante de 1:8 ya que con ésta relación se obtuvo la velocidad inicial máxima. La concentración de proteína celular así como la del 6-APA se mantuvo en la misma proporción que en los experimentos anteriores.

La tendencia observada en esta ocasión fué igual a los experimentos anteriores. Se llegó a un valor máximo de ampicilina sintetizada que en este caso correspondió solo al 3% de conversión molar de 6-APA y posteriormente este valor disminuye (Fig. 20) por tal motivo no fué posi-

ble llevar a cabo la separación y purificación del producto. La conver--
sión máxima alcanzada correspondió al 60% de la lograda en experimentos -
anteriores.

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

El sistema catalítico seleccionado para llevar a cabo la reacción de síntesis de ampicilina por vía enzimática consistió en células intactas de Escherichia coli ATCC 9637 que contienen a la enzima penicilino amidasa, la cual es la responsable de la acilación del 6-APA. Anteriormente en el laboratorio donde se desarrolló éste trabajo se utilizó ese sistema para el estudio de la reacción de hidrólisis de la Penicilina G, llegando hasta nivel planta piloto. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios tanto en el aspecto técnico como económico (Casas, 1981); -- por lo que se creyó conveniente continuar la investigación de la reacción inversa (síntesis) con el mismo sistema catalítico, además del aporte académico que esto presentaría, puesto que se trata de una reacción entre dos sustratos y la enzima para dar el producto y no la típica reacción descrita por Michaelis Menten:



Para la producción del catalizador enzimático se utilizó el medio Mínimo con fenilacético como única fuente de carbono e inductor en la biosíntesis de la enzima penicilino amidasa. En este medio la velocidad de crecimiento fué muy baja, (0.15 hr^{-1}) sin embargo, la actividad específica enzimática de hidrólisis en estas células es 2-3 unidades mayor que la presentada por las células crecidas en medio rico.

Mediante el estudio de la curva de crecimiento fué posible - determinar el tiempo en que las células deberían ser cosechadas para tener tanto la máxima actividad enzimática como la máxima cantidad de células.

Si bien no se conoce y no fué posible determinar una correlación entre la actividad de hidrólisis y la actividad de síntesis de la - enzima penicilino amidasa, la determinación de la actividad de hidrólisis sirvió como indicador de la existencia de la enzima en la célula.

La actividad enzimática específica de hidrólisis en las células, no se mantuvo constante a lo largo de la investigación; presentó - una relación inversa al tiempo de almacenamiento a 4°C, lo cual puede ser causa de la autólisis de las células y/o la acción de enzimas proteolíticas. Lo anterior repercute notablemente en la reproducibilidad de los - resultados. Para minimizar este problema, se procuró trabajar con lotes de células recién cosechadas.

Respecto a la metodología utilizada en éste trabajo pueden - hacerse algunas observaciones.

En un principio se pensó seguir la reacción de síntesis de - ampicilina mediante la determinación de la disminución de uno de los sustratos y de la aparición del producto.

El sustrato (6-APA) sería determinado por el método colorimétrico p-dimetilaminobenzaldehído y la ampicilina por el método espectrofotométrico de Smith; sin embargo, esto no fué posible dada la baja sensibilidad del primer método, con el cual no se alcanzó a detectar las --

bajas disminuciones que se tenían de 6-APA.

Por tanto se pensó en un método alterno para verificar la -- presencia de ampicilina, el bioensayo; pero en éste método se tuvo la interferencia por la antibiosis que producía el 6-APA que si bien es poca comparada con la producida por la ampicilina, obstaculizaba la determinación de ésta, debido a la gran cantidad en que se encontraba este ácido respecto al antibiótico sintetizado en la mezcla de reacción.

Por consiguiente la reacción de síntesis de ampicilina se -- siguió únicamente mediante la aparición del producto, llevando a cabo -- los controles necesarios para eliminar cualquier interferencia y asegu-- rar que la lectura que se tuviera correspondiera solamente a la ampicilina.

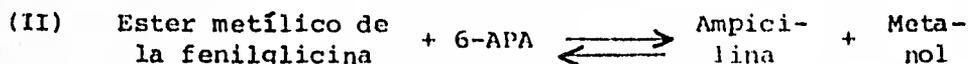
Uno de los aspectos más importantes en el estudio de las reacciones ya sean de hidrólisis o síntesis es el energético. El estudio -- previo de las condiciones termodinámicos como son la energía de activa-- ción y energía libre de Gibbs, revela apriori la dificultad que se tendrá para llevar a cabo la reacción. La energía de activación (E_a) es la barrera energética que los reactantes tienen que alcanzar para que se forme el complejo activado para dar después el producto; dicha E_a es abatida con el uso de catalizadores y la energía libre de Gibbs es la ener-- gía requerida o liberada en una reacción.

Las reacciones de síntesis requieren de un suministro de -- energía y salvo el caso de la enzima dextransacarasa, en donde la misma hidrólisis del sustrato proporciona la energía necesaria para la síntese--

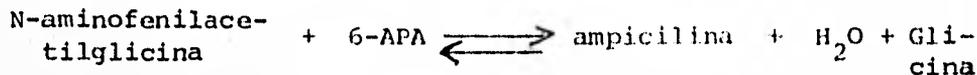
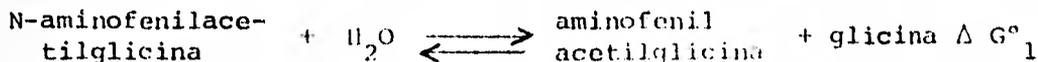
sis presenten muy poca aplicación comparada con las reacciones de hidrólisis.

En la Tabla X se tienen diferentes valores de E_a para algunas reacciones de síntesis e hidrólisis, al comparar el valor de la E_a obtenido para la reacción de síntesis de ampicilina, éste se encuentra dentro de los valores altos lo cual refleja la dificultad de llevar a cabo esta reacción.

La reacción de síntesis de ampicilina con dos de los agentes acilantes utilizados pueden representarse como:



Para cualquiera de estas reacciones el cambio de energía estandar de Gibbs total (ΔG°) será igual a la suma de la energía estandar de Gibbs de la hidrólisis del derivado del ácido (ΔG°_1) y el cambio de la energía estandar de Gibbs de la síntesis de ampicilina (ΔG°_3) esto es:



$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ}_1 + \Delta G^{\circ}_3$$

Desafortunadamente no se tienen reportados en la literatura - valores de ΔG°_1 para la hidrólisis de estos compuestos, sin embargo se - puede dar una idea de estos al observar el ΔG° para compuestos del tipo N-aminoácidos y ésteres como el N-fenilacetilglicina y el éster etílico - del fenilacético (Svedas et al., 1980).

En caso del N-fenilacetilglicina el ΔG°_1 de hidrólisis es de 1.7 KJ/mol con lo cual el cambio de energía estandar de Gibbs total -- (ΔG°) para la reacción del tipo I será aproximadamente igual al cambio de la energía de síntesis de ampicilina (ΔG°_3) de tal forma, desde el - punto de vista termodinámico la acilación con éste compuesto no presenta ventajas sobre la acilación con el ácido libre.

Respecto al éster etílico del fenilacético, su hidrólisis pre senta un ΔG°_1 de -21 KJ/mol, con lo que la energía estandar de Gibbs to- tal (ΔG°) para la reacción del tipo II disminuye, siendo ventajoso el -- uso de éste tipo de derivados.

Por lo expuesto anteriormente es razonable que la reacción -- haya procedido únicamente con el éster metílico de la fenilglicina y no - con el N-aminofenilacetilglicina, ni con la fenilglicina. No obstante se han reportado a los N-aminoácidos como buenos agentes acilantes (Cole, -- 1969a).

El por ciento de conversión molar de 6-APA a ampicilina obtenido fué de 5.15 que si se compara con el 85% obtenido por vía química - resulta bajo, eliminando de esta forma la posibilidad de que la producción de ampicilina se lleve a cabo por la vía enzimática.

Por otra parte, si se compara el resultado obtenido con los reportados en la literatura (Tabla XI) para la síntesis de ampicilina se observa una disminución del 92% con respecto al de Cole y del 88% con respecto al de Marconi, sin embargo, es necesario hacer algunas observaciones.

Con respecto a la investigación realizada por Cole; el presente trabajo tiene las siguientes similitudes:

- a) catalizador (enzima contenida en células completas)
- b) temperatura (35°C)
- c) relación molar 6-APA/éster metílico de la fenilglicina (1:4)

teniéndose diferencias en el pH y el tiempo de reacción.

En la presente investigación, la reacción de síntesis no se llevó a cabo en el pH de 7 reportado como óptimo por Cole; además de que éste parámetro fué determinante para que esta reacción procediera; ya que con un aumento de 0.5 unidades en el pH óptimo (5.5) se observa que el por ciento de conversión disminuyen en un 80% y a pH de 5 no hay síntesis.

Respecto al tiempo de reacción, para Cole fué de una hora, mientras que para nosotros la máxima conversión se logró hasta las dos horas. Esto podría deberse a la cantidad de enzima activa; no obstante, este parámetro no puede ser comparado dado que no se tiene aún una unidad

de actividad de síntesis definida para la enzima penicilino amidasa. Por último, cabe señalar que la identificación de ampicilina en el trabajo de Cole fué llevada a cabo por el método del bioensayo; sin embargo, la concentración de 6-APA a la cual él trabaja que es de 1% con una dilución -- 1:100 para la determinación de la antibiosis, al realizar nosotros el bioensayo presentó un halo de inhibición superior a los 5 cm de diámetro -- (Fig. 7) interfiriendo por tanto con el halo de antibiosis producido por la ampicilina.

Respecto a lo informado por Marconi la comparación no es buena ya que él utiliza a la enzima inmovilizada como catalizador. Como se encuentra en la literatura la inmovilización de la enzima generalmente cambia las condiciones de pH y temperatura óptimas así como la actividad de ésta (Quintero, R., 1981); no obstante, este cambio no es tan drástico como para lograr por cientos de conversiones más altos que los obtenidos al trabajar con la enzima libre. En el trabajo de Marconi, la identificación de ampicilina se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de Smith. Hay que tener presente que en dicho método los sustratos (6-APA y éster metílico de la fenilglicina) en concentraciones superiores al 0.05% fácilmente interfieren en la determinación de la ampicilina alterando la lectura; Marconi no hace mención del uso de controles y trabaja con concentraciones superiores a ese valor.

Por último, se tiene el resultado obtenido por Svedas et al, (1980) aunque para la síntesis de Penicilina G logrando una conversión máxima - del 15%.

No puede hacerse una comparación de nuestro resultado obtenido con éste, dado que se trata de diferentes antibióticos; no obstante, - este trabajo es el único que lleva a cabo un estudio detallado de la ciné-
tica de la reacción de síntesis de antibióticos β -lactámicos y da una --
idea del orden de magnitud de los posibles porcentos de conversión obtenidos en dicha reacción. Por tanto el porcentaje de conversión máximo encontrado en la presente investigación se encuentra dentro de lo predicho por Svedas.

Las condiciones de pH y temperatura encontradas como óptimas para la reacción de síntesis de ampicilina están dentro de los valores -- reportados (Tabla V). El valor de pH óptimo confirma el hecho de que la reacción de síntesis de los antibióticos β -lactámicos se lleve a cabo en pH ligeramente ácido, mientras que la reacción de hidrólisis a pH alcalino preferentemente.

Hay que enfatizar que el pH es determinante para la síntesis del antibiótico, pues 0.5 unidades abajo del pH óptimo la reacción no pro
cede (Fig. 13), lo cual refleja la importancia de la concentración de las especies iónicas involucradas en ésta reacción.

Uno de los aspectos que cobró mucha importancia al inicio de la investigación fué la relación molar 6-APA/agente acilante. En la litera-
tura (Cole, 1969a; Berezin et al., 1977) se reporta que la cantidad de am
picilina sintetizada dependía de la relación molar 6-APA/agente acilante, de tal forma que al aumentar la cantidad del agente acilante se podía ob-
tener hasta un 95% de conversión molar del 6-APA y por tanto el por cien-

to de conversión del 6-APA estab limitado por la solubilidad del agente - acilante.

Sin embargo de los experimentos llevados a cabo se encontró - que el por ciento de conversión máximo de 6-APA a ampicilina es indepen-- diente de la relación molar 6-APA/agente acilante (Fig. 16); no así la -- velocidad inicial de la reacción la cual sí depende de dicha relación.

$$\frac{d \text{ Ampicilina}}{dt} \propto [6\text{-APA}] [\text{agente acilante}]$$

Por consiguiente la solubilidad del agente acilante no es la principal limitante para la obtención de por cientos de conversión altos, como fué mencionado por Cole.

Por último se puede notar que en la reacción de síntesis es- tudiada se tuvo inhibición por producto, ya que la velocidad de síntesis disminuye conforme aumenta la concentración inicial de ampicilina (Tabla IX). Kato reporta tanto inhibición por producto como por sustrato de la enzima, penicilino amidasa extraída de Xanthomona citri, en nuestro caso no se estudió la inhibición por sustrato.

La reversibilidad de la reacción de síntesis es confirmada - por dos hechos: 1) la cantidad de ampicilina sintetizada llega a un va- lor máximo y posteriormente disminuye, esto se presenta en todos los expe- rimentos realizados. 2) La reacción de hidrólisis enzimática de ampici- lina procede en las condiciones óptimas de la reacción de síntesis. La - reacción de hidrólisis se encuentra más favorecida que la reacción de sín- tesis, teniendose menor velocidad para ésta última, lo que se observa al

comparar las pendientes para ambas reacciones (Fig. 20).

Por una parte dada la naturaleza de la estructura del antibiótico, el presentar grupo amino y carboxilo y por otra parte el hecho de que sea una reacción reversible y se presente inhibición tanto por sustrato como por producto complica la obtención de una ecuación que modele la cinética de ésta reacción.

Como se mencionó anteriormente Svedad et al. (1980a) obtiene un modelo matemático para describir la síntesis de la Penicilina G; por medio de éste modelo se podría predecir las condiciones óptimas, así como las concentraciones de los sustratos para lograr el máximo % de conversión y hace la observación que para la ampicilina el sistema se vuelve más complejo dado que el número de especies iónicas involucradas en el equilibrio, aumentan a causa de la presencia del grupo amino en el éster.

Por último nos referiremos a los resultados obtenidos al llevar a cabo el escalamiento 1:10 si bien se observó igual tendencia que en los experimentos anteriores; esto es, disminución de la concentración de ampicilina sintetizada después de llegar a un valor máximo, el porcentaje de conversión molar de 6-APA, disminuyó en un 40% con respecto a los obtenidos a menor escala. No se tiene una explicación satisfactoria para éste resultado, podría deberse a la falta de un estudio detallado tomando en cuenta la influencia de factores como la agitación para llevar a cabo el escalamiento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Es factible llevar a cabo la reacción de síntesis de ampicilina por vía enzimática.
- 2) La enzima penicilino-amidasa cataliza tanto la reacción de hidrólisis como de síntesis de antibióticos β -lactámicos.
- 3) La determinación de ampicilina en el medio de reacción mediante el método de Smith presenta gran dificultad; por lo que es indispensable llevar a cabo los controles necesarios para verificar su síntesis, ya que no se tiene otro método adecuado para su determinación.
- 4) El pH óptimo para la reacción de síntesis de estos antibióticos es -- ligeramente ácido (5-6) mientras que para la hidrólisis es básico -- (7-8).
- 5) El uso de derivados del ácido con alto contenido energético como agente acilante favorece la síntesis del antibiótico. En la presente investigación, el clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina fué el agente acilante más adecuado de los tres compuestos probados.
- 6) La reacción de síntesis de ampicilina no se encuentra limitada por la solubilidad del agente acilante, sino por parámetros termodinámicos y cinéticos de la reacción.
- 7) La relación 6-APA/Ag acilante afecta directamente a la velocidad inicial de la reacción, más no así al % de conversión de 6-APA a ampicilina que se obtiene. Siendo 1:8 la relación con la cual se obtiene la máxima velocidad inicial.

- 8) El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la hidrólisis.
- 9) El % de conversión molar máximo de 6-APA a ampicilina obtenido por --
vía enzimática fué de 5.15; mientras que por la vía química se logra
un 85%, impidiendo por tanto una competencia entre ambas vías.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- Balansingham K., Warburton D., Durnill P. y Lilly D.M.: The isolation and kinetics of penicillin amidase from Escherichia coli. Método para medir 6-APA. *Biochimica et Biophysica Acta* 276: 250-256 (1972).
- Berezin V.L., Margolin L.A. y Shvyadas K. Yu.: Enzymatic synthesis of antibiotics. Investigation of the hydrolysis-synthesis of cephalotin catalyzed by penicillin amidase. *Doklady Akad Naur SSSR* 235: 246-249 (1977).
- BIOFER. Informe técnico-económico sobre el proyecto de producción enzimática de ampicilina (1978).
- Casas T.L.: Producción del ácido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de la penicilina G. Tesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas (1981).
- Cole M.: Penicillins and other acylamino compounds synthesized by the cells-bound penicillin acylase of Escherichia coli. *J. Biochem.* 115: 747-756 (1969).
- Cole M. Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxypenicillins by the cell-bound penicillin acylase of Escherichia coli *J. Biochem.* 115: 757-764 (1969).
- Dunnill P., Wiseman A., Blakebrough N.: Enzymic and non-enzymic catalysis. Ellis Horwood Publishers. England (1980).
- Encyclopedia of Chemical Technology Vol. 2. Tercera edición. Willy Interscience Publication (1978).

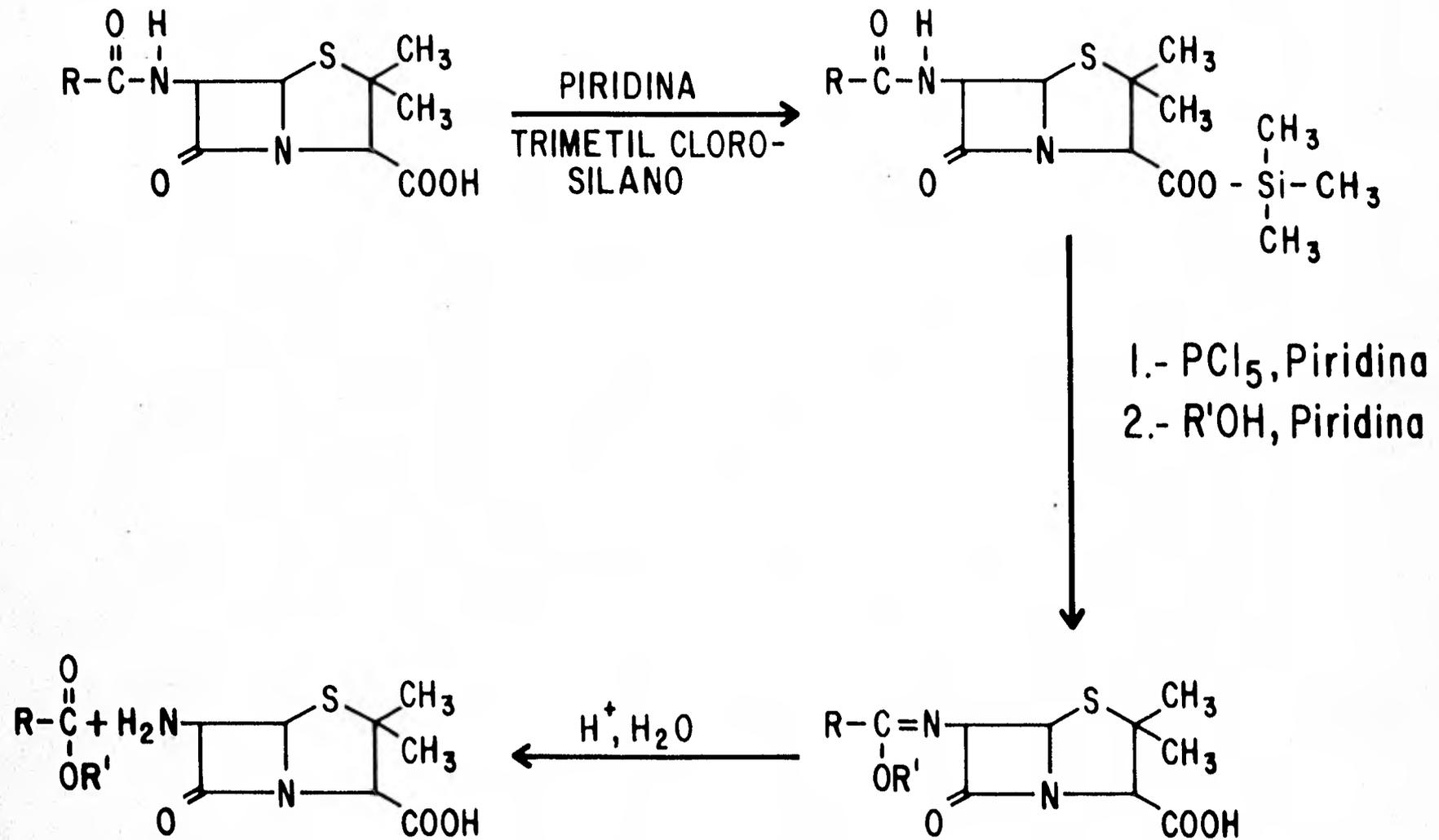
- Hamilton-Miller T.M.J.: Penicillinacylase. *Bacteriology Review*. 30: (4) 761-766, (1966).
- Kato K.: Kinetics of acyl transfer by α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri*. *Agric. Biol. Chem.* 44 (5): 1083-1088, (1980).
- Konecny J.: Penicillin acylases as amido hydrolases and acyl transfer catalysts. *Biotechnology Letters* 3 (3): 112-117, (1981).
- Konecny J., Sieber M. y Schneider A.: Kinetics and mechanism of acyl transfer by penicillin acylases. *Biotechnology Letters* 3 (9): 507-512 (1981a).
- Laidler R. and Bunting S. The Chemical Kinetics of Enzyme Action. Segunda edición. Clarendon Press. Oxford (1973).
- Lowry O.H., Rosebrough J.N., Farr L.A. y Randall J.R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biological Chemistry*. 265-272 (1951).
- Marconi W., Bartoli F. Cecere F., Gaili G y Morisi F.: Synthesis of penicillins and cephalosporin by penicillin acylase entrapped in fibres. *Agric. Biol. Chem.* 39 (1), 277-279 (1975).
- Margolin L.A., Svedas K.V. y Berezin V. I.: Substrate specificity of penicillin amidase from Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta* 616: 283-289 (1980).
- Morikawa K.: Enhancement of penicillin acylase activity by cultivating immobilized Klyvena citrophila. *J. App. Microbiology and Biotechnology* 10: 23-30 (1980).
- Pharmacopeia XIX United States. Biological test and assay. 595-606, (1976).

- Quintero R.: Ingeniería Bioquímica; teoría y Aplicaciones. Primera edición 1981. Editorial Alhambra Mexicana, S.A.
- Quinomas de México, S.A. (1978).
- Queener y Swartz. Secondary Products of Metabolism. Cap. 2 Economic Microbiology 3. Editado por Rose H.A. Academic Press. N.Y. (1979).
- Smith G.W., Grey E.G. y Patel J.V.: The spectro photometric determination of ampicillin. Analyst 92: 247-252 (1967).
- Svedas K.V., Margolin L.A. y Berezin V.I.: Enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics: a thermodynamic background. Enzyme Microb. Technol. 2: 138-144 (1980).
- Svedas K.V., Margolin L.A., Borisov L.I. y Berezin V.I.: Kinetics of the enzymatic synthesis of benzylpenicillin. Enzyme Microb. Technol. 2: 313-317 (1980a).
- Vandamme J.E. y Voets P.J.: Microbial penicillin acylases. Advances in Applied Microbiology 17: 311-369 (1974).
- Wallhausser H.K.: Antibiotics. Thin-layer Chromatography. Segunda edición. Editado por Stahl E. Springer-Verlay, N.Y. (1969).

APENDICE I

FIGURAS

Figura 3. HIDROLISIS QUIMICA DE LA PENICILINA PARA LA OBTENCION DE 6-APA



R' = alquil, hidroxialquil ó fenilalquil
 R-CO = radical acilo

Figura 4. SINTESIS QUIMICA DE LA AMPICILINA

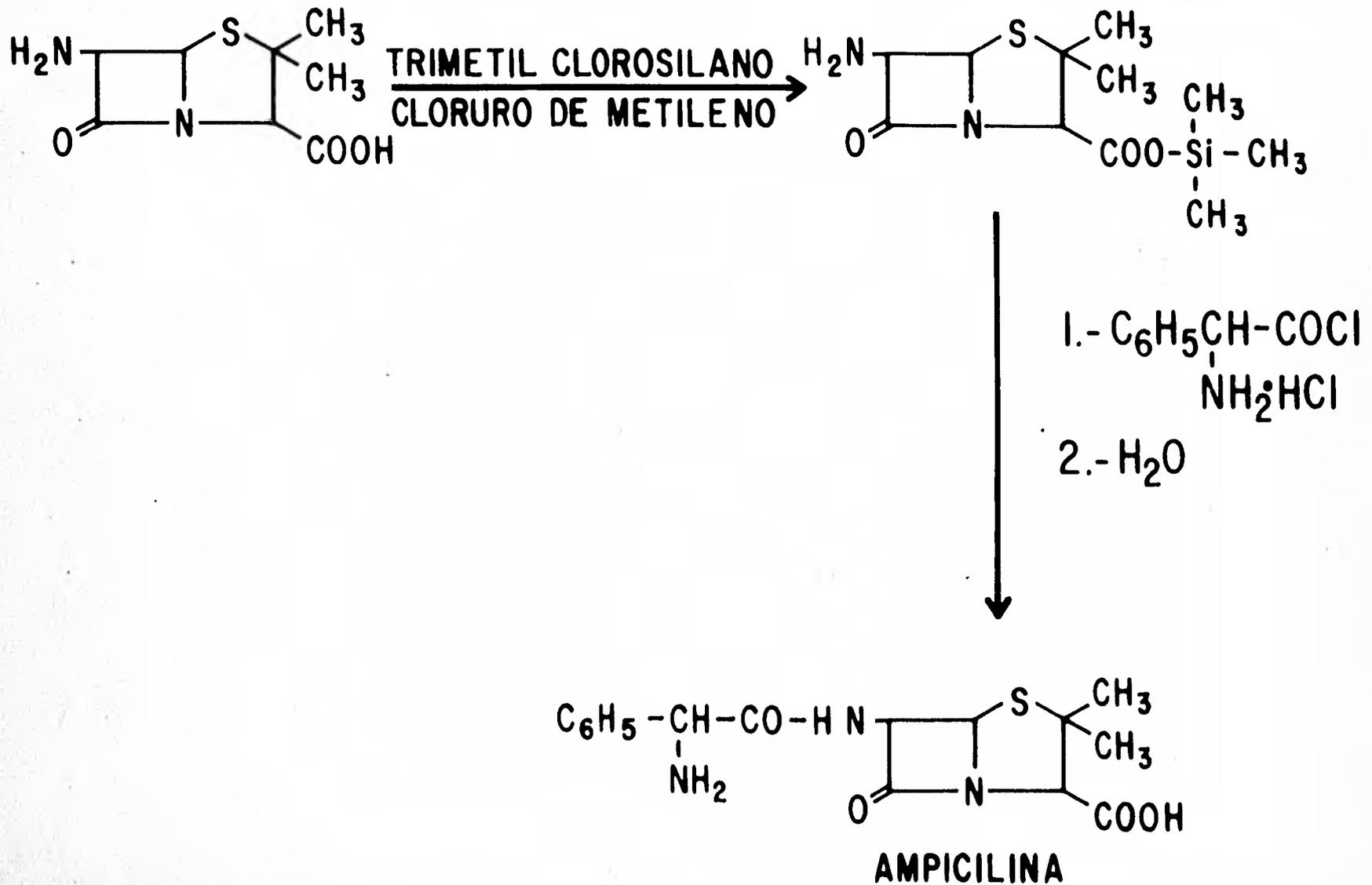


Figura 5. CURVA ESTANDAR 6-APA

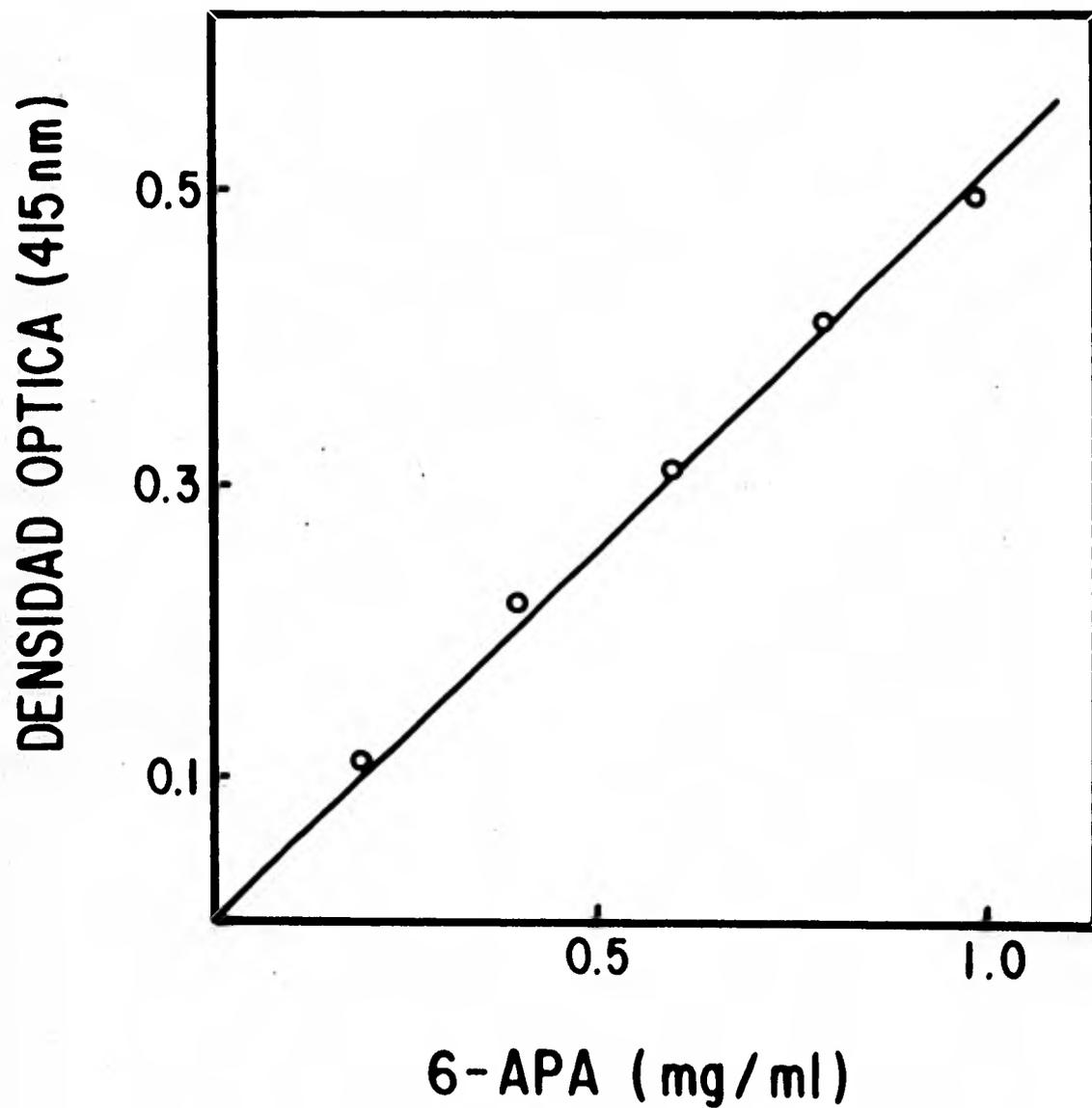


Figura 6. CURVA ESTANDAR DE AMPICILINA

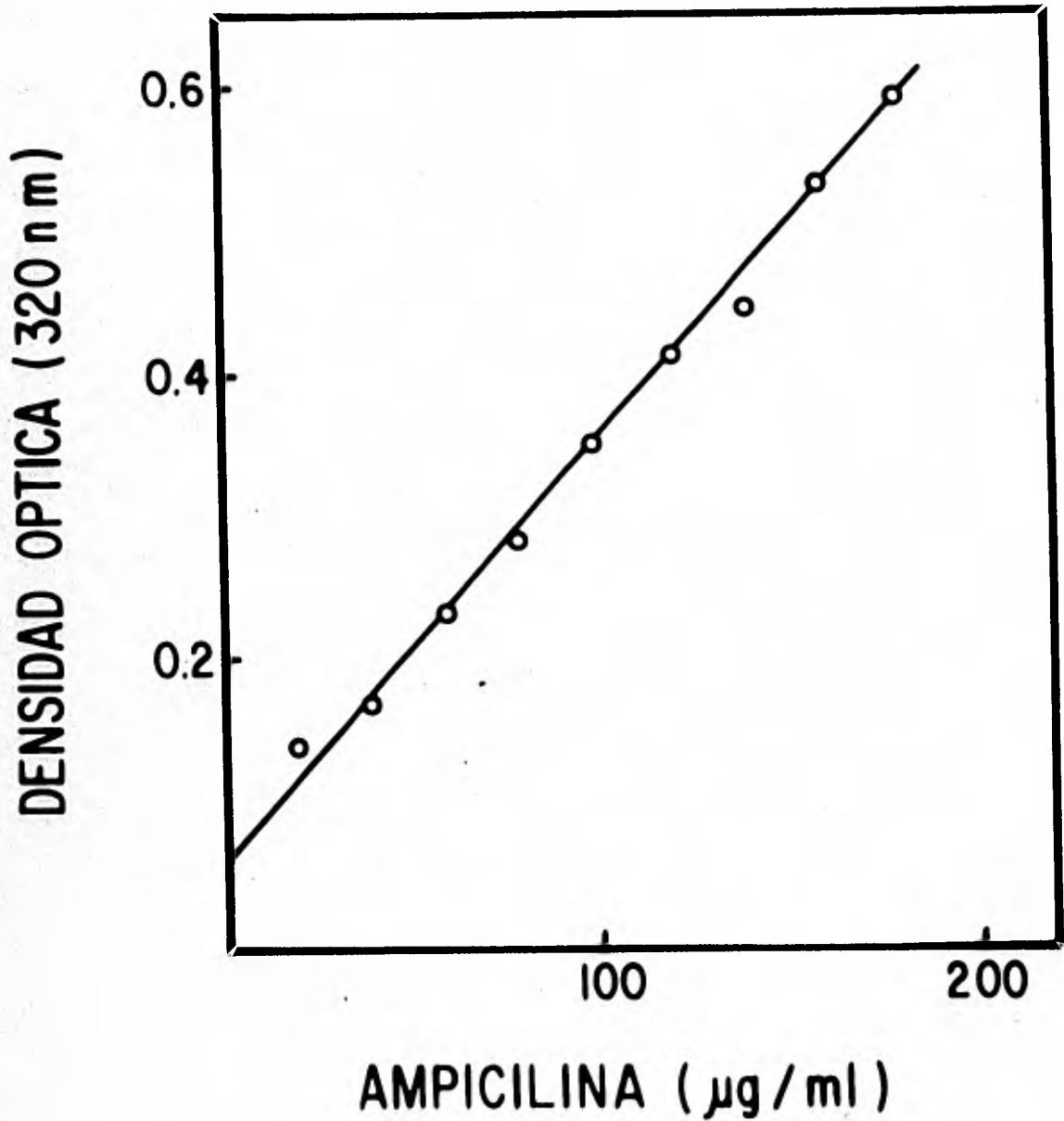


Figura 7. CURVA ESTANDAR DE BIO ENSAYO

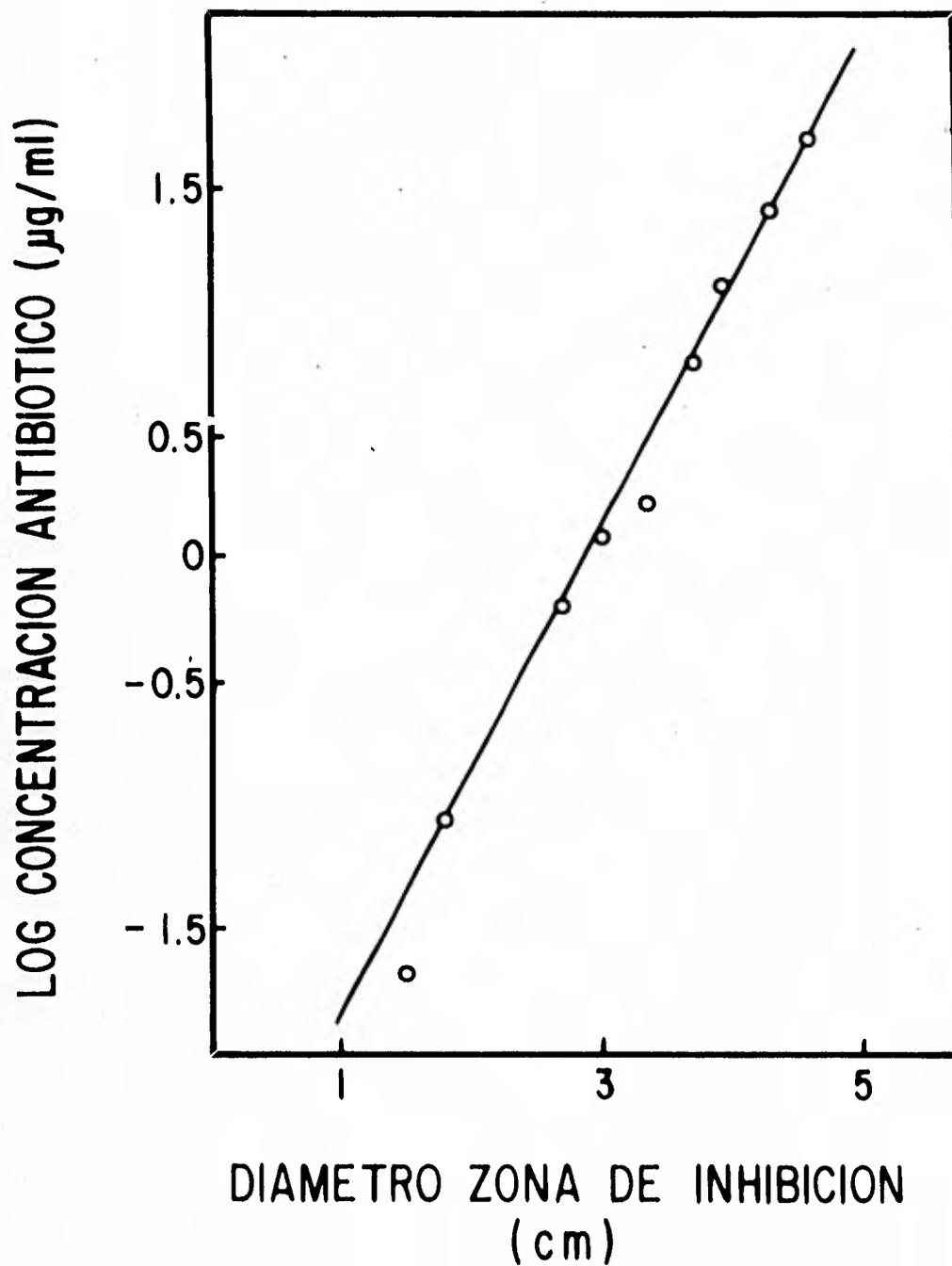
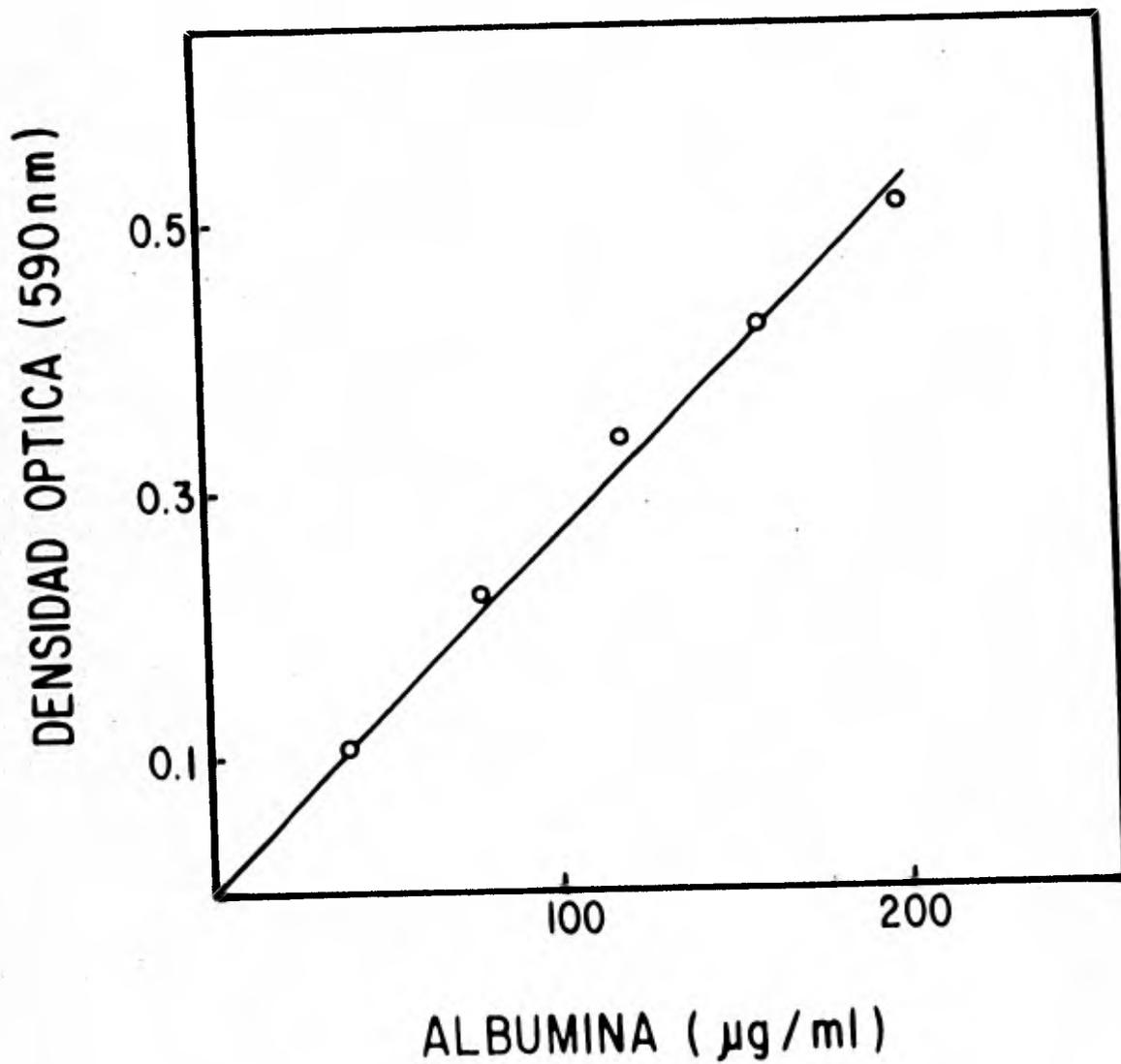


Figura 8. CURVA ESTANDAR DE PROTEINA



CURVA DE CRECIMIENTO

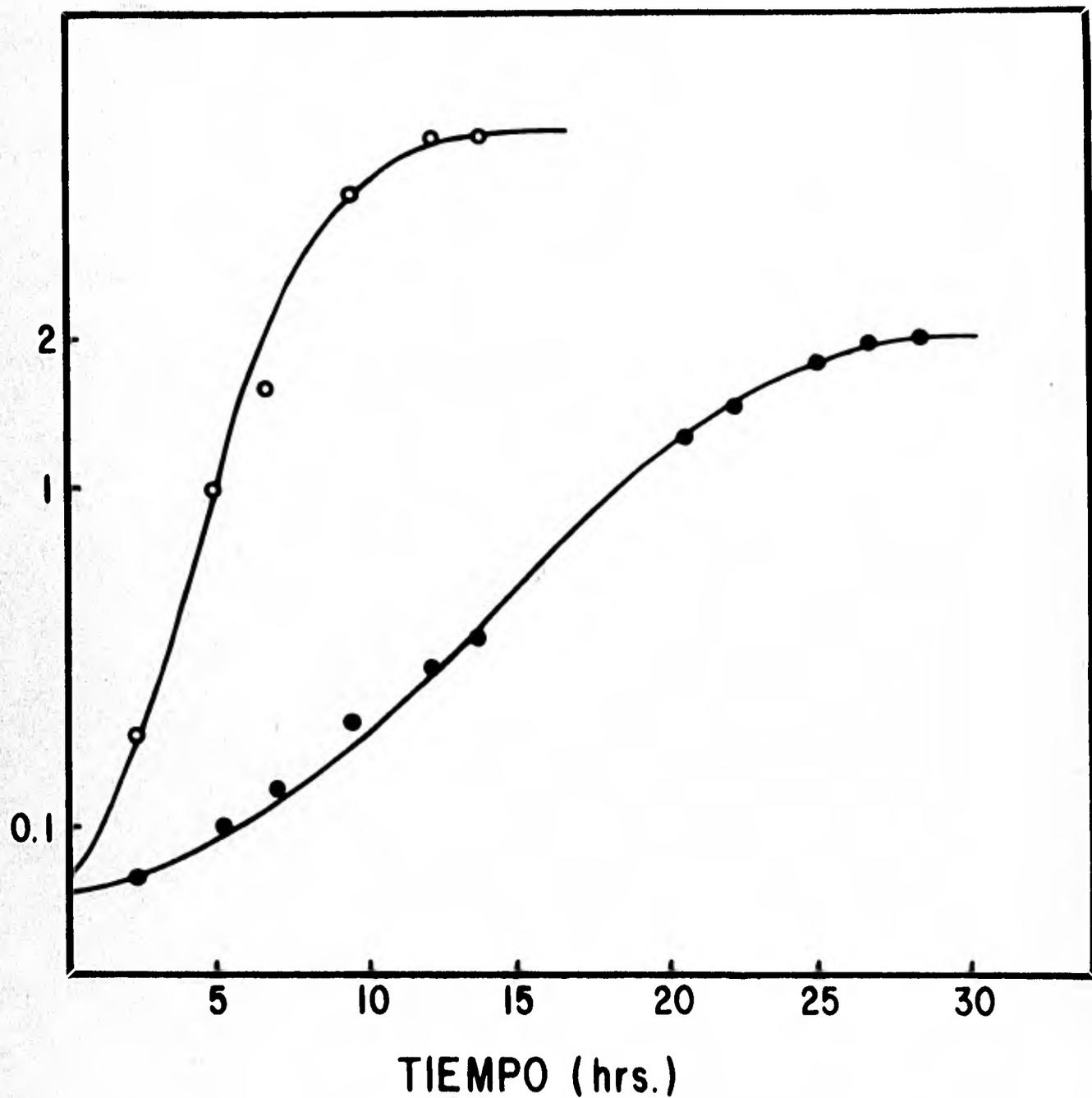


Figura 9. Crecimiento de las células de Escherichia coli ATCC 9637 en medio Luria (○) y en medio Mfñimo (●) a -29°C y 200 rpm. Velocidad de crecimiento en medio Luria de 0.31 hr^{-1} y en medio Mfñimo de 0.08 hr^{-1} .

ACTIVIDAD ESPECIFICA ENZIMATICA

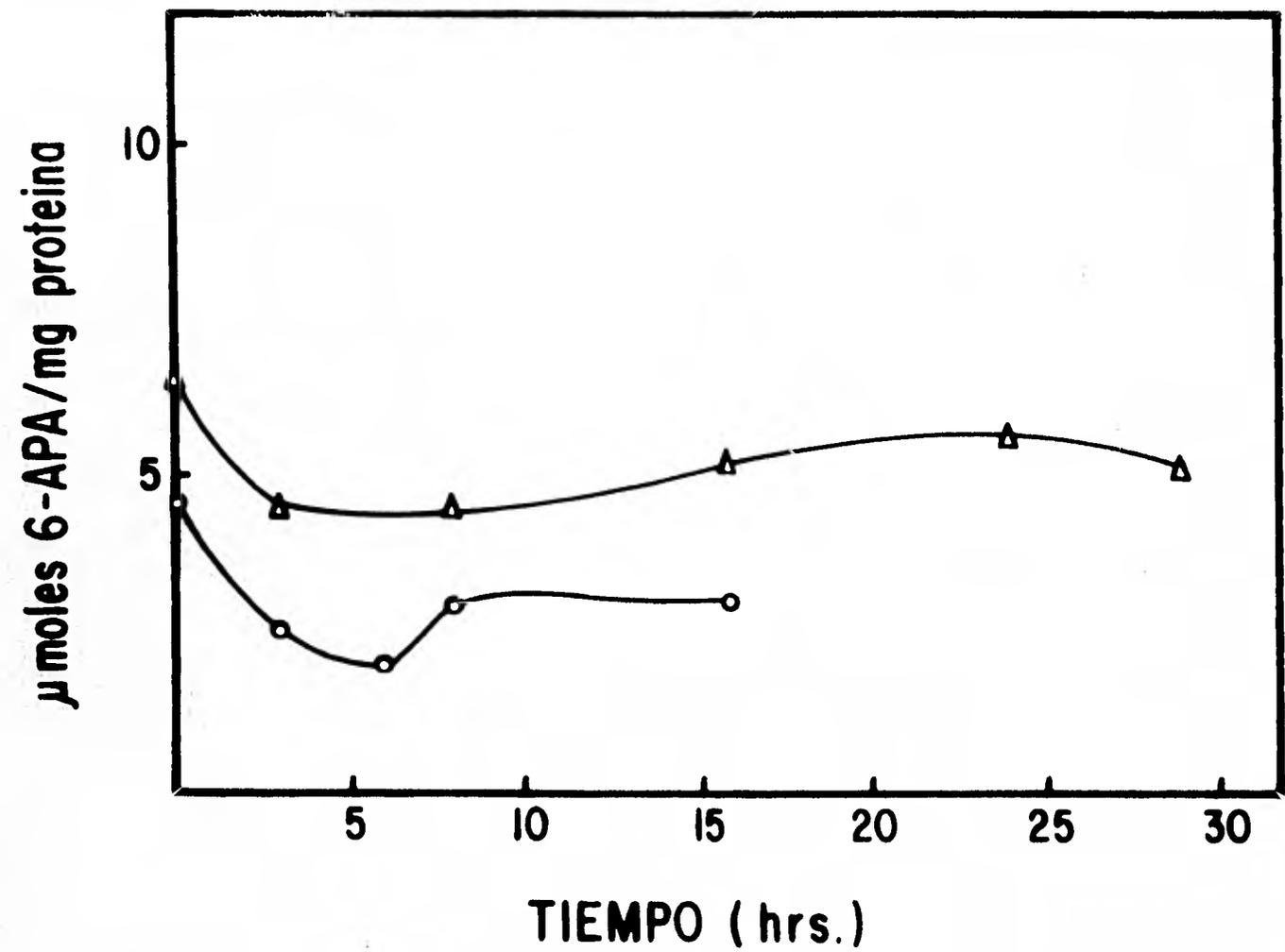


Figura 10. Cinética de la actividad específica enzimática asociada al crecimiento de las células en medio Luria (\circ) y en medio Mino (\triangle).

SINTESIS AMPICILINA AGENTE ACILANTE FENILGLICINA

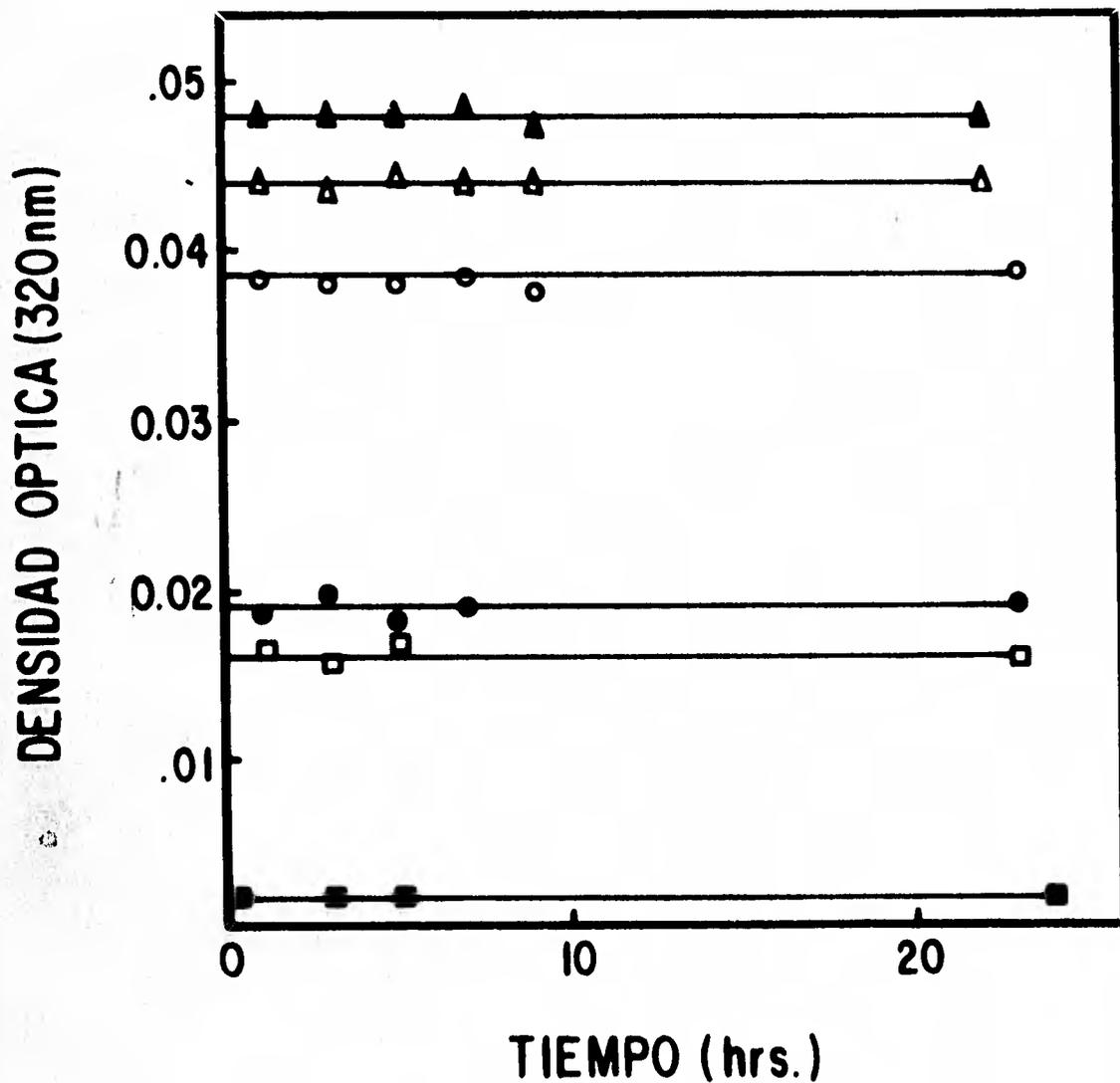


Figura 11. Cinética de la síntesis de ampicilina con la fenilglicina como agente acilante. Se llevó a cabo con una relación molar 6-APA/Ag. acilante de 1:4, temperatura de 30°C y a diferentes pH. (▲) pH 6, (△) pH 5.5 (○) pH 5.0. Los controles fueron (●) Buffer + célula + 6-APA, (□) Buffer + 6-APA y (■) Buffer + célula.

SINTESIS AMPICILINA AGENTE ACILANTE FENIL GLICINA.

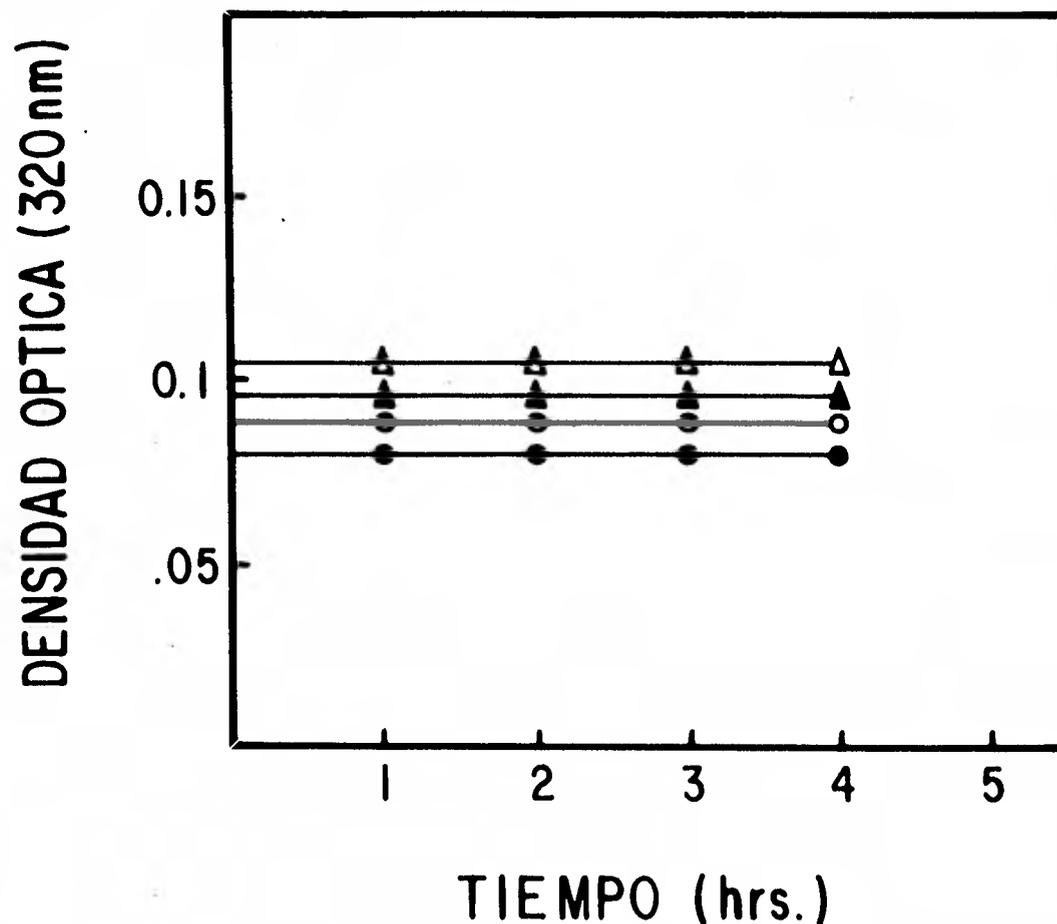


Figura 12. Cinética de la síntesis de ampicilina con N-aminofenil acetilglicina como agente acilante. Se llevó a cabo con una relación molar 6-APA/Ag. acilante de 1:4, temperatura de 30°C y diferentes pH. (Δ) pH 6, (▲) pH 5.5, (○) pH 5.0. Los controles fueron (●) Buffer + célula + 6-APA.

PERFIL DE pH PARA LA SINTESIS DE AMPICILINA.

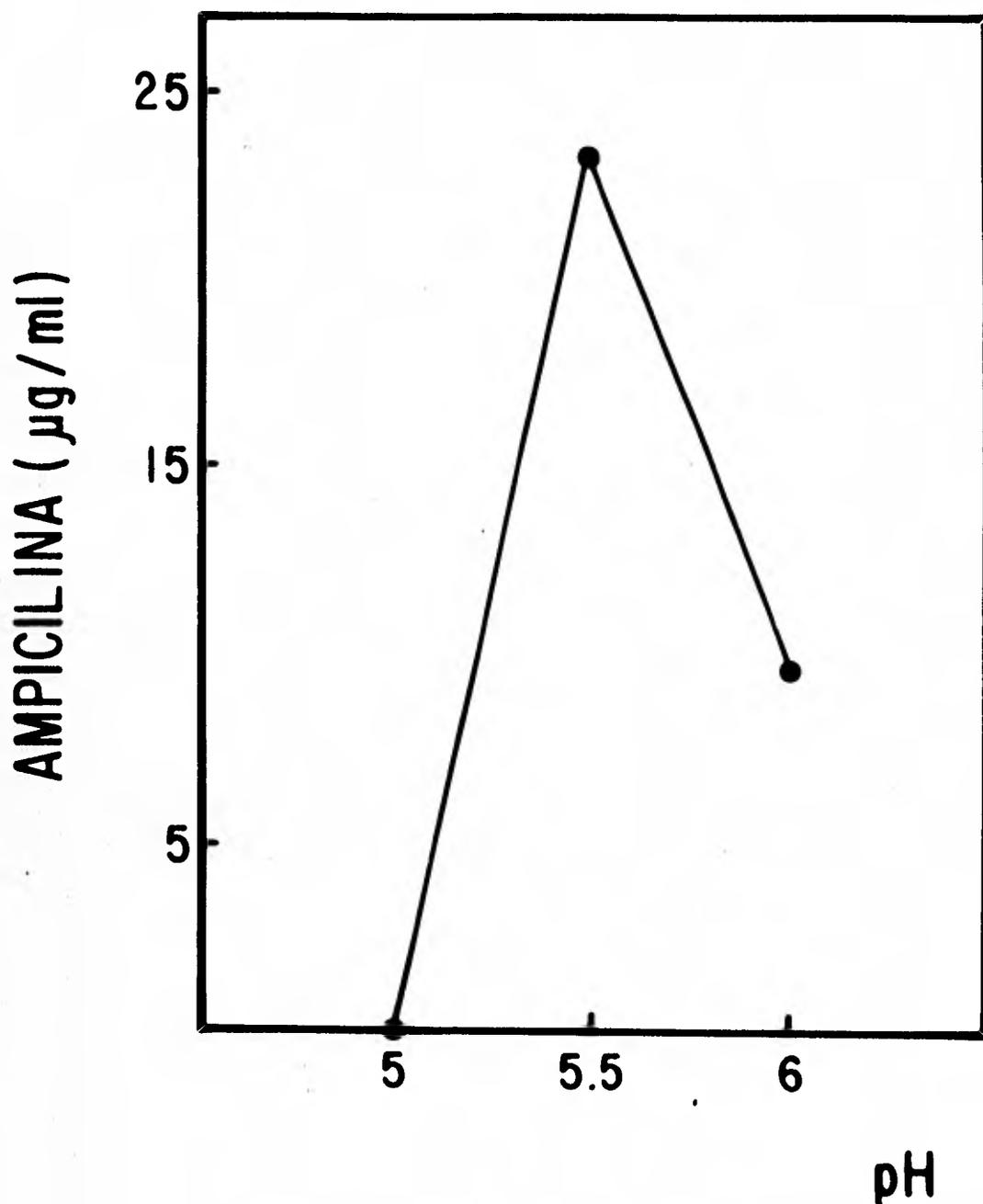


Figura 13. Perfil de pH para la síntesis de ampicilina con el clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina como agente acilante. Temperatura de 35°C, relación molar 6-APA/Ag. acilante de 1:4 y concentración de 6-APA de 0.03%.

PERFIL DE TEMPERATURA PARA SINTESIS DE AMPICILINA.

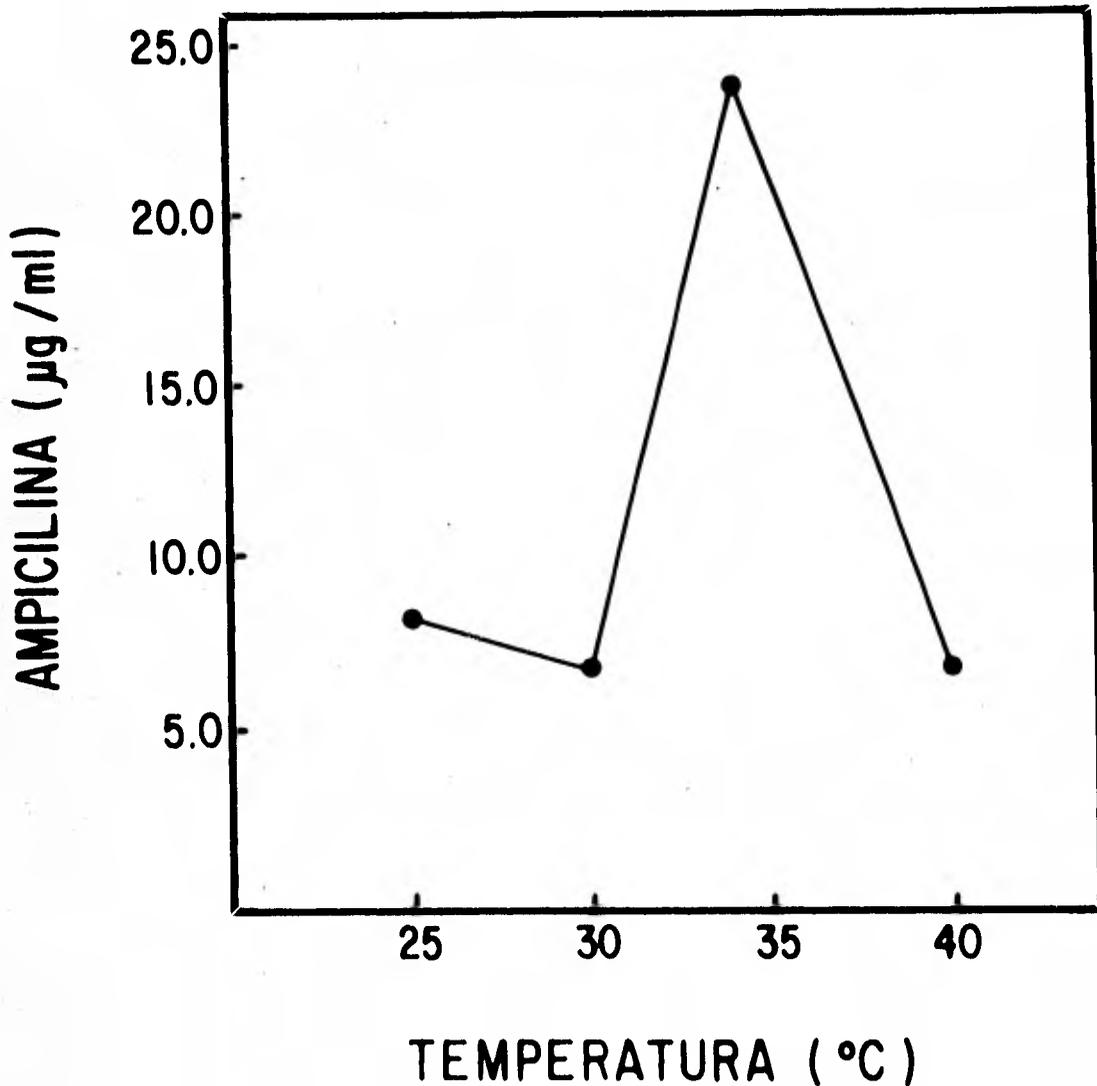


Figura 14. Perfil de temperatura para la síntesis de ampicilina con el clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina como agente acilante. pH de 5.5 y 0.03% de 6-APA.

ENERGIA DE ACTIVACION PARA LA SINTESIS DE AMPICILINA.

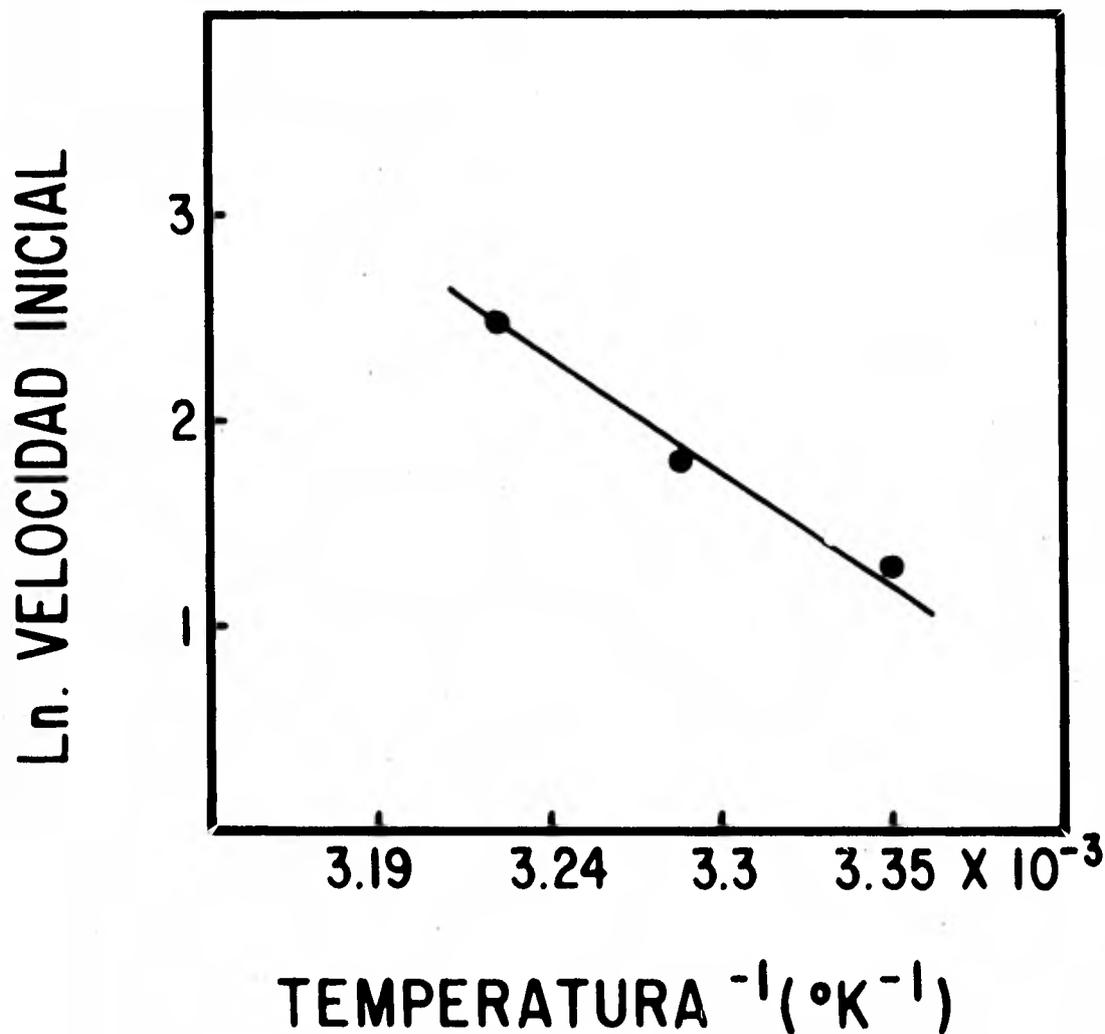


Figura 15. Energía de Activación para la síntesis de ampicilina. La reacción se llevó a cabo a pH de 5.5 con una relación molar 6-APA/Ag.acilante de 1:4. La pendiente de la recta es igual a $-E_a/RT$, de donde se despeja E_a para obtener su valor.

EFFECTO DE LA RELACION MOLAR 6-APA AGENTE ACILANTE

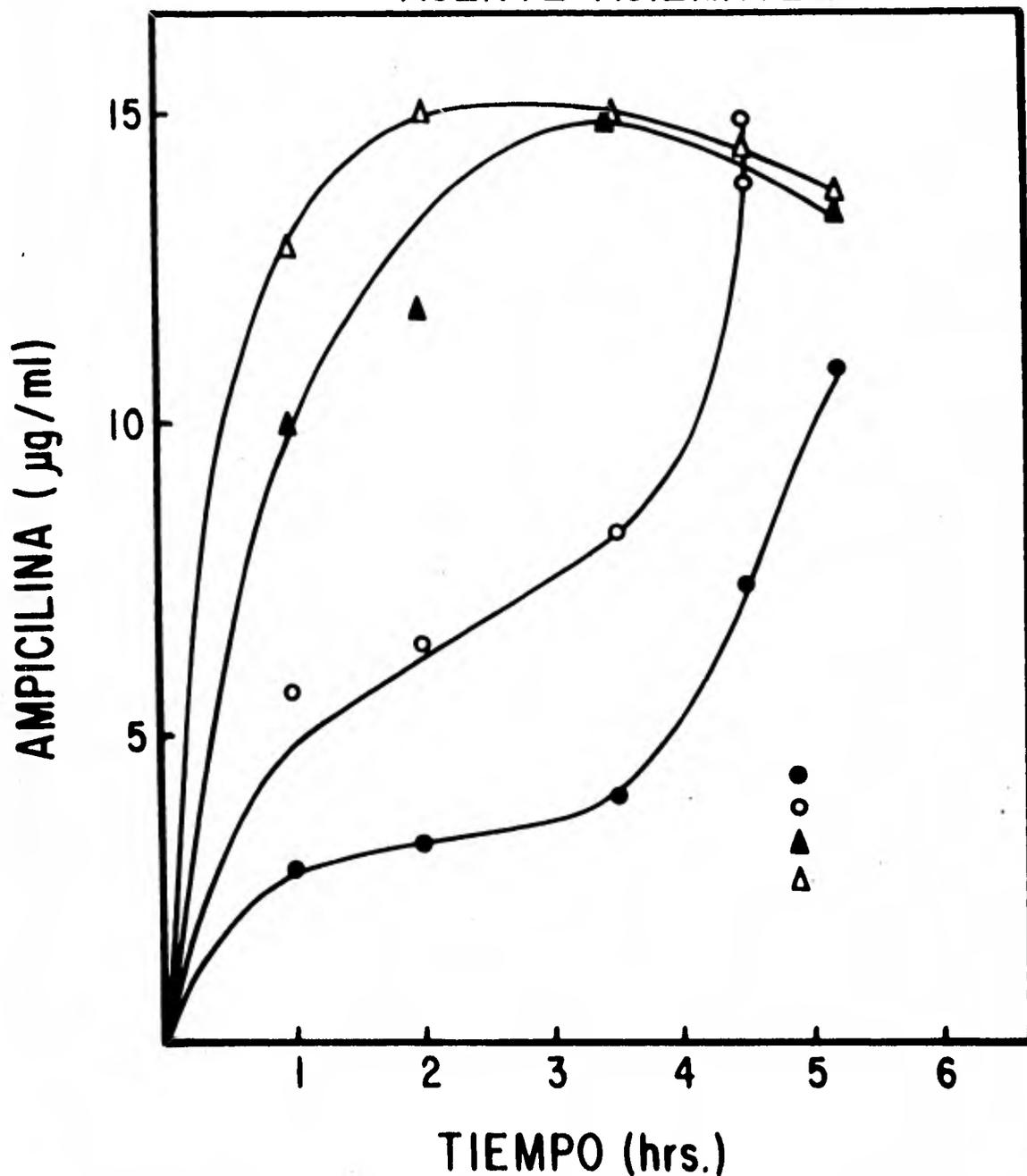


Figura 16. Efecto de la relación molar 6-APA/éster metílico de la fenilglicina. La reacción se llevó a cabo a pH de 5.5, temperatura de 35°C y 0.03% de 6-APA con diferentes relaciones molares. (●) 1:2, (○) 1:4, (▲) 1:6, (△) 1:8.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION MOLAR DE AGENTE ACILANTE.

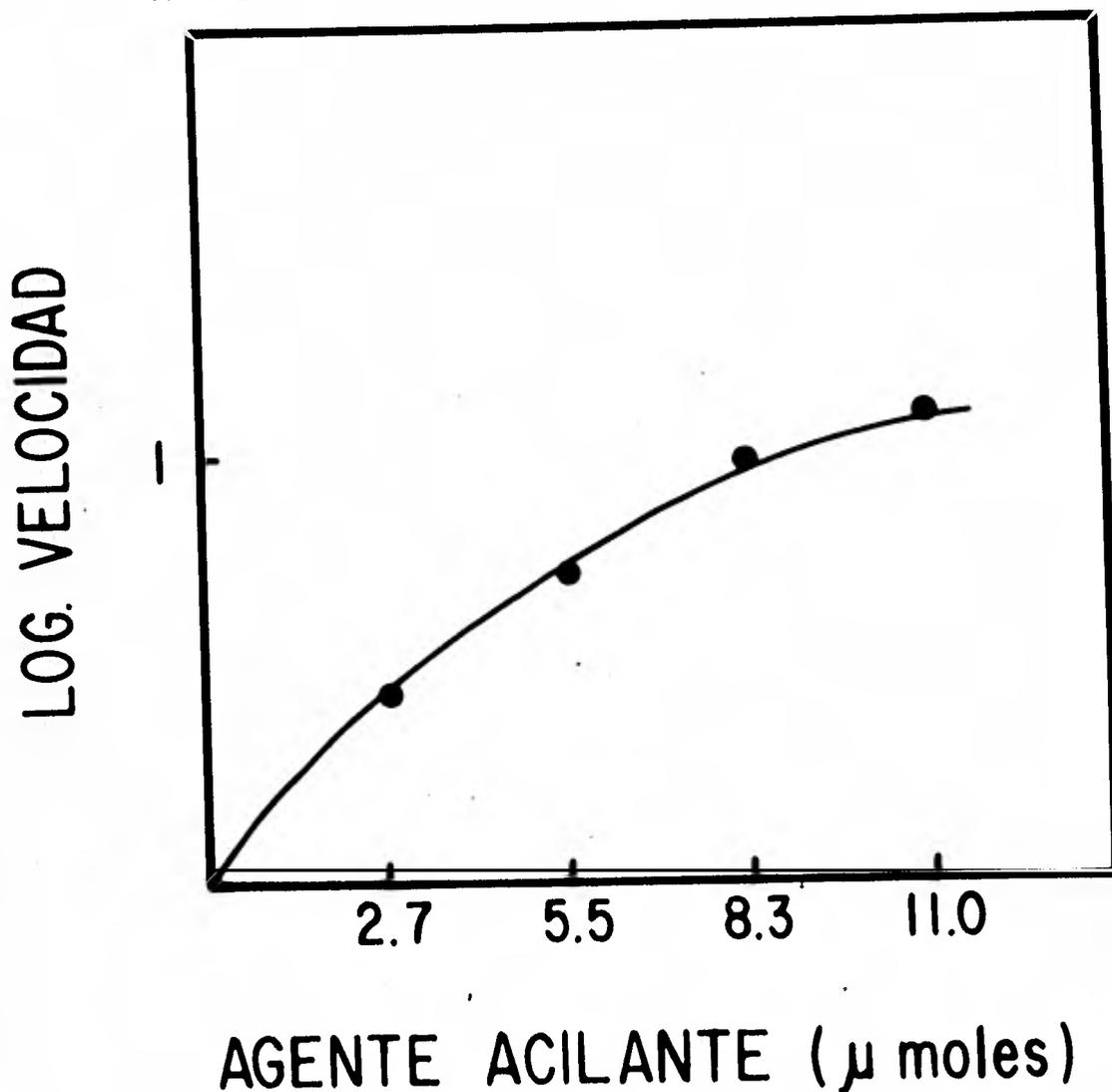


Figura 17. Efecto de la concentración molar del agente acilante sobre la velocidad de reacción. Concentración de 6-A PA de 0.03%, pH de 5.5 y temperatura de 35°C.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE AMPICILINA INICIAL

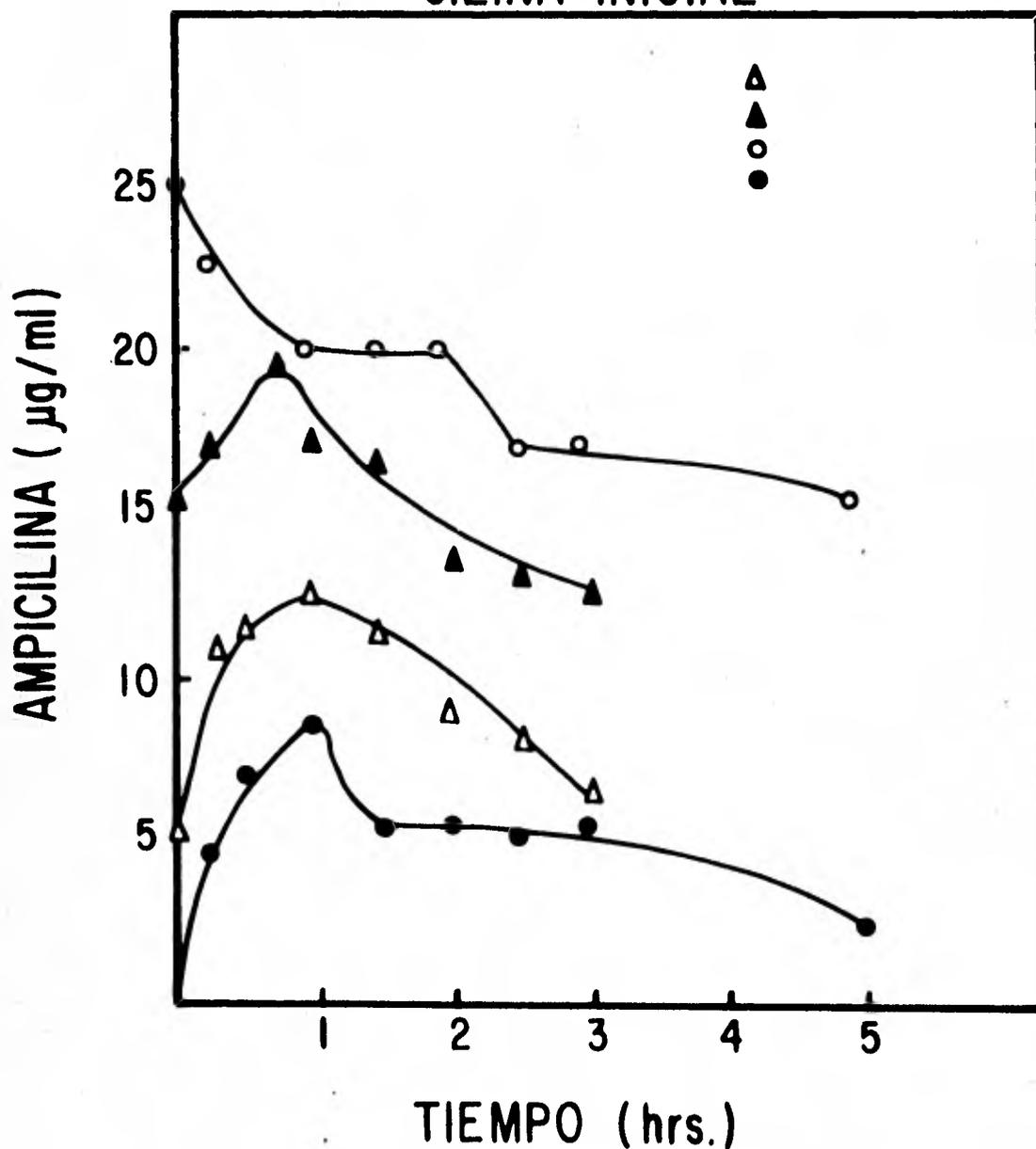


Figura 18. Efecto de la concentración inicial de ampicilina sobre su propia síntesis. La reacción de síntesis de ampicilina se llevó a cabo a pH de 5.5 y temperatura de 35°C, variando la concentración inicial de ampicilina. (●) 0.0, (△) 5, (▲) 15, (○) 25 g/ml de ampicilina.

HIDROLISIS ENZIMATICA DE AMPICILINA.

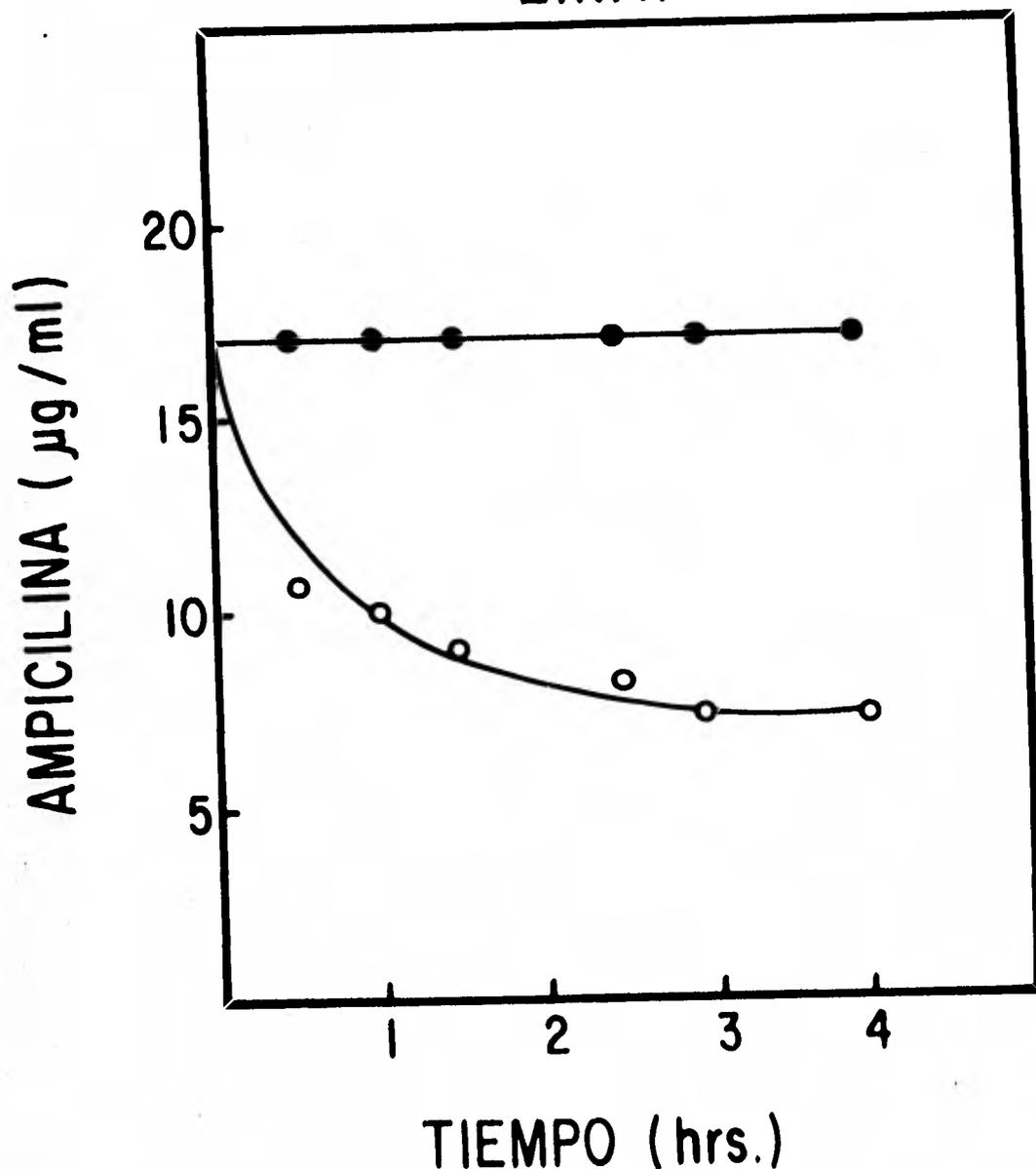


Figura 19. Cinética de la hidrólisis enzimática de la ampicilina. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo a las mismas condiciones que la reacción de síntesis; esto es - pH de 5.5 y temperatura de 35°C . (O) Reacción de hidrólisis enzimática, (●) Control: Buffer pH 5.5 + ampicilina.

REACCION DE SINTESIS DE AMPICILINA

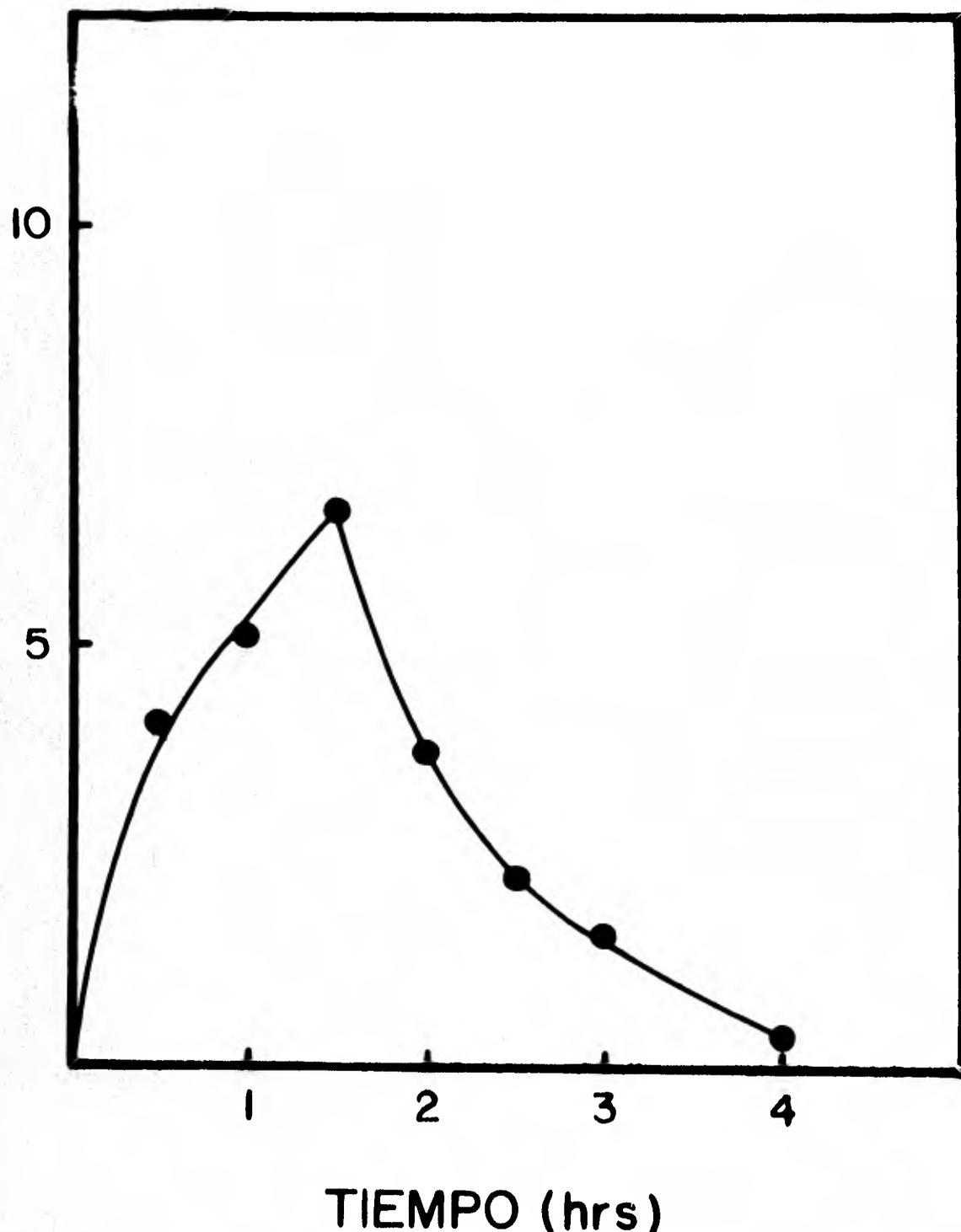
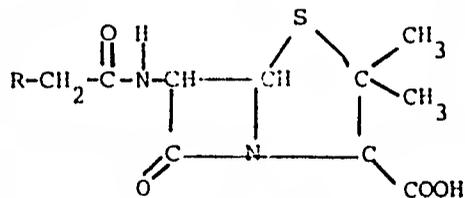


Figura 20. Reacción de síntesis de ampicilina en volumen de 100 ml. Esta reacción se llevó a cabo a pH de 5.5, -- temperatura de 35°C, concentración de proteína celular - entre 5-10 mg/ml y relación molar 6-APA/éster metílico - de 1:8.

TABLA I. PENICILINAS NATURALES OBTENIDAS POR FERMENTACION CON PENICILLIUM

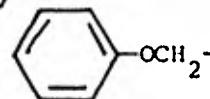


R

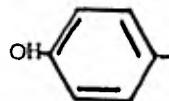
Bencil (G)



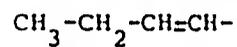
Fenoximetil (V)



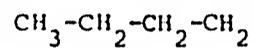
p-Hidroxibencil (X)



2-Pentenil (F)



n-Amil (dihidro F)



n-Heptil (K)

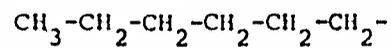
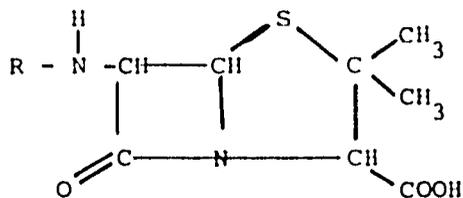


TABLA II. PENICILINAS SEMISINTETICAS



R - Cadena lateral	Nombre común	Nombre comercial	Propiedades importantes:
	Fenitcilina	Broxil	Estable en medio ácido
	Propicilina	Brocilin	Estable en medio ácido
	Ampicilina	Penbritin	Estable en medio ácido
	Carbenicilina	Pyopen	Activo contra bacilo Gram (-)

TABLA II. (continuación)

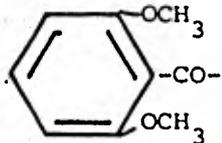
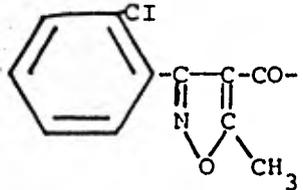
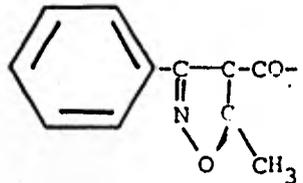
R - Cadena lateral	Nombre común	Nombre comercial	Propiedades importantes:
	Meticilina	Celbenin	Activa frente a la penicilasa
	Amoxilina	Amoxil	Estable en medio ácido
	Flucloxacilina	Floxapen	Estable en medio ácido

TABLA III. VENTAS DE PENICILINAS + SEMISINTETICAS

Clave	1975		1976		1977	
	+ volumen	Valor	volumen	Valor	volumen	Valor
(1)	3 106	8 115	3 828	10 169	5 226	15 100
(2)	36 748	56 519	59 818	195 409	68 209	147 100
(3)	4 472	52 979	5 542	17 330	7 500	26 200
(4)	2 224	6 292	2 257	6 857	4 023	14 300
(5)	3 213	9 485	5 872	17 911	2 918	10 700
(6)	224	1 078	3 828	25 269	9 370	75 100

+ Volumen en (Kg)

+ Valor en (miles de pesos)

(1) Ampicilina Anhidra

(2) Ampicilina Trihidratada

(3) Ampicilina sódica estéril

(4) Dicloxacilina sódica oral y estéril

(5) Otras Penicilinas semisintéticas

(6) Cefalexina

Nota: La información anterior corresponde a 4 de las 5 compañías - más importantes productoras de las penicilinas semisintéticas.

++ FERSINSA

++ FERMIC

++ QUINONAS

++ RICHTER

TABLA IV. CAPACIDAD DE PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS DE LAS
 COMPAÑIAS MAS IMPORTANTES EN MEXICO DURANTE EL
 AÑO DE 1972

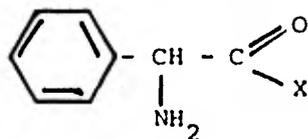
Fermentaciones y Síntesis, S.A.	65 ton/año para ampicilina
FERMIC	20 ton/año para tetraciclina 12 ton/año para ampicilina 40 ton/año para eritromicina
ORSABE	100 ton/año para ampicilina
Quinonas de México	25 ton/año para ampicilina
CYANAMID	30 ton/año para tetraciclina
PFIZER	30 ton/año para tetraciclina
ABBOTT	20 ton/año para eritromicina

TABLA V. PROPIEDADES DE LA PENICILINO AMIDASA*

Microorganismo	pH óptimo		Temperatura óptima	Localización
	Hidrólisis	Síntesis		
<u>Alcaligenes</u> sp.	8.0	--	40	Intracelular
<u>Alcaligenes faecalis</u>	7.5	--	37	Intracelular
<u>Escherichia coli</u> ATCC 9637				
células intactas	7.5	4.5 - 5.5	30	Intracelular
enzima	7.8 - 8	--	50 - 52	---
enzima inmovilizada	7.5	5	37	---
<u>E. coli</u> NCIB8743A				
células intactas	8.2	5	50	Intracelular
enzima	8.2	--	37	---
enzima inmovilizada	7.65	--	--	---
<u>E. coli</u> sp.	7.0	--	30 - 35	Intracelular
<u>E. coli</u> sp.	7.5	--	--	Intracelular
<u>E. coli</u> sp.	5.5	--	--	---
<u>Proteus rettgeri</u>	8.0	--	--	Intracelular
<u>Bacillus negaterium</u>				
enzima	6.5	--	--	Intracelular
<u>Kluyvera citrophila</u>	7.5	6.5	35	Extracelular
<u>Pseudomonas melanogenum</u>	-	5.5 - 6	34	Intracelular

*Hamilton - Miller (1966)

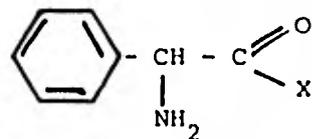
TABLA VI. SINTESIS ENZIMATICA DE AMPICILINA CON DIFERENTES DERIVADOS DE LA FENILCLINA*



Relación molar 6-APA/Ag. acilante	Rendimiento de ampicilina mg/ml hr.				
	X = -NH ₂ ⁺ HBr	-NH(CH ₂) ₂ OH	-NHCH ₂ COOH	-SCH ₂ COOH	-OCH ₃ ⁺ HCl
1:1	2.6	0.4	4.8	5.9	4.5
1:2	5.1	1.0	5.8	8.5	8.1
1:4	8.6	1.9	6.6	7.8	10.1

* Cole (1969a).

TABLA VI. SINTESIS ENZIMATICA DE AMPICILINA CON DIFERENTES DERIVADOS DE LA FENILCLINA*



Relación molar 6-APA/Ag. acilante	Rendimiento de ampicilina mg/ml hr.				
	X = $-\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	$-\text{NHCH}_2\text{COOH}$	$-\text{SCH}_2\text{COOH}$	$-\text{OCH}_3 \cdot \text{HCl}$
1:1	2.6	0.4	4.8	5.9	4.5
1:2	5.1	1.0	5.8	8.5	8.1
1:4	8.6	1.9	6.6	7.8	10.1

* Cole (1969a).

TABLA VII. SOLUBILIDAD DE G-APA, AMPICILINA Y FENILGLICINA EN MEDIO ACIDO, NEUTRO Y BASICO

Disolvente	G-APA			Ampicilina			Fenilglicina		
	N	H ⁺	OH ⁻	N	H ⁺	OH ⁻	N	H ⁺	OH ⁻
Acetato de etilo	I	I	I	PS	I	I	I	I	I
Acetato de butilo	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Dioxano	I	PS	I	I	S	G	I	S	I
Isopropanol	I	S	I	G	S	I	I	I	PS
Agua	PS	S	S	S	S	S	PS	S	S

I = insoluble, PS = poco soluble, S = soluble y G = gelifica

TABLA VIII. RESULTADOS

Parámetro	Agente acilante
	Clorhidrato del éster metílico de la fenilglicina
pH	5.5
Temperatura (°C)	35
Conversión Molar (%)	5.15

La reacción de síntesis de ampicilina se llevó a cabo con 0.03% de 6-APA, manteniendo una relación molar de 6-APA/Ag. acilante de 1:4 y una -- concentración de proteína celular entre 5 a 10 -- mg/ml. El % de conversión molar máximo se obtuvo a las 2 hrs. de reacción. Con los otros -- agentes acilantes (fenilglicina y N-aminofenil-acetilglicina) no hay síntesis de ampicilina.

TABLA IX. EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE AMPICILINA EN LA VELOCIDAD DE REACCION PARA SU SINTESIS

Concentración inicial de ampicilina (g/ml)	Velocidad inicial (g/hr.)	Cantidad máxima de ampicilina sintetizada (/ml)
0	13.9	8.69
5	12.6	7.6
15	4.35	2.17
25	0.0	0.0

La reacción se llevó a cabo a pH de 5.5, temperatura de 35°C, relación molar de 6-APA/Ag. acilante de 1:8 y una concentración de proteína celular entre 5 a 10 mg/ml.

TABLA X. VALORES DE ENERGIA DE ACTIVACION PARA ALGUNAS REACCIONES

Reacción	Disolvente	Energía de activación Kcal/ml
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH}_2 + \text{C}_6\text{H}_5\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CCH}_2 \text{ Pr}$	Benceno	8.1
	Cloroformo	10.8
	Acetona	11.1
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+ + \text{Pr}^{-(a)}$	Nitrobenceno	13.5
	Metanol	12.4
	Etanol	13.9
$\text{CH}_3\text{I} + (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{S} \longrightarrow (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{S-CH}_3^+(b)$	Acetona	12.2
	Metanol	16.7
	Etanol	17.2
$\text{HA} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{A}^{-(c)}$	éster aceto acético	14.2
	α metil acetil acetona	18.0
	nitrometano	22.6
	etil nitro acetato	16.0
	malonitrilo	18.1

(a) Cox E.H. J. Chem. Soc. 119: 142 (1921)

(b) Syrkin K.J. y Gladischew T.I. Acta Physicochim URSS 2: 291 (1935)

(c) Dillon L.R., Ph. D. Thesis, Northwestern University (1951)

TABLA XI. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS OTROS INVESTIGADORES

% conversión molar	Agente acilante	Condiciones		Sistema catalítico	Relación molar 6-APA/Ag. acilante	Investigador
		pH	Temp. °C			
60	Ester metílico	7.0	34	células	1:4	Cole (1969)
40	"	7.0	25	enzima inmovilizada	1:3	Marconi (1974)
5.15	"	5.5	25	células	1:4	IIB