

03072
8
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CARACTERIZACION Y APLICACION DE UN BIOCATALIZADOR
DE PENICILINO AMIDASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

SONIA AMPARO OSPINA SANCHEZ

CUERNAVACA

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	9
1. PENICILINO AMIDASA	9
1.1. Introducción.	9
1.2. Fuentes de la enzima.	10
1.3. Producción y purificación de la enzima.	11
1.4. Características de la enzima libre.	12
2. CATALIZADORES INDUSTRIALES DE PENICILINO AMIDASA	18
2.1. Procesos de producción de los biocatalizadores.	18
2.2. Características operacionales de los biocatalizadores.	22
3. MODELAMIENTO CINETICO DE LOS CATALIZADORES DE PENICILINO AMIDASA Y SU USO PARA EL DISEÑO DE REACTORES.	30
4. PERSPECTIVAS.	33
4.1. Ingeniería Genética.	33
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y METODOS	40
1. MATERIALES	40
2. METODOS.	41
2.1. Actividad enzimática.	41
2.2. Determinación del 6-APA por el método de paradimetil amino benzaldehído.	41
2.3. Efecto de la temperatura en la actividad del	

biocatalizador.	41
2.4. Efecto del pH en la actividad enzimática del biocatalizador.	41
2.5. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador.	43
2.6. Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador.	43
2.7. Estabilidad operacional.	43
2.8. Características cinéticas del biocatalizador.	45
2.9. Determinación de la constante de equilibrio de la hidrólisis.	45
RESULTADOS	47
1. CARACTERIZACION DEL BIOCATALIZADOR.	47
1.1. Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador.	47
1.2. Efecto del pH en la actividad del biocatalizador.	47
1.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador.	51
1.4. Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador.	54
1.5. Estabilidad operacional del biocatalizador.	59
1.6. Constantes cinéticas del biocatalizador.	64
2. MODELO CINETICO DEL BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA.	73
2.1. Reacción en tanque agitado en lote.	81
2.2. Sistema de tanque agitado alimentado.	85
2.3. Sistema de tanque continuo agitado	87
2.4. Productividad del sistema en lote	92
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	96
1. CONCLUSIONES.	96
2. RECOMENDACIONES.	98

BIBLIOGRAFIA.	99
ANEXOS.	108
ANEXO 1. Método de p-dimetilaminobenzaldehído para la determinación de 6-APA.	108
ANEXO 2. Integración de las ecuaciones correspondientes a los modelos cinéticos de la penicilino amidasa.	109
ANEXO 3. Metodo de simulación para la determinación del rendimiento y la productividad del biocatalizador.	111

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas de enzimas inmovilizadas	2
Tabla 2. Enzimas inmovilizadas. Consumo a nivel mundial	3
Tabla 3. Producción y uso de penicilinas en 1985	4
Tabla 4. Proyección de la demanda de penicilinas	6
Tabla 5. Principales productores de 6-APA	8
Tabla 6. Características de la penicilino amidasa libre	13
Tabla 7. Características cinéticas de la penicilino amidasa	16
Tabla 8. Métodos de inmovilización empleados para la penicilino amidasa	20
Tabla 9. Soportes empleados en la inmovilización de penicilino amidasa	21
Tabla 10. Características operacionales de los biocatalizadores de penicilino amidasa	23
Tabla 11. Constantes cinéticas de diferentes biocatalizadores de penicilino amidasa	24
Tabla 12. Características operacionales de los biocatalizadores industriales de penicilino amidasa	25
Tabla 13. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador	54a
Tabla 14. Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador	55a
Tabla 15. Tiempo de vida media determinado en estabilidad operacional	61
Tabla 16. Concentraciones de penicilina en equilibrio en la hidrólisis de penicilina	80
Tabla 17. Efecto del tiempo de residencia en el % de conversión en la hidrólisis de penicilina	90a

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la reacción de hidrólisis de penicilina	10
Figura 2.	Estrategias de producción de biocatalizadores de penicilino amidasa	19
Figura 3.	Efecto del número de lotes de reutilización del biocatalizador en e costo de producción del 6-APA	38
Figura 4.	Esquema de la reacción del método de p-dimetil amino benzaldehido para la determinación de 6-APA	42
Figura 5.	Diagrama del reactor enzimático	44
Figura 6.	Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador	48
Figura 7.	Representación gráfica de Arrhenius para determinar la energía de activación	49
Figura 8.	Efecto del pH en la actividad del biocatalizador	50
Figura 9.	Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador	52
Figura 10.	Método gráfico para la determinación de la constante de desactivación del biocatalizador a diferentes temperaturas	53
Figura 11.	Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador	55
Figura 12.	Efecto del pH en el tiempo de vida media del biocatalizador	57
Figura 13.	Representación gráfica del modelo de desactivación del biocatalizador	58
Figura 14.	Estabilidad operacional del biocatalizador	60
Figura 15.	Estabilidad operacional del biocatalizador	63
Figura 16.	Representación clásica de la cinetica de Michaelis-Menten	65
Figura 17.	Representación de Lineweaver-Burk de la cinética de Michaelis-Menten para el biocatalizador	66
Figura 18.	Método gráfico para la determinación de la constante de inhibición por exceso de sustrato	68
Figura 19.	Método gráfico para la determinación de la Constante de inhibición por AFA	69
Figura 20.	Método gráfico para la determinación de la constante de inhibición por 6-APA	72
Figura 21.	Comparación de los modelos cinéticos	76

Figura 22. Cromatograma de muestras de 6-APA y AFA en presencia del biocatalizador	78
Figura 23. Cromatograma de la evolución de la reacción de degradación de 6-APA	82
Figura 24. Espectro U.V. de la evolución de la degradación de 6-APA	83
Figura 25. Hidrólisis en tanque agitado en lote (4.8 U/ml)	84
Figura 26. Hidrólisis en tanque agitado en lote (120 U/g PGK)	86
Figura 27. Hidrólisis en reactor de tanque agitado alimentado	88
Figura 28. Hidrólisis en tanque continuo agitado (120U/g)	89
Figura 29. Hidrólisis en tanque continuo agitado (10% PGK)	91
Figura 30. Rendimiento y productividad del biocatalizador	94

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la caracterización del biocatalizador de penicilino amidasa desarrollado por la empresa Genin S.A. de C.V., elaborado con la enzima purificada proveniente de células de *E. coli*. El biocatalizador presenta máxima actividad a 49°C y pH 7.5 a 8.0, con una energía de activación de 10963 cal/mol. Se estableció un modelo de desactivación del biocatalizador con el pH, que no ha sido reportado previamente en la literatura y es de gran importancia dado el efecto que tiene este factor sobre el proceso. Por las características de estabilidad del biocatalizador, se recomienda su utilización a 37°C y pH 7.5.

Se realizó la caracterización cinética del biocatalizador de penicilino amidasa que presenta una cinética de Michaelis-Menten con un K_m de 4.17 y una V_{max} de 170 U/g, es inhibido competitivamente por ácido fenilacético con una K_{afa} de 68.6 mM y no competitivamente por 6-APA con una K_{6apa} de 100.7 mM, así como por exceso de sustrato con una K_s de 413 mM. Se estableció un modelo cinético que contempla los 3 tipos de inhibición, así como una corrección por el equilibrio de la reacción. El modelo propuesto describe adecuadamente la reacción de hidrólisis de la penicilina, presentando desviaciones especialmente a conversiones altas. Se ensayaron 3 sistemas de reacción: en lote, lote alimentado y continuo en tanque agitado, encontrando los mejores resultados en el sistema de tanque agitado en lote. En todos los casos los resultados fueron descritos adecuadamente con el modelo propuesto a bajas concentraciones de penicilina.

Se determinó la productividad del biocatalizador empleando las ecuaciones de desactivación y cinética, encontrando un rendimiento calculado mediante predicción (en función del número de lotes con

95% de conversión) de 525 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador para un tiempo de vida media, y una productividad promedio para el mismo tiempo de 0.455 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador.h.

INTRODUCCION

Una de las áreas importantes en la Biotecnología actual es la tecnología enzimática, la cuál se ha desarrollado desde hace más de un siglo. Quizá la primera aplicación del uso de una enzima fué la adición de extracto de estómago de ternera a la leche para su coagulación, proceso que se empleó por mucho tiempo antes de entender la reacción proteolítica que tenía lugar debido a la presencia de la renina. Fué muchos años después que se empezaron a emplear procesos fermentativos para obtener enzimas microbianas como consecuencia del desarrollo de la Ingeniería Bioquímica. Esta actividad permitió establecer las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos así como las condiciones óptimas de producción de metabolitos, entre ellos las enzimas para que fuese posible su producción a nivel industrial.

Posteriormente, en los años 60 se desarrolló el área de inmovilización de enzimas, lo cuál permitió la reutilización de las mismas, disminuyendo los costos de proceso con reacciones enzimáticas, ampliando por consiguiente el campo de acción de las mismas.

La penicilino amidasa es una de las pocas enzimas inmovilizadas que se utiliza a nivel industrial; la Tabla 1 muestra que en mercado mundial ocupa el segundo lugar, con 6 millones de \$US de ventas anuales, después de la glucosa isomerasa que es la enzima inmovilizada más importante. En la Tabla 2 se observa su consumo a nivel mundial, de aproximadamente 5 toneladas/año (dato de 1982), para la producción de aproximadamente 4500 toneladas/año de 6-APA (ácido 6-amino penicilánico).

El mercado mundial de antibióticos a granel, fué evaluado en 1985 en más de 5 billones de dólares (3); de éstos, cerca de 3 billones se utilizaron en el campo farmacéutico humano y 0.3 billones en el campo veterinario; el resto se utilizó para incorporación en alimentos para animales. La penicilina representa un alto porcentaje tanto en precio como en volumen, y como se observa en la Tabla 3, la mayor proporción se produce como penicilina G (bencil penicilina). El principal uso de este compuesto (cerca del

TABLA 1
SISTEMAS DE ENZIMAS INMOVILIZADAS (1985) (1)

ENZIMA	AREA DE APLICACION	VENTAS MUNDIALES EN DOLARES
Glucosaisomerasa	Industria de bebidas	20 millones
Glucosa oxidasa	Industria de bebidas Pruebas de diagnóstico	Baja
Lactasa	Industria de leche Tratamiento de suero	1 millón
Lipasas	Industria de grasas Alimentos, fragancias	Baja
Penicilinoacilasa	Producción de 6-APA	6 millones
Aminoacilasas	Alimentos, Ind. farm. Diagnóstico	Baja

TABLA 2
ENZIMAS INMOVILIZADAS. CONSUMO A NIVEL MUNDIAL (1982) (2)

ENZIMA	CANTIDAD PRODUCTO (Ton/año)	CANTIDAD ENZIMA (Ton/año)	PRODUCTOR PRINCIPAL
Aminoacilasa	< 250 ton aminoac.	<5	Amano. Japó
Glucoamilasa	<5000 ton. jarabe	<1	Tate Lyle.
Glucosa iso- merasa	3.6 millones ton. jarabe fructosado	1500-1750	Novo Ind. Gist. Broca
Lactasa	<1000 ton. hidrol. lactosa.	<5	Valio SF
Nitrilasa	<5 ton. acrilamida	<0.1	Nitto. Jap
Penicilino G acilasa	Apr. 4000 ton 6-APA	3-4	Gist Broc. Beecham R Toyo Jozo
Penicilino V acilasa	Apr. 500 ton 6-APA	1	Biochemie Novo Ind.

TABLA 3
PRODUCCION Y USO DE PENICILINAS EN 1985 (3)

	PENICILINA G	PENICILINA V	TOTAL
Porcentaje	75%	25%	100%
Toneladas	11200	3800	15000
Millones de Dólares	430	180	610
Uso en produc. de penic. semisint (Ton)	-	-	11500
Uso en terapia humana y animal.	1750	750	2500
Uso en alimen. animal	1000	-	1000

80% de la producción) es en la producción de antibióticos semisintéticos, especialmente ampicilina, amoxicilina y cefalexina, vía la producción del ácido 6-amino penicilánico (6-APA) como intermediario en el proceso.

La Tabla 4 muestra la demanda de penicilina proyectada para el año 2000, cuyo incremento se espera debido a 2 causas: el aumento en el consumo de ampicilina, por la aparición de inhibidores de β -lactamasas (que son enzimas presentes en los microorganismos causantes de infecciones en el hombre y animales, las cuales producen el rompimiento del anillo β -lactámico, lo cual ocasiona su resistencia al antibiótico), y la aparición de nuevas entidades químicas desarrolladas a partir del 6-APA, con características mejoradas en cuanto a su espectro de actividad y absorción.

El valor de los antibióticos producidos a partir de 6-APA y 7-ADCA (ácido deacetoxicefalosporánico) en 1985 fué aproximadamente de 800 millones de dólares, de los cuales los más importantes en volumen son: la ampicilina de la cuál produjeron 3600 toneladas (utilizando 2350 toneladas de 6-APA) y la amoxicilina con una producción de 1800 toneladas (utilizando 700 toneladas de 6-APA).

El precio de venta del 6-APA (US\$ 80/Kg) (2) es muy cercano al costo de producción ya que el precio de la penicilina es de US\$30/Kg y se requieren 2 Kg de penicilina/Kg de 6-APA, que corresponde a un 75% del precio, quedando un pequeño margen entre el costo y el precio. Por esta razón las empresas productoras han encontrado enormes ventajas económicas en el empleo de un proceso que integra la producción del 6-APA con la producción de penicilina, por lo que los productores de penicilina son generalmente productores de 6-APA, para disminuir los costos provenientes de la materia prima.

La producción de 6-APA se puede realizar tanto por vía química como enzimática, sin embargo el costo de producción por vía química es de 10-12 dólares/Kg de 6-APA (3), mientras que por el método enzimático este costo es de solo 3-4 dólares/Kg y si el mismo productor fabrica también la enzima este costo se reduce a solo \$US 1/Kg.

TABLA 4
PROYECCION DE LA DEMANDA DE PENICILINAS (3)

ANO	PENICILINA G (ton/año)	PENICILINA V (ton/año)
1985	11200	3800
1990	13000	4700
2000	17000	5700

Por esta razón los principales productores de penicilina en el mundo (Bayer y Beecham), son también de los principales productores de 6-APA a nivel mundial, como se observa en la Tabla 5 y utilizan el método enzimático, con biocatalizador producido por ellos mismos.

En países en vías de desarrollo, el cambio del método químico al enzimático se ha dado en forma más lenta, principalmente por la elevada inversión inicial que conlleva el cambio en la tecnología, y porque a pesar de sus ventajas, las enzimas son muy sensibles a cambios en el pH, temperatura y calidad de las materias primas, lo cuál exige un estricto control del proceso, para obtener un máximo beneficio del biocatalizador. De aquí que un amplio conocimiento del biocatalizador sea una condición imprescindible en su empleo, para lograr competitividad en el mercado internacional. Por ejemplo en América Latina algunas empresas compran el biocatalizador y otras lo reciben de su casa matriz.

TABLA 5
PRINCIPALES PRODUCTORES DE 6-APA

PRODUCTOR	PROD. (TON)	MAT. PRIMA	METODO
Bayer	800	Pen G	Propio. PG acilasa
Beecham	640	Pen G	Propio. PG acilasa
Bristol	620	Pen V	Propio. PV acilasa
Fermenta	500	Pen V	Biochemie PVacilasa
Antibióticos	480	Pen G	Propio. PG acilasa
Biochemie	150	Pen V	Propio. PV acilasa
Hoescht	130	Pen G	Propio. PG acilasa
FAKO	100	Pen G	Químico
Otros	660	Pen G y V	Enzimático/Químico

ANTECEDENTES

1. PENICILINO AMIDASA

1.1. Introducción.

El uso de las penicilinas semisintéticas se inicia con el descubrimiento del núcleo de la penicilina, ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), por Batchelor y colaboradores en 1959 (4) y el consecuente desarrollo de métodos de producción del mismo, por reacción de deacilación de penicilina G (bencilpenicilina) o V (fenoximetilpenicilina). Existen 2 procesos posibles para la deacilación de la penicilina: el químico y el enzimático. Las ventajas de cada sistema han dependido en el pasado del grado de desarrollo tecnológico en las compañías productoras y hasta hace poco ambos sistemas han sido utilizados por la industria (5, 6). Sin embargo, el método químico presenta ciertos requerimientos de proceso que lo hacen poco ventajoso, como son el empleo de condiciones criogénicas, solventes orgánicos y la necesidad de un ambiente totalmente libre de agua. En los años 60 cuatro compañías farmacéuticas reportaron el hallazgo de enzimas microbianas capaces de deacilar la penicilina G o V: Bayer A.G., en *E. coli* (7), Beecham en *Streptomyces lavendulae* (8), Bristol-Myers en *Alcaligenes faecalis*(9) y Pfizer en *Proteus rettigeri*(10). La disponibilidad de una ruta enzimática, sin duda alguna atrajo la atención de las empresas productoras. Otro factor que contribuyó al desarrollo de la ruta enzimática fué la industrialización durante los años 70 de procesos con enzimas inmovilizadas, que resultan más eficientes al reducir los costos del biocatalizador, tanto por la reutilización de la enzima inmovilizada, como por el aumento en la productividad de la reacción al poder realizar procesos continuos.

La penicilino amidasa, (E.C. 3.5.11.1) hidroliza la penicilina G o V según la reacción que se muestra en la Figura 1.

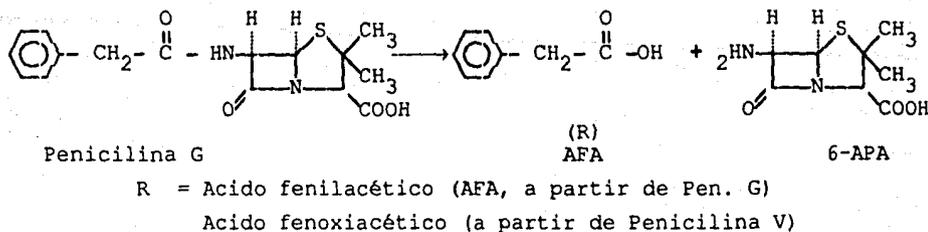


FIGURA 1. Esquema de la reaccion de hidrolisis de la penicilina por el metodo enzimatico.

1.2. Fuentes de la enzima

La penicilino amidasa o penicilino amidohidrolasa (E.C.3.5.1.11), se clasifica con base en la especificidad por el sustrato en:

Tipo I: aquellas enzimas de bacterias u hongos que hidrolizan preferencialmente Penicilina V (fenoximetilpenicilina).

Tipo II: basicamente encontradas en bacterias y caracterizadas por su especificidad por Penicilina G (Bencilpenicilina).

Tipo III: enzimas de *Pseudomonas melanogenum* que hidrolizan especificamente ampicilina (D(-)-A-aminobencilpenicilina) y de *Kluyvera citrophila* que hidroliza cefaloridina (11).

Se han realizado múltiples estudios de selección de microorganismos con actividad penicilino amidasa y aún eliminando aquellos con actividad β -lactamasa, el número de microorganismos que han mostrado poseer actividad penicilino amidasa es amplio. Dentro de los más importantes se encuentran cepas de *Escherichia coli* (P. G acilasa) (12, 13); *Fusarium oxisporium*, (P. V acilasa) (14); *Kluyvera citrophila* (P. V acilasa) (15), *Proteus rettigeri* (P. G acilasa) (16), ; y *Bacillus megaterium* (P. G acilasa) (17).

1.3. Producción y purificación de la enzima.

La penicilino amidasa de *E. coli* ha sido la enzima más utilizada a nivel industrial en el proceso de producción del 6-APA a partir de la penicilina G. Se trata del microorganismo mejor conocido desde el punto de vista genético, facilitando la manipulación genética para incrementar el rendimiento de penicilino amidasa y disminuir las enzimas indeseables, particularmente penicilinasas o β -lactamasas (que rompe el anillo β -lactámico). También es adecuado por la facilidad de producción en grandes lotes en cortos tiempos, dada su alta velocidad de crecimiento.

La penicilino amidasa de *E. coli* es una enzima periplásmica, que se produce por fermentación en un medio que contiene ácido fenilacético como inductor, a pH 7.0 entre 24 y 30°C, durante 20-24 horas (18, 19). Dos condiciones importantes para la producción de la enzima son la ausencia de carbohidratos fermentables y una baja velocidad de aireación; Vojtisek y Slezac en 1975 demostraron una completa inhibición de la síntesis de la enzima a elevadas concentraciones de oxígeno (20).

El medio de cultivo más empleado para la fermentación consiste en (g/L): peptona 10-20, ácido fenilacético 2.0, extracto de levadura 5-10, fosfato de potasio 7 y sales de metales como sulfato de magnesio 0.2, sulfato ferroso 0.02 y cloruro de calcio 0.3.

La recolección de células, su lisis para extracción de la enzima y la purificación subsecuente han sido extensamente estudiados. La actividad enzimática ha sido empleada en varias formas: como células totales, como células totales inmovilizadas (21, 22), y como enzima inmovilizada, parcialmente purificada (23).

Balasingham (13) describe un proceso en el cual una cepa de *E. coli* suministrada por Beecham Research Laboratories es utilizada para extraer la enzima por rompimiento celular en un homogenizador de alta presión; posteriormente se separan los restos celulares por centrifugación y precipitación de ácidos nucleicos por adición de sulfato de estreptomycin. La enzima

soluble es purificada por precipitación selectiva con sulfato de amonio al 60% de saturación y fraccionamiento con polietilenglicol (10-20%), seguido por diálisis y secado por liofilización. Cardoso (24), utilizó un método de extracción similar, pero la purificación la realizó por precipitación con alcohol isopropílico y la enzima es redisuelta en buffer acetatos para su inmovilización por entrecruzamiento con glutaraldehído. En 1984 Mahajan (25) reportó un nuevo método para la purificación de penicilino amidasa empleando cromatografía de interacciones hidrofóbicas, utilizando amoxicilina, ampicilina o fenilglicina como ligandos que se unen a soportes de agarosa o celulosa. La penicilino amidasa se retiene en estas columnas y es posteriormente eluida con gradiente de sulfato de amonio y se purifica por cromatografía de intercambio iónico y precipitación con sulfato de amonio; de esta forma se obtiene un 75 a 85 % de recuperación de actividad, por lo que Mahajan considera el proceso económicamente viable para ser utilizado a nivel industrial. Rodríguez (26) realizó una revisión de los diferentes métodos de purificación de la enzima tanto a nivel laboratorio como a nivel de planta piloto, encontrando que los procesos reportados varían entre 2 y 8 etapas con un promedio de 5.

1.4. Características de la enzima libre

En 1974, Kutzbach y Rauenbusch (27) reportaron para la penicilino amidasa un peso molecular de 70,000 daltons, determinado por filtración en gel y la formación de dos subunidades de 70,000 y 20,000 por electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio. Posteriormente, en 1986, Bruns et al (28) confirmaron que las 2 subunidades de la proteína activa, se derivaban de un polipéptido precursor de 92 KDaltons de peso molecular, que se procesa en el periplasma, dando como resultado una subunidad β de 65 KDaltons, un péptido espaciador y una subunidad α de 29 Kdaltons, que se procesa para producir finalmente su peso molecular de 20.5 KDaltons. La enzima presenta un pH isoeléctrico de 6.3 a 6.5.

En la Tabla 6 se presenta el pH óptimo para la enzima libre. Como se aprecia, el pH óptimo para la actividad hidrolítica de

TABLA 6

CARACTERISTICAS DE LA PENICILINO AMIDASA LIBRE

ENZIMA	pH óptimo	Temperatura óptima °C	Ea cal/mol	Ed cal/mol	Referencias
E. coli ATCC 9637	7.8 - 8.0	50 - 52	---	---	(29)
E. coli NCIB 8743A	8.0 - 8.5	---	8550	---	(15)
E. coli	---	---	---	13750	(30)
E. coli	8.0 - 8.5	45 - 55	---	---	(31)

la penicilino amidasa se encuentra entre 7.5 y 8.2. Así mismo, se observa que la temperatura óptima para la actividad se encuentra entre 45 y 55°C. A temperaturas mayores la enzima sufre desactivación irreversible. El valor de la energía de activación reportada es de 8550 cal/mol. La energía de desactivación se ha determinado con células libres e inmovilizadas obteniendo valores de 14011 y 22344 cal/mol respectivamente (22).

Se han realizado escasos estudios sobre la estabilidad térmica de la enzima libre, ya que casi todos los reportes se refieren a células libres e inmovilizadas, o bien a la enzima inmovilizada. Bryjak et al. (31) realizaron un estudio de estabilidad de la enzima libre de *E. coli* almacenada a 4°C; ésta perdió menos de 10% de su actividad inicial después de 100 días de almacenamiento. De igual forma, al colocar la enzima durante una hora a una temperatura de 45°C se retiene un 90% de su actividad, mientras que a 55°C en ese mismo tiempo se pierde el 80%. Burteau (32), realizó otro estudio incubando la enzima a 55°C en buffer fosfatos 50 mM pH 7.8 y observó total inactivación después de 30 minutos.

Greco y colaboradores (33), realizaron un estudio de desactivación térmica de la enzima purificada de *E. coli* a 55°C, encontrando que es un proceso de primer orden e irreversible, con un tiempo de vida media de 1.6 horas. También se realizó el estudio de estabilidad de la enzima a 35°C, encontrando un tiempo de vida media de 4.8 días (115.2 horas).

En general, se observa que la enzima libre es termosensible, siendo ésta la principal desventaja para su empleo en reactores enzimáticos.

Aunque el pH es un factor importante en la reacción, ya que el ácido fenilacético producido debe ser neutralizado constantemente en la reacción, no existen muchos reportes acerca de la estabilidad de la enzima en relación con el pH. Para la enzima de *E. coli* no se ha realizado un estudio de este tipo. Existen reportes de los perfiles de pH para células libres e inmovilizadas y en ellos se observa en general un pH óptimo para la estabilidad de 7.0 y 8.0 (34).

Shimizu et al. (15) se refieren a la estabilidad de la penicilino C-acilasa de *Kluyvera citrophila* que presenta actividad hidrolítica sobre cefalexina, con un pH óptimo de actividad de 7.3; se estudió la estabilidad en el rango de pH 4-9 después de almacenarse 15 minutos, encontrándose la máxima estabilidad entre 5.5 y 7.0.

Características cinéticas de la enzima.

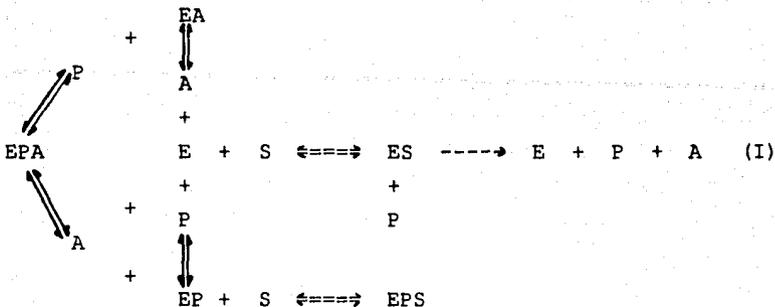
La penicilino amidasa de *E. coli* es una enzima que sigue la cinética de Michaelis Menten, siendo inhibida competitivamente por ácido fenilacético y no competitivamente por ácido 6-amino penicilánico; también sufre inhibición acompetitiva por altas concentraciones de sustrato, por lo cuál sigue un modelo cinético bastante complejo. La Tabla 7 resume los reportes de las constantes cinéticas para la enzima libre. En general los valores de K_m reportados para esta enzima son menores que los reportados para enzimas de otras fuentes, como puede constatarse en las revisiones publicadas recientemente (29,36), lo que indica que la enzima presenta una mayor afinidad por el sustrato, o sea que la enzima permanece en velocidad máxima aún a concentraciones de sustrato muy bajas.

En la Tabla 7 puede observarse que el K_m reportado para la enzima libre varía en un rango de 0.01 a 1 mM, mientras que las constantes de inhibición por AFA y 6-APA se encuentran entre 0.1 y 10 mM. El inhibidor que tiene menor influencia en esta reacción es el sustrato y su constante de inhibición es del orden de 100 mM, por esta razón su efecto solo se observa a concentraciones de penicilina mayores a 10% (268 mM).

Balasingham y colaboradores (13), han propuesto un modelo cinético para la reacción de hidrólisis de penicilina con penicilino amidasa de *E. coli*. Este modelo incluye la inhibición por AFA y 6-APA. El mecanismo de reacción se representa a continuación:

TABLA 7
CARACTERISTICAS CINETICAS DE LA PENICILINO AMIDASA

Fuente de la enzima	pH	T°C	K _m (mM)	K _s (mM)	K _{6apa} (mM)	K _{afa} (mM)
<i>E. coli</i> NCIB 8743A(15)	8.0	37	0.79	4.8	7.1	270
<i>E. coli</i> (36)	7.0	37	0.23	0.9	0.24	238
<i>E. coli</i> ATCC 11105 (30)	8.1	25	0.02	0.2	15.0	-
<i>E. coli</i> NCIM 2400 (37)	8.0	50	0.04	-	-	-
<i>E. coli</i> (38)	7.8	-	1.1	-	-	-



Donde

- E = concentración de enzima libre
- S = Concentración de penicilina
- P = Concentración de ácido 6-aminopenicilánico (6APA)
- A = Concentración de ácido fenilacético (AFA)

La ecuación de velocidad para este mecanismo de reacción es el siguiente:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + K_m/S (1+A/K_{afa}) + P/K_{6apa} (1+K_m/S) + A P/S (K_m/K_{afa} K_{6apa})} \quad (\text{II})$$

Donde

- K_m = Constante de Michaelis-Menten
- K_{afa} = Constante de inhibición por AFA
- K_{6apa} = Constante de inhibición por 6-APA
- V_{\max} = Velocidad máxima

Para la penicilino amidasa de *Bacillus megaterium* Ryu et al. (18) han propuesto un modelo similar al anterior, pero con la diferencia de que no involucra la formación del complejo EPA. La ecuación de velocidad para este mecanismo es la siguiente:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + K_m/S (1+A/K_{afa}) + P/K_{6apa} (1+K_m/S)} \quad (\text{III})$$

Lee y Ryu (38) realizaron un estudio de simulación por computador para comparar estos 2 modelos cinéticos. Para ello utilizaron las constantes cinéticas de las enzimas de *E. coli* y *B. megaterium* y las ecuaciones en estado estable para el sistema de tanque

continuo agitado, y encontraron que para la enzima de *B. megaterium* al introducir sus constantes cinéticas en las ecuaciones de los dos modelos no se observaba diferencia en la conversión ni en la productividad, mientras que al introducir las constantes de la enzima de *E. coli*, se obserbaban diferencias significativas en dichos parámetros, lo que sugería que la enzima de *E. coli* tiene un mecanismo de reacción en el cuál la formación del complejo EPA tiene influencia en la velocidad de reacción, mientras que en el caso de *B. megaterium* este complejo no se forma o su formación no influye en la velocidad de reacción.

Balasingham y colaboradores (15) plantean un mecanismo de reacción similar al propuesto para la enzima de *E. coli* pero además tienen en cuenta la inhibición por exceso de sustrato, lo que equivale a añadir a la ecuación (II) el término S/K_s .

2. CATALIZADORES INDUSTRIALES DE PENICILINO AMIDASA

2.1. Procesos de producción de los biocatalizadores.

Existen principalmente 2 tipos de catalizadores de penicilino amidasa inmovilizada: enzimas y células. En la Figura 2 se resumen algunas estrategias para la elaboración de los mismos. El proceso para su producción consiste en la fermentación del microorganismo, utilizando como inductor el ácido fenilacético, posteriormente se cosechan las células que en un caso se inmovilizan y en el otro sufren un proceso de ruptura para la extracción y posterior purificación de la enzima. El proceso de purificación conlleva generalmente varios pasos como son la eliminación de restos celulares y la precipitación de la enzima con solventes o con sales como sulfato de amonio; en el segundo caso se realiza un proceso de desalado para proceder a la cromatografía. Con esto se obtiene una enzima de suficiente pureza para ser inmovilizada por el método elegido.

Se han realizado numerosos reportes sobre la inmovilización de la enzima: en las Tablas 8 y 9 se presenta una revisión bibliográfica realizada para la penicilino amidasa, donde se aprecia la

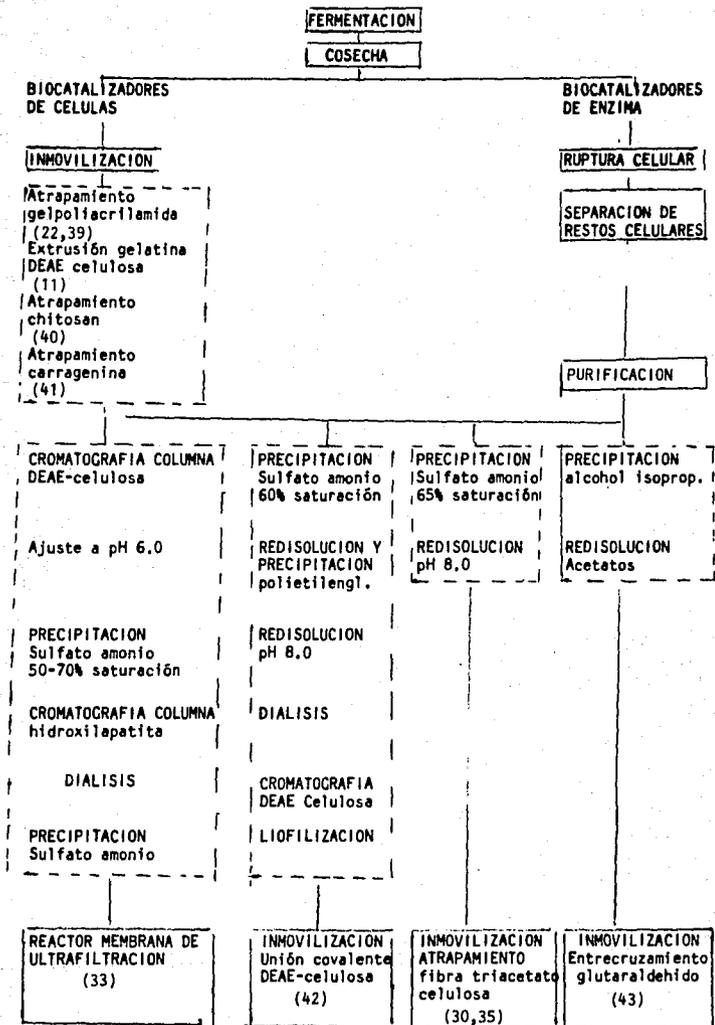


FIGURA 2. Estrategias de producción de biocatalizadores de penicilino amidasa de *E. coli*.

TABLA B'

METODOS DE INMOVILIZACION EMPLEADOS PARA LA PENICILINO AMIDASA

ENZIMA	FUENTE	PREPARACION	MET. INMOVILIZACION	SOPORTE	REFERENCIA
PG Acilasa	E. coli	Prec. acet.	Adsorción entrecr.	Chitosan	(23)
PG Acilasa	E. coli	--	Enlace covalente	Acrílico	(29)
PG Acilasa	E. coli	Celulas	Atrap. en gel	Poliacril.	(21)
PG Acilasa	E. coli	Prec. amonio	Acoplamiento	Silica gel activada	(33)
PG Acilasa	E. coli	Celulas	Extrusión	Gelatina-DEAE-cel.	(42)
PG Acilasa	E. coli	---	Atrapamiento	Gelatina celulósic	
PG Acilasa	B. megaterium	Centrifug.	Adsorción	Bentonita	(17)
PG Acilasa	E. coli	Prec. amonio	Atrapamiento	Triacetato celulosa	(30)
PV Acilasa	Pleorotus ostreus	---	Unión covalente	Eupergit C.	(44,45)
P Acilasa		---	Afinidad AFA ligando	Eupergit C.	(46)
PG Acilasa	E. coli	Células	Atrapamiento	Copolimer. acrílicos	(47)
PV Acilasa	Malbran. pulchella	Células	Atrapamiento	Alginatos poliacr.	(48)
PG Acilasa	E. coli	Prec. alc. isoprop.	Entrecruzamiento	Glutarald.	(24)
PG Acilasa	E. coli	Células	Atrapamiento	Carragenina	(41)
PG Acilasa	E. coli	Células	Atrapamiento	Eudragit.	(49)
PG Acilasa	E. coli	E. pura	Coinmovilización ureasa, atrapam.	Gelatina glutaraldeh.	(50)
PG Acilasa	E. coli	Prec. amon. cromat. celulosa	Unión covalente	DEAE-celulosa	(42)
PG Acilasa	B. megaterium	---	Unión covalente	Poliacriló nitrilo	(51)
PV Acilasa	---	Homog. cel.	Unión covalente	Glutarald.	(51)

TABLA 9
SOPORTES EMPLEADOS EN LA INMOVILIZACION DE PENICILINO AMIDASA

EMPRESA	FUENTE DE LA ENZIMA	SOPORTE	REFERENCIA
Rohm Pharma	<i>E. coli</i>	Eupergit C.	(52)
Astra Alab AB	<i>E. coli</i>	Sephadex G200	(36)
Boerfnger Manheim	<i>E. coli</i> recombinante	Poliacrilamida	(53)
Riedel de Haen	Pen G. acilasa	VA-EpoxiBiosynth	(1)
Beecham	<i>E. coli</i>	Gránulos rígidos Dextran Sephadex	(2)
Toyo Jozo	<i>B. megaterium</i>	Fibras de poli- acrilnitrilo	(2)
Hindustan Antibiotics Ltd	<i>E. coli</i>	Celulosa	(36)
Genin	<i>E. coli</i>	Resina epoxiacrí- lica	(78)

utilización de numerosos métodos de inmovilización, que incluyen atrapamiento, enlace covalente, intercambio iónico y entrecruzamiento, así como una gran variedad de soportes. Para los catalizadores industriales, no siempre se reporta el método de inmovilización ni el soporte empleado.

2.2. Características operacionales de los biocatalizadores.

Con anterioridad se mencionaron las características de la enzima libre. En la Tabla 10 se presentan las características de temperatura y pH óptimos para la actividad y de operación de diferentes enzimas inmovilizadas reportados en la literatura. Realizando una comparación con la enzima libre, se observa que se conserva el pH y temperatura óptimos para la actividad; sin embargo, la operación de los reactores en general se realiza a pH 8.0 o sea al óptimo, pero la temperatura empleada se encuentra entre 35 y 40°C; esto ocurre, por una parte, debido a la estabilidad de la penicilina y el 6 -APA y por otra, a la poca estabilidad de la enzima a altas temperaturas. Esto a pesar de que la enzima inmovilizada es mucho más estable que la enzima libre, y los estudios muestran como, mientras que la enzima libre tiene un tiempo de vida media del orden de horas, la enzima inmovilizada puede llegar a tener tiempos de vida media 1000 veces mayores, como se observa en las Tablas 10 y 12.

La Tabla 11 resume las características cinéticas de la penicilino amidasa inmovilizada; en general la inmovilización aumenta el K_m indicando una menor afinidad, probablemente ocasionado por problemas difusionales; además, las constantes de inhibición son mayores en un orden de magnitud, lo que indica un menor efecto de los inhibidores, probablemente debido también a la dificultad de los inhibidores para llegar a la enzima.

La Tabla 12 nos muestra las características operacionales de catalizadores industriales de penicilino amidasa. Es importante observar algunas de las condiciones de operación empleadas por las diferentes empresas. Toyo Jozo emplea penicilino amidasa de *E. coli* inmovilizada en fibras de poliacrilonitrilo, en un reactor de columna compuesto por 6 camas de biocatalizador. Las

TABLA 10
CARACTERISTICAS OPERACIONALES DE LOS BIOCATALIZADORES
DE PENICILINOAMIDASA

BIOCATALIZADOR	pH óptimo	Ea cal/mol	Ed cal/mol	pH de operación	Estabi- lidad	T°C óptima	[S] g/L	T°C operación	REFERENCIAS
PGA inmovilizada en polímeros acrílicos	8-8.5			7.8	412	45-55°C		37°C	(29)
PGacilasa acoplada a dextran oxidado con peróxido e inmoviliza- do con sílica activada con amina					75%60min	55°C			(31)
P. acilasa E. coli cefalosporina G	8.0-8.35			8.0		38°C	30-40	35°C	(41)
PGacilasa B. megatherium inmov. en bentonita				8.0				40°C	(33)
PGacilasa E. coli atra- pada en fibra de triacetato de celulosa				8.0			120	37°C	(30)
PGacilasa E. coli inmov. Quitosano				8.0	70 ciclos		20-40	37°C	(23)
Semacilasa PVacilasa	6.5	6348	5870	8.0		45°C			(55)

TABLA 11
 CONSTANTES CINÉTICAS DE DIFERENTES BIOCATALIZADORES
 DE PENICILINO AMIDASA

BIOCATALIZADOR	T°C	pH	K _m (mM)	K _i (6-APA) (mM)	K _i (AFA) (mM)	K _s (mM)	REFERENCIA
ENZIMA LIBRE	37	7.8	0.02-1.1	0.24-15	0-2-0.9	130-270	(13, 23, 27, 35, 36, 37)
Enz. inmov. quitosano	37	8.0	2.22	---	---	---	(23)
Enz. inmov. XAD-7	37	7.8	5-7	---	---	---	(12)
Enz. inmov. DEAE-cell.	37	8.0	0.63	9.0	4.6	250	(42)
Semacilasa PenVacil.	50	7.0	10.0	200.0	50(FA)	---	(56)
PG acilasa estabilizada e inmovilizada en silica gel activada	-	7.8	0.39	---	---	---	(33)

24⁴

12
CARACTERISTICAS OPERACIONALES DE LOS BIOCATALIZADORES INDUSTRIALES
DE PENICILINO AMIDASA INMOVILIZADA

BIOCATALIZADOR	EMPRESA	REACTOR	pH	T°C	ACTIVIDAD U/g	t _{1/2} (h)	[S] (g/L)	CARGA E. U E g S	NC	BASE NEUT	PROD. g/g	REFERENCIAS
P. acilasa E. coli cefalosporina G.	CIPAN Portugal	Columna recirculación	8.0	35	-	1090	30-40	109	97	NaOH 4N	-	(43)
PV acilasa Novozym	NOVO Italia	Columna recirculación	7.0	35	-	2000	100	-	-	-	-	(37)
PV acilasa Somacilase	NOVO Italia	Tanque agitado (mejor opción) Columna empa- cada recirculada	7.5	35	60	1000-2000	100	-	98	NaOH	210 (2t _{1/2})	(55-58)
PG acilasa E. coli	CIPAN Portugal	Columna recirculación	7.9			2248	77	58.5	98	NaOH 8M	-	(24)
PG amidasa	SCLAVO Italia		7.8	28	150	500 ciclos (4 meses)	90	-	99	NH ₄ OH 2.5N	400	(59)
PG amidasa cefalosporina	SCLAVO Italia		7.8	28	150	300 ciclos (4 meses)	70	-	97	NH ₄ OH 2.5N	355	(59)
PG acilasa E. coli (Eupergit PCA)	ROHM PHARMA	Tanque agitado	8.0	37	100-150	1000	80	-	99	-	250-300	(52)
PG acilasa E. coli en Sephadex G200	ASTRA Alabab	Columna empacada	7.8	37	200-250	-	-	-	97	-	757	(36)
PG acilasa E. coli recombinante inm. en poliacrilamida	BOERINCER Manheim	Tanque agitado	8.0	28	310-360	1000-1500	72-100	-	97	-	1000	(53)
PG acilasa de E. coli inmov. en granulos	BEECHAM	Columna	7-8	35-40	-	2000-4000	40-150	-	-	-	1000-2000	(2)
PG acilasa de B. megaterium en fibras de poliacrilonitrilo	Toyo Jozo	Columna en paralelo	8.4	30-36	200	1200	100	-	-	-	500-700	(3)
PG acilasa de E. coli inmovilizada en celulosa	Hindustan Antibiotics Ltda	Tanque agitado	7.8-8	37	600	600	70	-	97-98	-	100	(37)
PG acilasa de E. coli inmovilizada en amberlita	ORSABE México (BEECHAM)	Tanque agitado alimentado	8.0	37	180	300ciclos (4meses)	80	366	97	NaOH 0.75N Manual	-	(62)

U/g: Unidades de enzima/g cataliz. t_{1/2}: tiempo de vida media [S]: concentración PGK CARGA E.: Unidades de enzima/g PKC
PROD. : Productividad (g de 6-APA/g biocatalizador)

colocan nuevas camas activas. Se utiliza reacción por lote, recirculando la solución de penicilina a través de la columna, a una temperatura entre 30 y 36°C, manteniendo el pH constante por adición de NaOH 4N. La mezcla de reacción se transfiere a un recipiente de cristalización y se añade metanol para precipitar el 6-APA por ajuste del pH con HCl 6N, el producto se filtra y seca al vacío para obtener un 6-APA con más de 98% de pureza, con un rendimiento teórico de 86%. El tiempo de reacción es de 3 a 3.5 horas, dando 125 Kg de 6-APA; se realizan 2 ciclos por día (60). En México, la empresa Fersinsa emplea del orden de 18 columnas empacadas con el catalizador de enzima inmovilizada en poliacrilonitrilo.

Snam Progetti lleva a cabo la reacción de hidrólisis también por lote, en una columna empacada con penicilino amidasa atrapada en fibras, pH 8.0 y una temperatura de 37°C, utilizando penicilina o cefalosporina a una concentración de 6 a 12% en agua, con lo cual logra una conversión de 98%. La recuperación del 6-APA o 7-ADCA se realiza como en el caso anterior por ajuste del pH y precipitación en presencia de un solvente orgánico, logrando una pureza superior al 96-98% y un rendimiento total (de hidrólisis y recuperación) entre 85 y 90% (61). El ciclo de hidrólisis es de 3 horas, y esta empresa realiza 4 lotes/día; el tiempo de descarga y comienzo de un nuevo ciclo es de 1.5 horas (30). Se indica que el tiempo de vida del catalizador depende estrictamente de la pureza de la cefalosporina G, en el caso de obtención de 7-ADCA, la cual debe ser de 95%. En estas condiciones se obtienen 150 Kg de 7-ADCA/Kg de fibras (base seca), con un rendimiento de 85-90%. El rendimiento de 6-APA es de 240 Kg/Kg de catalizador (base seca), por un período de más de 4 meses (30). El volumen de su reactor es de 100 L y su producción de 6-APA es de 12 toneladas/año.

Tanabe Seikaku Co. emplea células de E. coli inmovilizadas en gel de poliacrilamida, con penicilina G (0.05 M o 17 g/L) en buffer fosfatos-boratos 0.01 M pH 8.5 a 30°C con un rendimiento de 80% respecto a Penicilina G., que es bajo en comparación con los otros procesos reportados; el tiempo de vida media del catalizador bajo estas condiciones de operación es de 42 días a 30°C y 17 días a 40°C.

En un proceso industrial chino, (63) se empleó una cepa de *E. coli* con alta actividad de penicilino amidasa, la cuál fué inmovilizada en gel de agar o gelatina, con posterior entrecruzamiento con glutaraldehído; estas 2 preparaciones han sido empleadas desde 1978 en la industria farmacéutica para la producción de 6-APA y posteriormente para la de 7-ADCA. En este proceso, después de 285 ciclos de producción de 6-APA sobre 7.5 meses, la velocidad de hidrólisis permanece constante. Según Yokote (64), la columna con células inmovilizadas se empleó para la producción de 7-ADCA durante 30 días sin disminución de la actividad, mientras que una columna a nivel industrial se operó 72 veces en un período de 3 meses.

Spofa, United Pharmaceutical Works de Checoslovakia (60), emplea células con alta actividad de penicilino amidasa, sometidas a ruptura y entrecruzadas covalentemente, para la producción de 6-APA desde 1979; el tiempo de vida media de este catalizador es de mínimo 500 ciclos de 2 horas c/u, a 37°C y pH 7.8.

Hindustan Antibiotics. Ltd. utiliza penicilino amidasa unida covalentemente a celulosa modificada para la producción de 6-APA (36). La reacción se lleva a cabo en un reactor continuo agitado de 100 L, con penicilina G (50 g/L) empleando una relación enzima: penicilina de 2:1 (v/v), a una temperatura de 40°C manteniendo el pH entre 7.5 y 7.8 por adición de álcali. El biocatalizador tiene una actividad de 300 U/mg. Se producen 4.6 Kg de penicilina G empleando 3.6 Kg de enzima (que contiene 0.37 Kg de proteína).

Röhm Pharma (60) desarrolló un biocatalizador de penicilinoamidasa inmovilizada en Eupergit (resina epóxica), el cuál se utilizó por lotes, llevando a cabo más de 500 ciclos de reacción, logrando una productividad de 200 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, con ciclos de 80 a 120 minutos, con penicilina G potásica al 8%. y también 8% de catalizador (peso húmedo), obteniendo 98-99% de conversión y un rendimiento de 50% (referido a peso de penicilina G potásica); el tiempo de operación promedio es de 100 minutos, 20 minutos de llenado y 15 a 45 minutos de extracción de la mezcla de hidrólisis, lo cuál proporciona un tiempo de operación de 3 horas, logrando 8 lotes/día.

CIPAN (25) utiliza penicilino amidasa de *E. coli* inmovilizada por entrecruzamiento con glutaraldehído, para la producción de 6-APA y 7-ADCA. Para ello emplea una columna con recirculación a 35°C y pH 7.9. En el caso de 6-APA la concentración de penicilina es 77 g/L, y una relación enzima/penicilina de 58.5 Unidades/g, ajustando el pH con NaOH 8M y obteniendo así 98% de conversión. Este biocatalizador tiene un tiempo de vida media de 2248 horas, que es un valor más alto que los observados en los otros casos. Sin embargo se debe destacar que el volumen de este reactor es el más pequeño.

SCLAVO (Italia) (59) emplea una penicilino G amidasa inmovilizada para la obtención de 6-APA y 7-ADCA, a un pH de 7.8 y una temperatura de 28°C, a una concentración de penicilina de 90 g/L y de cefalosporina de 70 g/l, obteniendo 99% y 97% de conversión respectivamente, en ciclos de 3 horas en promedio; la vida media de su enzima es de 500 y 300 ciclos, logrando una productividad de 400 Kg de 6-APA/Kg de enzima y 355 Kg de 7-ADCA/Kg de enzima.

Beecham (2) emplea penicilino G amidasa de *E. coli* inmovilizada en esferillas de dextran/sephadex, en un reactor en columna, a pH entre 7 y 8 y una temperatura de 35 a 40°C y una concentración de penicilina de 40 a 150 g/L, obteniendo una productividad de 1000 a 2000 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, con un tiempo de vida del catalizador de 2000 a 4000 horas. En México, la empresa Orsabe (62), filial de Beecham, utiliza un biocatalizador de penicilino G acilasa inmovilizada en amberlita, a un pH de 8.0 y una temperatura de 37°C, en un reactor de tanque agitado; la concentración de penicilina que emplean es de 80 g/L, la cuál es alimentada al reactor que tiene un volumen de 6000 L, en un tiempo de 2 horas; la duración de la reacción para alcanzar 97% de conversión es de 6 a 8 horas; una característica importante de anotar es que el control del pH se efectúa manualmente cada 5 minutos, ajustándose con NaOH 0.75 M. Este biocatalizador se emplea durante 300 ciclos (correspondiente a 4 meses de trabajo), obteniendo una productividad de 250 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador.

La enzima de la cual existe mayor información es la Penicilino V acilasa de Novo (Semacilasa); esta enzima ha sido empleada en reactor de tanque agitado o en reactor de lecho empacado recirculado (55); su tiempo de vida media a 37°C y pH 7.5 es de 2000 horas obteniendo una productividad acumulada de 200 Kg de 6-APA/Kg de enzima en un tiempo de vida media, con una actividad inicial de 60 U/g; la productividad operacional inicial es 0.2 g 6-APA/h/g de semacilasa. El proceso de cristalización es sencillo, emplea solvente orgánico y produce un rendimiento de 90%, para obtener un rendimiento total del proceso de cerca de 86%.

En general la producción industrial de 6-APA se lleva a cabo a una temperatura de 30-40°C, y un pH de 7.5-8.0, a una concentración de penicilina de 80 a 120 g/L. Un parámetro importante al que frecuentemente se hace referencia es la carga de enzima, que se refiere a las unidades de enzima/g de penicilina: usualmente se emplea 60 a 150 U/g. La mayoría de las empresas utilizan como base neutralizante hidróxido de sodio a concentraciones entre 2.5 y 8 M. Los reactores más empleados son el tanque agitado y el sistema de columna con recirculación, en ambos casos por lote; el tiempo del ciclo es variable, ya que se debe mantener un % de conversión mínimo de 95%, lo cual permite obtener un rendimiento de 85-90%. El tiempo de vida media de los biocatalizadores varía entre 500 y 2000 horas, proporcionando productividades que varían entre 200 y 2000 g de 6-APA/g de biocatalizador; sin embargo la mayoría de los catalizadores se encuentran en un rango de 200-500 g de 6-APA/g de catalizador.

Con base en lo antes expuesto, resulta evidente que para que un biocatalizador pueda competir en el mercado, debe tener las siguientes características:

1. Alta estabilidad en las condiciones de operación, lo que resulta en un largo tiempo de vida media.
2. Conversiones elevadas en tiempos cortos para lograr la máxima productividad (alta actividad específica).

3. MODELAMIENTO CINETICO DE LOS CATALIZADORES DE PENICILINO AMIDASA Y SU USO PARA EL DISEÑO DE REACTORES.

Como se mencionó para la enzima libre, se han propuesto 2 modelos cinéticos basados en la ecuación de Michaelis Menten, involucrando la inhibición por AFA y 6-APA. Warburton et al. (42) utilizaron el modelo para la enzima de *E. coli*, para predecir el progreso de la reacción en sistema en lote, con penicilino amidasa libre e inmovilizada, así como para la enzima inmovilizada en tanque continuo agitado. Posteriormente se realizaron estudios con el objeto de validar el modelo; dichos estudio fueron desarrollados con la enzima libre en reactor de 50 mL y los correspondientes a la enzima inmovilizada fueron realizados en reactor de 3 litros, en buffer fosfatos 0.05 M pH 8 a 37', a varias concentraciones de sustrato: 15, 50 y 150 mM y sus resultados son comparables a la predicción del modelo. También comparan el sistema de tanque continuo agitado y el flujo pistón y encuentran para una determinada conversión más favorable el reactor de flujo pistón, principalmente a altas concentraciones de sustrato, al requerirse un tamaño menor de reactor. Además, encontraron que el reactor en lote es más conveniente que el tanque continuo agitado en términos de productividad ya que en el sistema continuo el biocatalizador esta siempre en contacto con la mayor concentración de productos (la de salida), mientras que en el sistema en lote, esta concentración va aumentando con el tiempo.

Park et al. (34) utilizaron la ecuación propuesta por Warburton para el desarrollo de un modelo cinético de penicilino amidasa inmovilizada. El biocatalizador empleado consistió de células de *E. coli* atrapadas en una matriz de gelatina entrecruzada con glutaraldehido. Se empleó un reactor de flujo pistón, con 2 columnas empacadas, y control de pH entre ellas mediante la adición de NaOH 2N a pH 8.0, a 40°C; derivaron una ecuación por simulación por computador, para sistemas de 1, 2 y 3 etapas. En el sistema de 2 etapas se encontraron los mejores resultados al tener una relación de carga de 1:1 (g de biocatalizador en cada reactor), alcanzando una máxima conversión de 80%. Esto corresponde a 18% más de conversión respecto a una

sola columna. En el sistema de 3 columnas se obtuvo una conversión máxima de 85%, con una distribución de la enzima de 1:1:1. El aumento relativo en la conversión es de 5% comparado con el sistema de 2 etapas, y 20% respecto al de una. En conclusión, el aumento del número de columnas aumenta el % de conversión, debido a un menor descenso del pH en las columnas. Además encontraron que el pH óptimo para la estabilidad del biocatalizador (7.0) es más bajo que el óptimo para la reacción (8.0). Este es uno de los factores más importantes en el proceso y que no es tenido en cuenta en general en la literatura ni en la información comercial de los biocatalizadores, ya que la reacción al producir ácido fenil acético, disminuye el pH que debe ser mantenido por adición de álcali, pero la enzima es sensible a pH alcalino, por lo cuál una mala adición de álcali puede ocasionar la pérdida parcial o total de la actividad.

Ryu y colaboradores (17) utilizaron la penicilino amidasa de *B. megaterium* inmovilizada en bentonita para realizar reacciones de hidrólisis con penicilina G a pH 8.0 y 40°C en sistema en lote y continuo utilizando un ultrafiltro para retener la enzima. La ventaja de este microorganismo es que la enzima es extracelular por lo que la purificación es más sencilla. Se determinaron las constantes cinéticas de la enzima, encontrando que las constantes de inhibición por productos fueron significativamente mayores que el K_m y que todas las constantes fueron ligeramente mayores en la enzima inmovilizada que en la enzima libre. El modelo cinético empleado y su ecuación de velocidad se presenta en la Ecuación III.

Esta ecuación fué empleada para estudiar el comportamiento del reactor bajo diferentes condiciones de operación. Se realizaron ensayos a concentraciones entre 0.01 y 0.5 M (3.7 y 186 g/L) encontrando que en el reactor de tanque continuo agitado, a un tiempo de residencia de 5 horas, se alcanza una conversión de 95% a la concentración más baja y solo 15% a la concentración más alta. A 74 g/L (0.2M) se obtiene en ese tiempo una conversión de 35%. El modelo predice bien el comportamiento del sistema. Además, encontraron que las conversiones obtenidas con la enzima inmovilizada son mayores a las alcanzadas con la enzima libre, en todas las condiciones ensayadas, debido a que el efecto

inhibitorio de los productos es menor. A bajas concentraciones de sustrato, la concentración de productos es tan baja que no causa inhibición. También estudiaron la productividad en función del tiempo de residencia, la cual es función inversa, así como lo es del % de conversión requerido; así, para alcanzar una conversión de 95% se requiere un tiempo de 25 horas y se obtiene una productividad de 6 mmol/L.h, mientras que para obtener un 50% de conversión se requiere un tiempo de residencia de 5 horas solamente, y se obtiene una productividad de 15 mmol/L.h.

Sandoval (65) trabajó con células completas de *E. coli* y empleó el modelo de triple inhibición cuya ecuación es

$$v = \frac{k_2Et}{1 + K_m/S (1 + A/K_{\text{apa}}) + P/K_{\text{6apa}} (K_m / S + 1) + S/k_s} \quad (\text{IV})$$

Con este modelo realizó simulaciones de los sistemas de tanque continuo agitado y el de columna en flujo pistón. La simulación del primero, mostró que a una concentración de sustrato de 0.01 M, para alcanzar 95% de conversión, se requería un tiempo de residencia de 25 horas, dando una productividad de 0.379 mmol/L.h. Para 0.2 M el tiempo de residencia para alcanzar un 90% es 2411 horas, y la productividad 0.074 mmol/L.h. Al compararlo con el reactor de flujo pistón, encontraron que este último necesita menores tiempos de residencia para alcanzar la misma conversión. Respecto a los datos experimentales, encontraron que eran un poco mayor a los teóricos para diferentes concentraciones de sustrato.

A pesar de que nadie logra 100 % de conversión y en la industria más de 90% ya es un éxito, los modelos estudiados con penicilino amidasa consideran despreciable el equilibrio de la reacción. El único estudio reportado en que se tiene en cuenta este fenómeno es el realizado por Haagensen y colaboradores (56) con Novozym 217 (un biocatalizador de Penicilino V acilasa inmovilizada) quienes contemplan además el efecto del pH en la reacción. Este modelo incorpora la cinética de Michaelis Menten para una reacción reversible con inhibición no competitiva por 6-APA y competitiva por AFA⁻. Este último inhibidor introduce el efecto del pH en la

actividad.

Mediante varias simplificaciones, se encuentran los valores de las diferentes constantes y posteriormente se emplean para realizar una comparación entre los reactores por lote y con recirculación, encontrando que la reacción en lote predice mayores velocidades de reacción que el reactor con recirculación.

Como conclusión a la revisión bibliográfica en lo referente a los aspectos cinéticos, el empleo de un modelo como el de Michaelis-Menten, incluyendo las correspondientes inhibiciones, describe racionalmente el comportamiento de los biocatalizadores de penicilino amidasa, especialmente a concentraciones bajas de sustrato, aunque estas no son las condiciones empleadas a nivel industrial. Sin embargo, el uso de un modelo permite predecir el comportamiento de un determinado tipo de reactor, y determinar cuales son las condiciones óptimas para su empleo, sin necesidad de realizar una serie de experimentos que de otra forma serían indispensables.

4. PERSPECTIVAS

4.1. Ingeniería Genética.

La Ingeniería Genética ha venido a contribuir a los esfuerzos realizados para incrementar la eficiencia tanto de la producción de la penicilino amidasa, como de la utilización de la enzima en bioreactores de penicilino amidasa. La utilización de extractos celulares y enzima purificada ha sido reemplazada en gran extensión por el desarrollo de biorreactores que contienen células y enzima inmovilizada. Sin embargo, algunas estrategias ayudan a obtener cepas hiperproductoras de la enzima, y han sido desarrollados mejores procesos de fermentación para incrementar su producción.

El desarrollo de esta tecnología se ha visto impulsado a través de tres diferentes actividades biotecnológicas:

1. Desarrollo de los procesos de bioingeniería.

2. Desarrollo de cepas por genética microbiana
3. Uso de metodologías de DNA recombinante.

Las técnicas de genética microbiana han sido favorablemente utilizadas para incrementar la productividad de cepas que portan el gen de la enzima (*pac*). Cepas diferentes de *E. coli* ATCC 11105 han sido aisladas con base en una selección por hipersensibilidad a PenG, y las mejores cepas exhiben hasta 8 veces la actividad de la cepa ATCC 11105 (66). Otro desarrollo ha sido el aislamiento de mutantes de *Escherichia coli* ATCC 9637 usando técnicas de cultivo continuo en presencia de amidas como única fuente de nitrógeno. Además se ha utilizado glucosa en el medio de cultivo para generar mutantes resistentes a represión catabólica. Estas mutantes son constitutivas resistentes a represión por glucosa y producen de 8 a 20 veces más actividad penicilino amidasa que la cepa silvestre (67). Igualmente Daumy (68), usando procedimientos de selección positiva pudo aislar mutantes de *E. coli* y *P. rettigeri* con especificidad de sustrato alterada para la penicilino amidasa.

Por otra parte, las técnicas de ingeniería genética han dado la posibilidad de alterar en forma precisa algunas secuencias específicas que regulan la expresión de los genes. La estrategia más efectiva fué la clonación de los genes *pac* en plásmidos vectores multicopia para incrementar la dosis de genes de una copia por cromosoma a más de 20 (69, 70, 71, 72). Además, el conocimiento acerca de las regiones de DNA y de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de la enzima, hicieron posible reemplazar las regiones regulatorias nativas por otras más eficientes (69,70).

Aunque se han obtenido incrementos en la síntesis de precursores de penicilino acilasa, los valores absolutos en términos de actividad no han sido tan altos como los esperados, debido por lo menos a dos razones: inestabilidad de plásmidos y saturación en el mecanismo de transporte (73).

Aunque la incidencia de las técnicas de DNA recombinante en la sobreproducción de penicilino amidasa no ha sido tan grande como

se esperaba, el conocimiento que se ha acumulado acerca de la enzima y los genes que la codifican en diferentes microorganismos, ha abierto nuevas posibilidades de sobrepasar las etapas limitantes actualmente para la producción de altos niveles de penicilino amidasa.

Las perspectivas de la ingeniería genética junto con la nueva área de ingeniería de proteínas en la sobreproducción de la penicilino amidasa y en la generación de nuevas penicilino amidasas con características fisicoquímicas mejoradas es muy prometedora. Como se mencionó anteriormente, una etapa limitante en la sobreproducción de la enzima es el transporte del péptido precursor al espacio periplásmico, debido a la saturación de los canales secretores. Merino et al (74) desarrollaron una forma de corregir este problema, que consiste en el uso de cepas mutantes que no producen algunas de las proteínas periplásmicas o extramembranales; de esta forma se disminuye la competición por los sitios secretores, y la actividad de las mutantes es mayor a la de las cepas nativas. Por otra parte, el desarrollo de sistemas de expresión de plásmidos en otros organismos, como *Streptomyces* y *Aspergillus* puede ser una herramienta poderosa para eliminar los problemas de secreción.

Como se puede apreciar, el conocimiento que se ha adquirido en cuanto a la enzima es muy amplia y ello ha permitido su manipulación en forma más racional. Sin embargo, debido a la complejidad de su síntesis y especialmente su procesamiento y transporte, hasta ahora los avances no han permitido en general llegar al nivel industrial con catalizadores obtenidos con enzimas producidas por técnicas de ingeniería genética, por lo que actualmente la gran mayoría de ellos se producen con cepas silvestres, a las cuales se les han optimizado las condiciones de producción.

OBJETIVOS

El Programa Regional de Biotecnología para la América Latina y el Caribe apoya actualmente varios Proyectos que se desarrollan conjuntamente por varios países, uno de ellos es el Proyecto "Producción Industrial de Penicilino amidasa y su uso para la obtención de ácido 6-aminopenicilánico" en el cual participan laboratorios de México, Cuba y Colombia (4). En este Proyecto, la empresa GENIN S.A. de C.V. desarrolló un biocatalizador de penicilino amidasa a partir de células de *E. coli*, de las cuales se extrae, purifica e inmoviliza la enzima. A partir de 1989 se cuenta con un biocatalizador, y la tecnología para su producción ha sido comprobada hasta nivel de planta piloto, haciéndose necesario establecer las características del producto y definir con ello las condiciones más adecuadas para su uso.

Para que un biocatalizador de penicilino amidasa pueda ser empleado a nivel industrial, dado que se trata de un proceso intermitente, el número de veces que puede ser utilizado resulta ser un factor crítico en la productividad del catalizador y por ende en el costo del proceso: se requiere una alta reutilización para competir en el mercado. Si tenemos en cuenta que el valor de la materia prima es cercano al precio de venta del 6-APA, es posible calcular el número de ciclos mínimo que se debe emplear el biocatalizador (suponiendo que se utiliza una carga de 1 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador por ciclo) para que el proceso sea rentable.

Para dicho cálculo suponemos los siguiente:

Cantidad de Penicilina/Kg de 6-APA	2 Kg
Precio de Penicilina/Kg	\$US 30
Costo del biocatalizador/Kg	\$US 1400

Costos de producción/Kg de 6-APA:

Materia Prima	\$US	60
Costos del proceso	\$US	1
Costo del biocatalizador (si se emplea 50 ciclos)	\$US	28
por lote		<hr/>
Total costos de producción	\$US	89

La figura 3 muestra la relación entre el costo de producción del 6-APA y el número lotes de reutilización. En la figura 3a) se presentan los resultados entre el costo de producción del 6-APA y el número de lotes, para 2 para 2 precios del biocatalizador (\$US 1400 y 2500), es esta figura se observa que si el biocatalizador fuera utilizado 50 ciclos, el costo de 1 Kg de 6-APA sería mayor a su precio de venta, con cualquiera de los dos biocatalizadores, mientras que si se utiliza en 400 a 500 ciclos, se puede lograr un costo de producción que sea competitivo y prácticamente el empleo del catalizador por un número de ciclos mayor, no tiene un efecto significativo en la disminución del costo de producción; considerando constantes los costos de materia prima y de proceso (\$US 61), se aprecia que el límite económico en que se mueve el costo de producción del 6-APA es muy estrecho, se encuentra entre \$US 61 (otros costos) y \$US 80 (precio de venta del 6-APA); en este intervalo se observa que el mínimo número de veces que se debe emplear el biocatalizador más costoso es 150 mientras que el otro se debe emplear 100 veces para no sobrepasar el precio de venta; sin embargo, si el biocatalizador se emplea mayor número de veces su precio ya no afecta significativamente el costo de producción. La figura 3b nos indica que el costo del catalizador por lote representa entre un 5 y un 20% del costo de producción cuando se emplea entre 100 y 500 lotes. Debido a que los catalizadores no son perfectamente estables y a medida que aumenta el número de ciclos la actividad va disminuyendo, ocasionando un aumento en el tiempo del ciclo, lo que repercute en una disminución en la productividad.

El conocer las características operacionales del biocatalizador permite entonces una adecuada utilización, lo que resulta en un máximo aprovechamiento. Por otra parte, el diseño global del

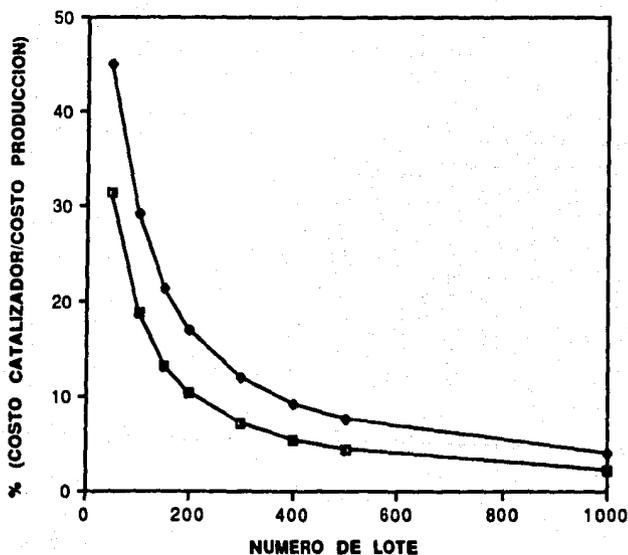
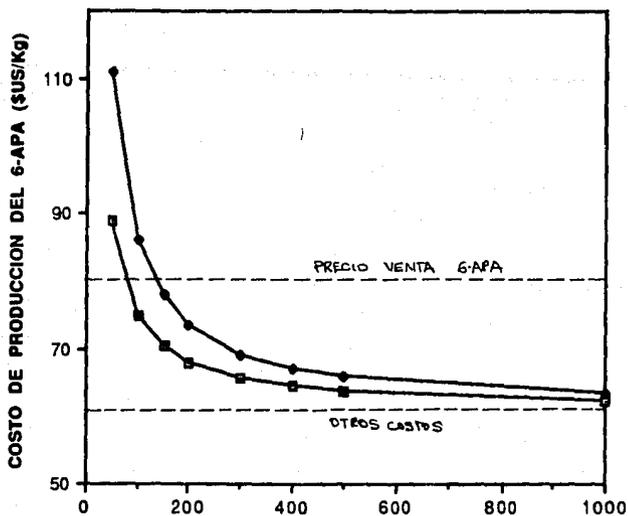


FIGURA 3. Efecto del número de lotes de reutilización del biocatalizador de penicilino amidasa en el costo de producción del 6-APA y en el porcentaje del costo del catalizador con respecto al costo de producción.

- Biocatalizador de GENIN (\$US 1400/Kg)
- Biocatalizador de SCLAVO (\$US 2500/Kg)

proceso no puede llevarse a cabo si no se cuenta con información suficientemente clara para poder tomar decisiones en función de las características o la modalidad del proceso enzimático a efectuar.

Dada la importancia de obtener información sobre el catalizador que permita tener una idea más clara de la forma de utilización del biocatalizador se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo consiste en la caracterización de un biocatalizador de penicilino amidasa inmovilizada para la obtención de ácido 6-aminopenicilánico a partir de la penicilina G. Así mismo se pretende establecer las condiciones de aplicación en reactores enzimáticos y generar modelos que describan su comportamiento.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterización fisicoquímica del biocatalizador. Para obtener una máxima utilización del biocatalizador es necesario un adecuado conocimiento acerca de las características del mismo, como son el perfil de temperatura y pH para su actividad y estabilidad, así como sus características cinéticas.

2. Caracterización cinética del biocatalizador. Establecimiento de un modelo cinético que permita predecir el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones de reacción.

3. Diseño del proceso. Determinar la mejor estrategia de operación considerando las características del biocatalizador y las alternativas definidas por los diversos tipos de bioreactor existentes.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES.

Se empleó penicilina G potásica (PGK) cruda (Hoesch), ácido fenilacético (AFA) y ácido 6-aminopenicilánico 6-APA de Sigma Chemicals Ltd. Londres. Acido fosfórico, hidróxido de potasio e hidróxido de amonio, de J.T. Baker y paradimetilaminobenzaldehído de Merck.

El biocatalizador empleado fue suministrado por Genin, a través del Proyecto de ONUDI mencionado en la introducción. Este catalizador se obtuvo a partir de una cepa de *E. coli* ATCC 9637, por fermentación en presencia de ácido fenil acético como inductor, extracción de la enzima por rompimiento de las células, purificación de la misma por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico e inmovilización por enlace covalente en una resina epoxiacrítica.

Este biocatalizador tiene una actividad de 150 a 170 Unidades/g de peso húmedo, determinada a 37°C y pH 7.5 y un tamaño de partícula de 100 a 200 micras de diámetro.

Se definen 4 parámetros para el desarrollo del trabajo:

a) Unidad: Es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de 6-APA/minuto de reacción.

b) Actividad del biocatalizador: unidades de Enzima/g de catalizador, peso húmedo. Se refiere a la resina filtrada al vacío sobre un embudo buchner, enjuagada con buffer fosfatos 0.03 M pH 7.5, hasta la formación de grumos que se desprenden fácilmente de la espátula.

c) Carga de enzima: se refiere a la relación unidades de enzima/g de penicilina, empleada en la reacción de hidrólisis.

d) Concentración de enzima: Unidades de enzima inmovilizada/ml de solución, empleada en la reacción de hidrólisis.

2. METODOS.

2.1. Actividad Enzimática.

Se determinó mediante incubación de 10 mg del biocatalizador peso húmedo en 3 ml de PGK al 2% en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.8 a 37°C durante 5 minutos y determinación de 6-APA en muestras de 0.1 ml, por el método de paradimetil aminobenzaldehído (75).

2.2. Determinación del 6-APA por el método de paradimetil amino benzaldehído.

Este método se fundamenta en la reacción entre el p-dimetilamino benzaldehído con el grupo amino presente en el 6-APA, con formación de una base de Schiff que presenta color y puede estimarse cuantitativamente a una longitud de onda de 415 mn. La reacción se presenta en la figura 4, el procedimiento en el Anexo 1.

2.3. Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador.

Se realizó la reacción para medir la actividad por el método anteriormente citado, pero colocando el biocatalizador a diferentes temperaturas, entre 25 y 60°C.

2.4. Efecto del pH en la actividad enzimática del biocatalizador.

Se realizó la determinación de actividad enzimática empleando buffer fosfatos de pHs entre 6.0 y 8.5 de concentración 0.1 M. A pH 8.0 y 8.5 se utilizó también buffer Tris 0.1M, y no se encontró diferencia en los valores obtenidos con los diferentes buffers.

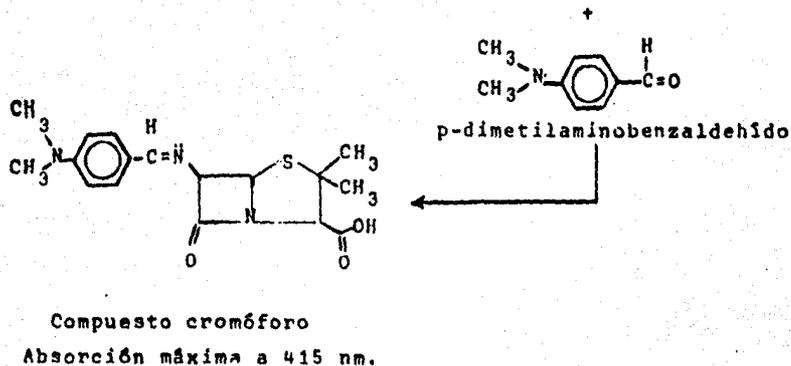
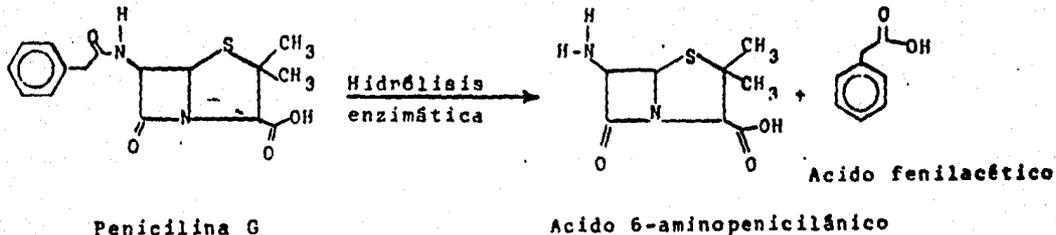


FIGURA 4. Esquema de la reacción del método de paradimetil amino benzaldehído para la determinación de 6-APA.

2.5. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador.

Se colocaron muestras de 0.5 g del biocatalizador peso húmedo en 50 mL de buffer fosfatos 0.1 M del correspondiente pH (se hicieron ensayos a pHs de 7.5 y 7.8), en un baño agitado a la temperatura correspondiente, y se tomaron muestras en intervalos de tiempo adecuados hasta 1000 horas de incubación, para determinar la actividad por el método mencionado anteriormente.

2.6. Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador.

Se realizó el mismo experimento que en el caso anterior, solo que variando el pH del buffer fosfatos empleado, ensayando pHs entre 6.0 y 8.5, hasta 400 horas de incubación.

2.7. Estabilidad operacional.

Se realizaron 150 ciclos sucesivos de hidrólisis de 2 horas cada uno, y se determinó en cada hidrólisis el consumo de hidróxido de amonio durante todo el ciclo, el % de conversión al final de cada hidrólisis y la actividad del biocatalizador cada 25 hidrólisis.

Las condiciones de las hidrólisis fueron las siguientes:

Temperatura:	37°C
pH:	7.45-7.55
Concentración de PGK:	10%
Volumen de reacción:	50 mL
Velocidad de agitación:	600 RPM
Relación Enzima/PGK:	120 Unidades/g
Concentración de NH_4OH :	2 M
Actividad del catalizador:	160-180 Unidades/g peso húmedo

La figura 5 muestra el reactor de tanque agitado empleado en la reacción.

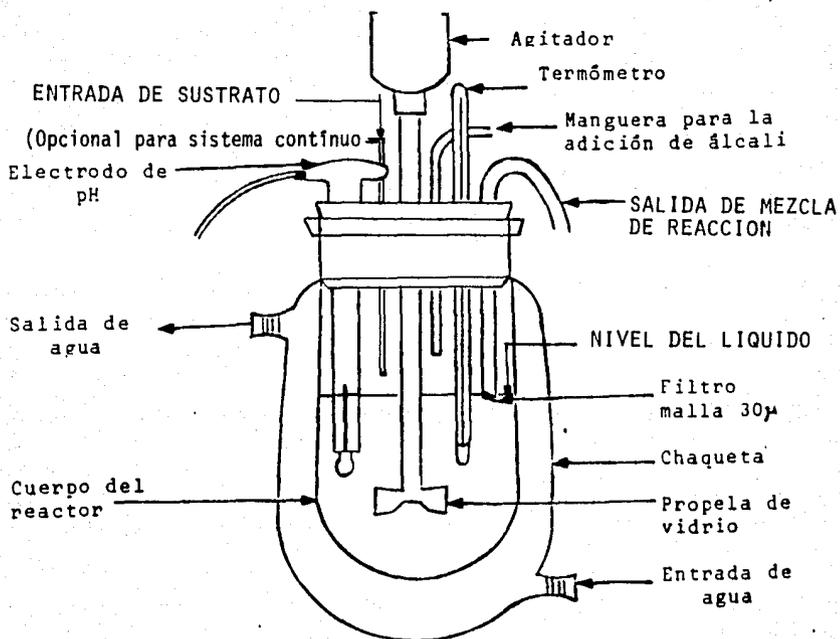


FIGURA 5. Diagrama del reactor enzimático.

2.8. Características cinéticas del biocatalizador.

Para determinar los parámetros cinéticos se realizaron ensayos de velocidad inicial, mediante la utilización de un reactor en columna, que contenía 100 mg de biocatalizador (peso húmedo) al cuál se le recirculó un volumen de 30 ml de solución de penicilina G potásica (PGK) a un flujo de 70 ml/min, el cuál permitía eliminar problemas de difusión externa. Previo a la reacción se calentaron tanto el sustrato como la enzima por 5 minutos a una temperatura de 37°C, posteriormente se recirculó el sustrato y se tomaron muestras cada minuto durante 5 minutos para determinar la velocidad inicial. Estas determinaciones se llevaron a cabo en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.8 sin control de pH.

Utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk se calcularon las constantes K_m , V_{max} , K_s (inhibición por exceso de sustrato) y K_{ia} (constante de inhibición por ácido fenil acético). La constante de inhibición de 6-APA K_{6apa} no se pudo determinar por este método, debido a la dificultad de medir la formación de 6-APA en presencia de altas concentraciones de este componente. Por esta razón se empleó un método alternativo, que se explica en el capítulo de resultados, en el cuál se mide el consumo de hidróxido de amonio durante los primeros minutos de la hidrólisis y se calcula la constante por medio de una ecuación que relaciona el tiempo con la conversión.

2.9. Determinación de la constante de equilibrio de la hidrólisis.

Debido a que al realizar las hidrólisis con penicilina al 10% no se lograba llegar al 100% de conversión, se planteó la hipótesis de la influencia del estado de equilibrio. Por esta razón, se trató de determinar la constante de equilibrio midiendo la concentración tanto de sustratos como de productos, después de un tiempo prolongado de reacción. Sin embargo, la variabilidad del método no permitía observar cambios pequeños en la concentración de los productos, en presencia de altas concentraciones de los mismos, empleando HPLC para su determinación. Por esto se decidió

tratar de calcular esta constante realizando la reacción reversa, es decir, colocando la enzima en presencia de los productos a la concentración final de la reacción de hidrólisis (0.268 M, y 120 U de biocatalizador/g de PGK), y midiendo la concentración de los mismos en el equilibrio, aprovechando que el método de HPLC permitía separar y cuantificar 6-APA, AFA y PGK en mezcla.

Se colocaron los productos de la reacción (6-APA y AFA) a las concentraciones finales, correspondientes al 100% de la conversión, en buffer fosfatos 0.03 M y se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de amonio. Se adicionó la cantidad de enzima correspondiente a una carga de 120 Unidades/g de penicilina, se incubó a 37°C tomando muestras a los 15 30 120, 240 y 480 minutos y se determinó la cantidad de penicilina producida, por HPLC en un cromatógrafo Spectra Physics Modular 8700 B, con una columna μ -bondapack C₁₈, utilizando un gradiente fosfatos-metanol y un detector Ultravioleta a 220 nm.

Se calculó la constante de equilibrio según la ecuación:

$$K_{eq} = \frac{[6-APA] [AFA]}{[PGK]}$$

RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DEL BIOCATALIZADOR.

En la primera parte del trabajo se realizó la caracterización del biocatalizador dado que el proceso de inmovilización de la enzima conlleva cambios en varias características de la misma, que deben ser conocidos con el objeto de poder definir las mejores condiciones para su uso y predecir el comportamiento del mismo bajo diferentes sistemas de reacción.

1.1. Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador.

En la figura 6 se observa el perfil de actividad del biocatalizador en función de la temperatura, siendo claro que la máxima velocidad de reacción se presenta a temperatura de 49°C, que se encuentra dentro del intervalo de los valores reportados en la literatura para la enzima libre (Tabla 6) y para diferentes biocatalizadores con enzima inmovilizada según se puede constatar en la Tabla 10. Temperaturas superiores producen la desnaturalización de la enzima, por lo que la actividad disminuye rápidamente.

Se calculó la energía de activación, de acuerdo con el modelo de Arrhenius, que relaciona la actividad con la temperatura. En la figura 7 se reporta el inverso de la temperatura ($^{\circ}\text{K}$) contra el logaritmo natural de la actividad, lo que de acuerdo con el modelo resulta en una recta cuya pendiente es igual a E_a/R , donde E_a es la energía de activación y R es la constante de los gases. Se obtuvo un valor de 10963 calorías/mol, que coincide con los valores reportados en la literatura para la enzima libre e inmovilizada.

1.2. Efecto del pH en la actividad del biocatalizador.

La figura 8 representa el perfil de actividad del biocatalizador con el pH, determinado a 2 temperaturas, 37°C, por ser la más

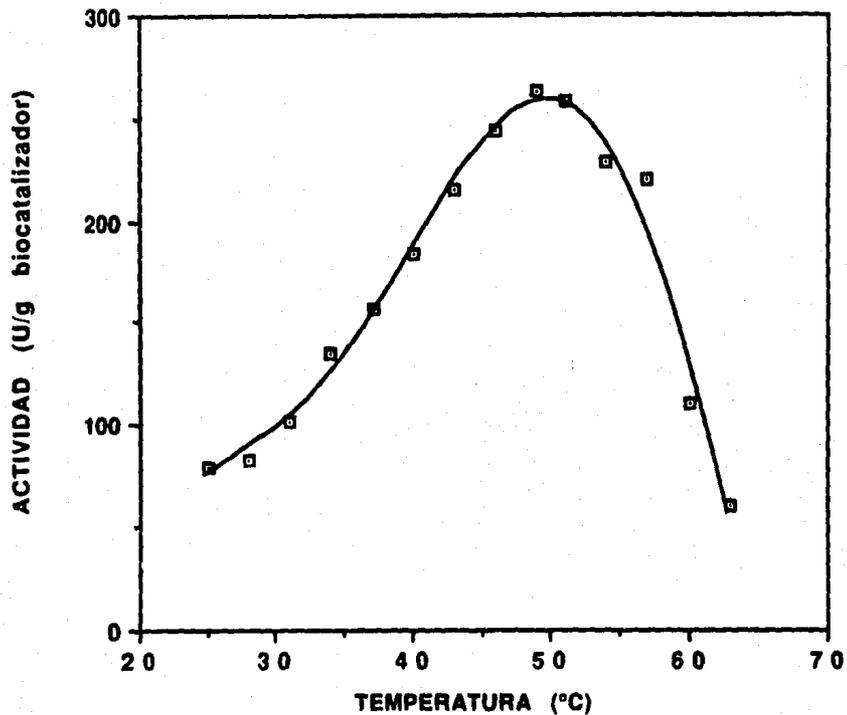


FIGURA 6. Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador de penicilino amidasa, utilizando como sustrato bencil penicilina. pH 7.8, amortiguador de fosfatos 0.1 M. Promedio de 3 determinaciones.

Determinación de la energía de activación

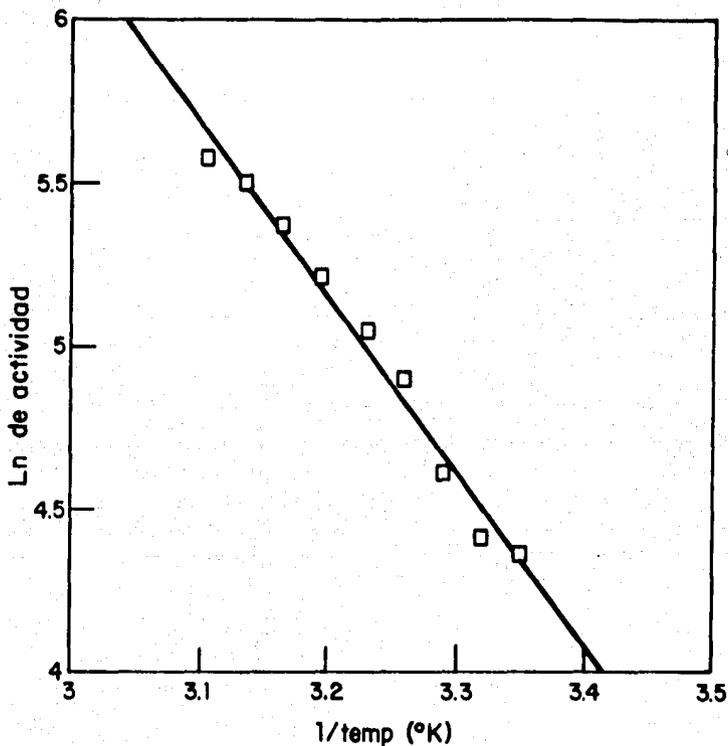


FIGURA 7. Representación gráfica del modelo de Arrhenius para la determinación de la energía de activación del biocatalizador en la reacción de hidrólisis de benzilpenicilina. pH 7.6, amortiguador de fosfatos 0.1 M. Promedio de 3 determinaciones.

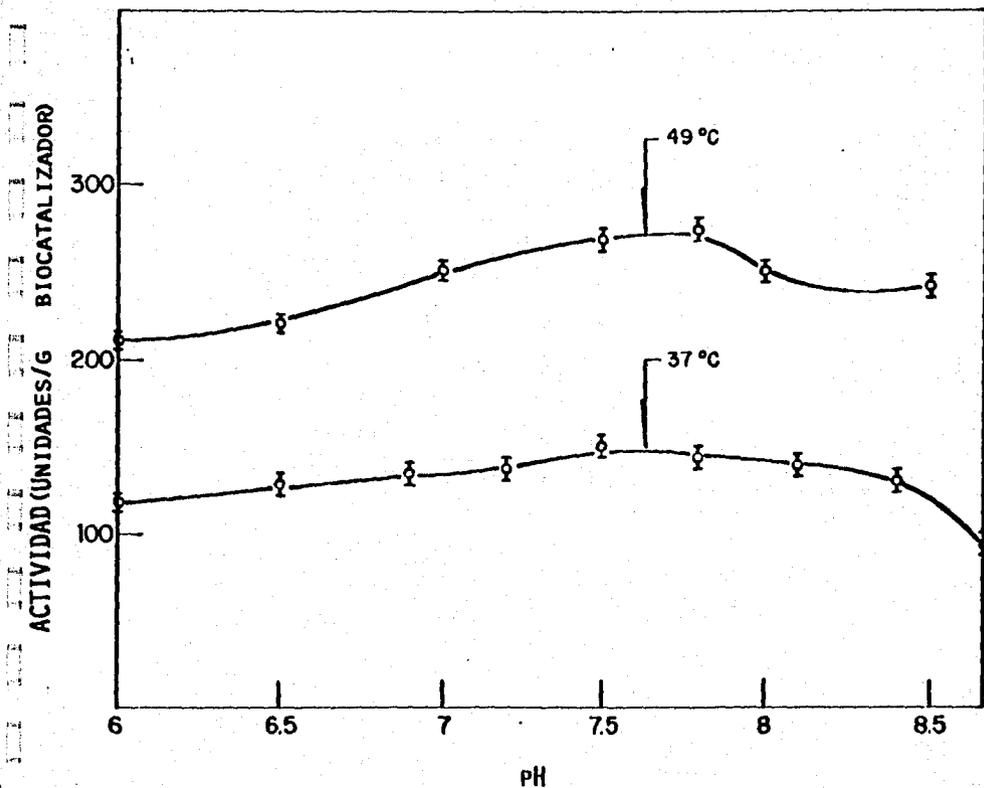


FIGURA 8. Efecto del pH en la actividad del biocatalizador a 37°C (temperatura de uso industrial) y a 49°C (temperatura de máxima actividad). Amortiguador de fosfatos 0.1M. Promedio de 3 determinaciones.

frecuentemente usada en procesos de hidrólisis con penicilino amidasa, y 49°C, por ser la óptima para la actividad. Se observa un máximo de actividad entre pH 7 y 8 a 37°C, y entre 7.5 y 8 a 49°C, y un aumento de más de 60% en la actividad a 49°C; en la literatura se reporta un óptimo de 7.8 a 8.5 tanto para la enzima libre como inmovilizada, o sea que el biocatalizador se encuentra en el rango estipulado. Los resultados obtenidos para estas dos variables indican que las condiciones óptimas para la actividad del biocatalizador son 49°C y pH 7.5 a 8.0. A pesar de que el valor de la temperatura para una máxima actividad se sitúa cerca de 50°C, en general los biocatalizadores de penicilino amidasa se emplean a temperaturas menores a 40°C, como se observa en las Tablas 10 y 12. Esto es debido por una parte, a la baja estabilidad de la penicilina (76) y el 6-APA (77) y por otra parte, a que la estabilidad de la enzima a altas temperaturas es menor. Por esta razón, se realizaron experimentos tanto para observar los perfiles de pH a diferentes temperaturas así como para determinar el efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad del biocatalizador.

1.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador.

Con el fin de estudiar la estabilidad del catalizador se realizaron ensayos a 3 temperaturas: 37, 45 y 49°C; los resultados se observan en la figura 9. Este ensayo se realizó a 2 pH diferentes, 7.5 y 7.8. Como se aprecia, a 37°C se tiene una estabilidad máxima, lo que explica la selección de esta temperatura en procesos industriales, mientras que a 49°C el biocatalizador se inactiva rápidamente. Además se observa que la estabilidad a 7.8 es mucho menor que a 7.5, o sea que una variación en 0.3 unidades de pH produce un descenso marcado en la estabilidad. Esta dependencia de la estabilidad con el pH es de fundamental importancia por la forma en que se desarrolla la reacción, por lo que será objeto de un estudio particular. Para calcular la constante de desactivación a cada una de las temperaturas, se presenta en la figura 10 el ln de Actividad en

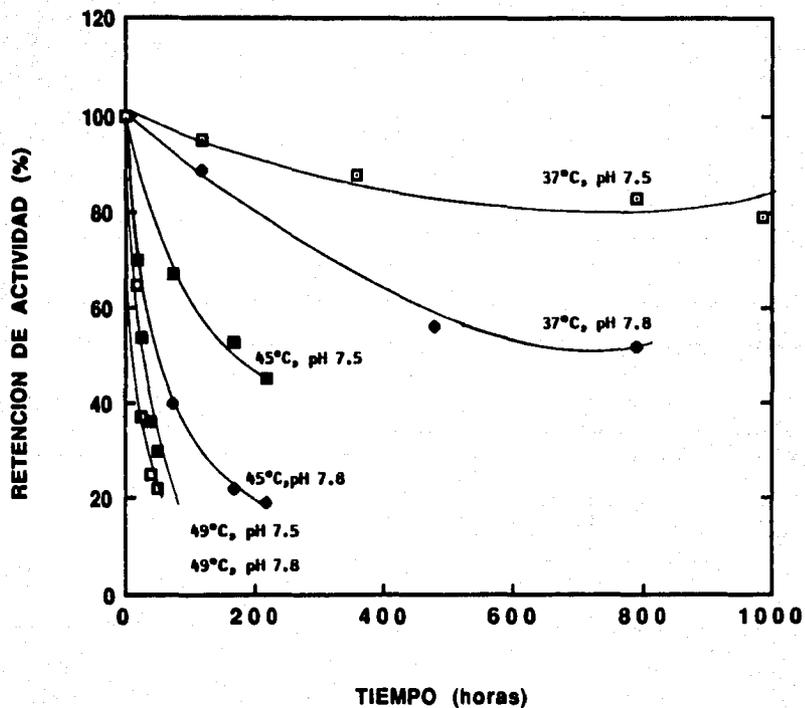


FIGURA 9. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador. El biocatalizador se incubó en amortiguador de fosfatos 0.1 M, en baño agitado y se determinó la actividad por triplicado a pH 7.8, 37°C.

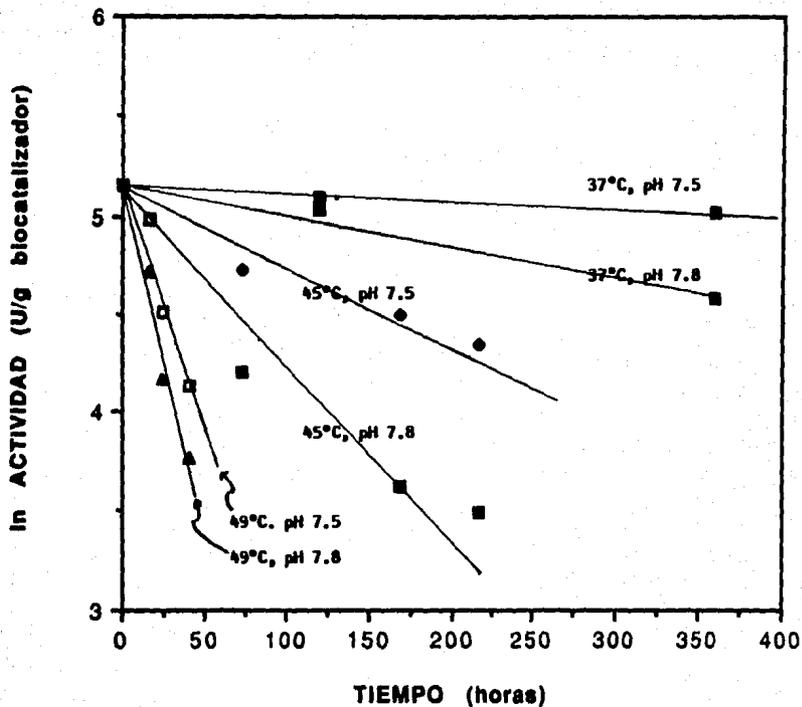


FIGURA 10. Método gráfico para la determinación de la constante de desactivación de primer orden del biocatalizador a diferentes temperaturas. El biocatalizador se incubó en amortiguador de fosfatos 0.1 M, en baño agitado y se determinó la actividad por triplicado a pH 7.8, 37°C.

función del tiempo, de donde se desprende que la inactivación sigue una cinética de primer orden. La pendiente de esta recta corresponde a la constante de inactivación, que a su vez puede relacionarse con el tiempo de vida media del catalizador a cada una de las condiciones:

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (V)$$

En la Tabla 13, se presenta el resumen de estos resultados de donde se observa que el tiempo de vida media a pH 7.5 y 37°C es 100 veces mayor que el correspondiente a una temperatura de 49°C. Esto indica que a 37°C, aunque se está trabajando al 60% de la máxima actividad que se puede obtener con la enzima, su estabilidad es 100 veces mayor que la que tendría a la temperatura de máxima actividad y se logra una productividad mayor.

1.4. Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador.

En la literatura referente a catalizadores de penicilino amidasa, practicamente no existen análisis sobre la estabilidad al pH. Si consideramos por un lado el efecto del pH en la estabilidad observado en la figura 10 y por el otro, que el pH debe ser regulado durante el proceso dada la generación de AFA, es evidente que el estudio del efecto del pH requiere de un análisis cuidadoso.

A 37°C, temperatura que por lo antes expuesto resulta recomendable para el proceso, se realizó un estudio de estabilidad similar al ensayo anterior, en un rango de pHs de 6 a 8.5. Al graficar el ln Actividad vs tiempo (figura 11), se obtiene la constante de desactivación a cada pH. Como se observa, la máxima estabilidad se logra a pH 7.5 y el efecto de desactivación a pH alcalino es mucho más fuerte. En la Tabla 14 se resumen los tiempos de vida media a los diferentes pHs, observándose que una disminución del pH de 7.5 a 7.0 disminuye el tiempo de vida media de 2880 a 2300 horas, mientras que el aumento a solamente 7.8, lo disminuye a

TABLA 13

EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR:
Determinación de la constante de desactivación de primer orden y del
tiempo de vida media del biocatalizador almacenado

T°C	pH	k (H ⁻¹)	$t_{1/2}$ (H)
37	7.5	2.39×10^{-4}	2880
	7.8	8.00×10^{-4}	866
45	7.5	3.52×10^{-3}	197
	7.8	7.6×10^{-3}	91
49	7.5	2.6×10^{-2}	27
	7.8	3.3×10^{-2}	21

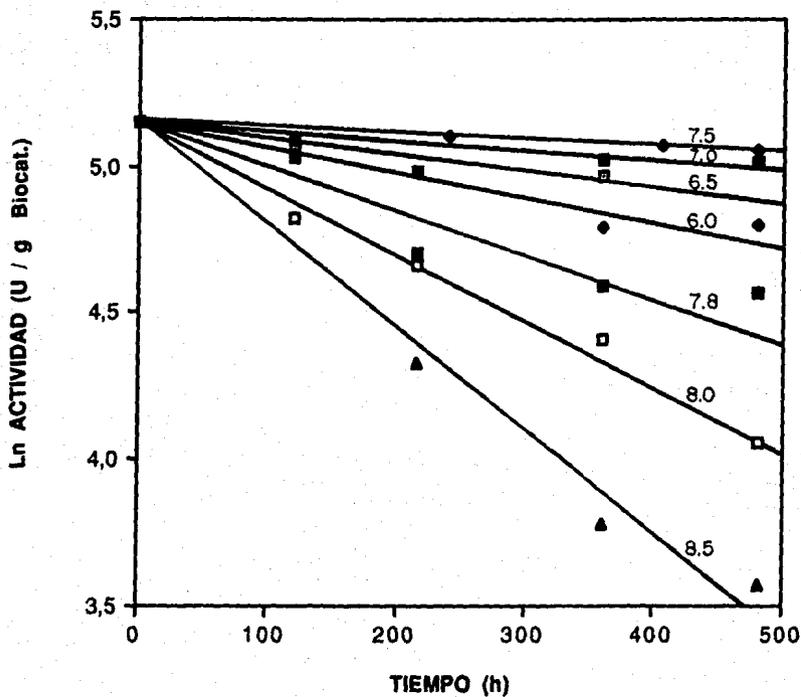


FIGURA 11. Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador. El biocatalizador se incubó a 37°C en baño agitado, en amortiguador de fosfatos 0.1 M y se determinó la actividad por triplicado a pH 7.6 y 37°C.

TABLA 14

EFFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR: Determinacion de la constante de desactivacion de primer orden y del tiempo de vida media del biocatalizador almacenado.

pH	k (H^{-1})	$t_{1/2}$ (H)
6.0	7.98×10^{-4}	869
6.5	5.22×10^{-4}	1328
7.0	2.92×10^{-4}	2376
7.5	2.39×10^{-4}	2880
8.0	2.15×10^{-3}	866
8.5	3.39×10^{-3}	321

860 horas. Este efecto se observa más claramente en la figura 12, donde se reporta la relación del pH con el tiempo de vida media, y se constata que la pendiente del lado descendente es bastante elevada, lo cual corresponde a un efecto muy marcado del pH del lado alcalino.

De acuerdo con estos resultados, las condiciones óptimas para la utilización del biocatalizador son: temperatura de 37°C y pH de 7.5, con la recomendación de un estricto control del pH en la reacción. En estas condiciones se obtiene un tiempo de vida de 2880 horas, que es un valor razonable comparado con los reportados para catalizadores industriales, como se aprecia en la Tabla 12. También explican estos resultados el porqué del diseño especial de los reactores de tanque agitado usado para el proceso en particular en lo que a la adición de álcali para la regulación del pH.

Con base en estos resultados se propone un modelo de desactivación por el pH, del mismo tipo que el modelo descrito por la ecuación de Arrhenius, pero teniendo como variable dependiente el pH en lugar de la temperatura, según la ecuación

$$k = A e^{B/pH} \quad (VI)$$

$$\ln k = \ln A + B/pH \quad (VII)$$

Para pH menor de 7.5 tenemos:

$$k = 1.64 \times 10^{-6} e^{37.1/pH} \quad (VIII)$$

Para pH mayor de 7.5 :

$$k = 3.26 \times 10^6 e^{-173.98/pH} \quad (IX)$$

Ambas ecuaciones se grafican en la figura 13, junto con los puntos experimentales. Es importante recalcar que no se han realizado

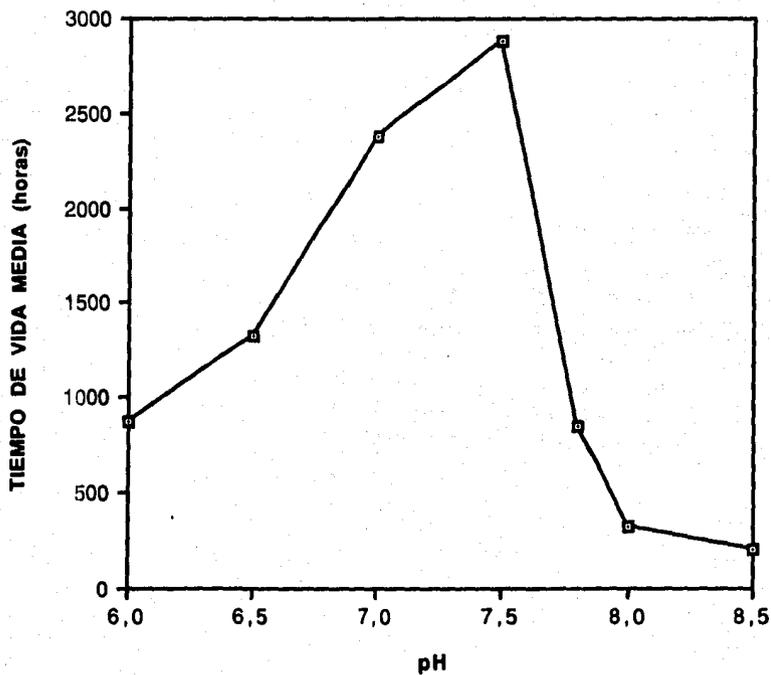


FIGURA 12. Efecto del pH en el tiempo de vida media del biocatalizador. El biocatalizador se incubó a 37°C en baño agitado, en amortiguador de fosfatos 0.1 M y se determinó la actividad por triplicado a pH 7.6 y 37°C.

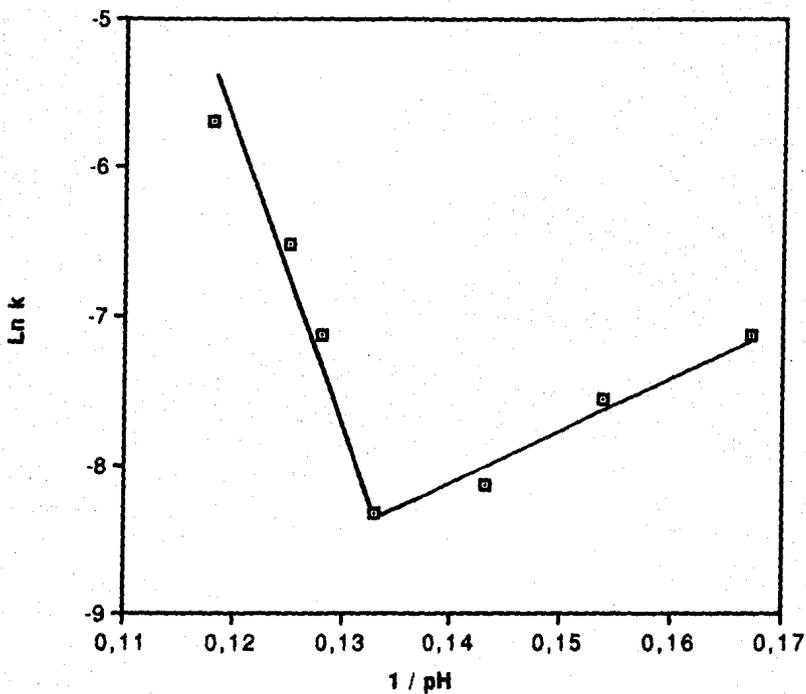


FIGURA 13. Representación gráfica del modelo de desactivación del biocatalizador con el pH. El biocatalizador se incubó a 37°C en baño agitado y se determinó la actividad por triplicado a pH 7.8 y 37°C.

estudios de estabilidad al pH para biocatalizadores de penicilino amidasa inmovilizada, y hasta ahora no se conoce un reporte en que se proponga un modelo de inactivación de la enzima con el pH. El modelo empírico propuesto puede ser usado para estudios de simulación sobre la estabilidad del catalizador.

1.5. Estabilidad operacional del biocatalizador.

Al poner de manifiesto que el factor crítico en la estabilidad del biocatalizador es el pH y que en la reacción esta condición no permanece constante, sino que varía dentro de un determinado rango a su vez función de la ingeniería y control del proceso, se decidió que era fundamental determinar la estabilidad del biocatalizador en la reacción de hidrólisis.

Para este efecto se llevaron a cabo 150 ciclos sucesivos de hidrólisis de 2 horas cada una, en las condiciones determinadas anteriormente como óptimas, o sea 37°C y pH 7.5. En cada ciclo se midió el % de conversión de penicilina y el consumo de hidróxido de amonio, y cada 25 ciclos se determinó la actividad del biocatalizador. Con estos datos se realizó la figura 14, donde se grafica el % de retención de cada una de estas tres variables, respecto al valor inicial (consumo de base, % de conversión y actividad del biocatalizador). En ella podemos observar que todas las líneas tienen pendientes similares, excepto la última parte de la correspondiente a la actividad. En la hidrólisis 76 se presentó un descenso súbito de la conversión y de la actividad del biocatalizador, que pudo ser ocasionada por un contaminante no determinado del agua empleada para la hidrólisis. En la tabla 15a se observa el tiempo de vida media del biocatalizador calculado con los datos de actividad antes y después de dicho accidente, así como el valor obtenido mediante la pendiente del consumo de hidróxido de amonio y del % de conversión. Con el dato de actividad en los primeros 75 ciclos de hidrólisis se obtuvo un valor de 1155 horas, o sea menos de la mitad del tiempo esperado según los resultados de estabilidad en ausencia de sustrato; lo mismo ocurre con el valor obtenido a partir del % de

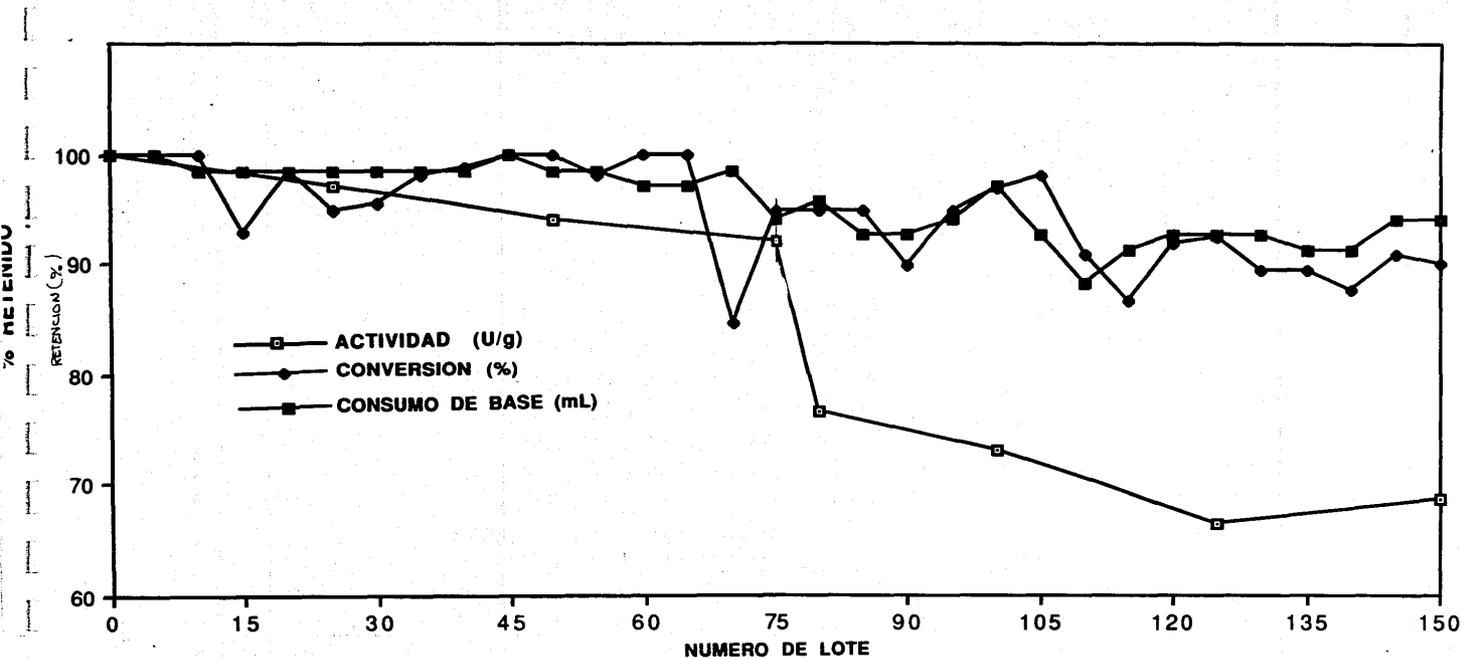


FIGURA 14. Estudio de estabilidad operacional del biocatalizador (Lote 1). Resultados correspondientes a 150 reacciones intermitentes de 2 h, realizadas a 10% PGK, 37°C y pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 3.4 g de biocatalizador con 170 U/g, ajuste de pH con NH₄OH 2 M.

TABLA 16

TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL BIOCATALIZADOR DETERMINADO EN CONDICIONES DE OPERACION

15a) Lote 1

Determinación realizada	Tiempo de vida media (h)
Actividad (de lote 0 a 75)	1155
Actividad (de lote 75 a 150)	950
% de Conversión (de lote 0 a 150)	1500
Consumo de base (de lote 0 a 150)	2000

15b) Lote 5

Deteminación realizada	Tiempo de vida media (h)
Actividad (de lote 0 a 75)	1550
Actividad (de lote 75 a 150)	590
% de conversión (de lote 0 a 150)	2100
Consumo de basa (de lote 0 a 150)	2750

conversión y en el caso del consumo de hidróxido de amonio, aunque mayor que los anteriores no alcanza a ser tan alto como el esperado. Posteriormente se realizó un segundo ensayo de 150 ciclos sucesivos, en el cuál se presentó un aumento súbito del pH ocasionado por una falla en el control de pH. Esto produjo un decremento en la actividad del biocatalizador, pero se mantuvo la conversión de 95% hasta el final de los 150 ciclos. Los resultados de este experimento, obtenidos de igual forma que en el caso anterior, se aprecian en la figura 15. De igual forma se calculó el tiempo de vida media, encontrando valores más altos que en el experimento anterior, como se observa en la tabla 15b. La variación tan alta entre los diferentes valores obtenidos, puede ser debida a que el valor del tiempo de vida media es muy alto respecto al tiempo de los ensayos; sin embargo, para efectos de los cálculos posteriores, se tomó el valor del primer ensayo, calculado a partir de la actividad de las primeras 75 hidrólisis, que es un valor intermedio entre todos los calculados y es razonable comparado con los biocatalizadores industriales.

En general se debería esperar que la estabilidad de la enzima aumente en presencia del sustrato; sin embargo, se debe tener en cuenta que en el ensayo de estabilidad en ausencia de penicilina, se mantiene el pH en 7.5, por la presencia de un buffer, mientras que en la prueba de estabilidad operacional, el pH debe ser mantenido en 7.5 por adición de álcali. En el caso particular del sistema de regulación empleado, el pH fluctúa entre 7.4 y 7.6, y como se observa en la figura 12, esta variación produce un efecto marcado en la desactivación del biocatalizador. Además, el álcali llega directamente a la solución, por lo cuál una porción del biocatalizador entra en contacto con un pH mucho más alto, por tiempos muy cortos, hasta que la agitación permite la homogenización del pH. Por lo tanto, se reitera que es necesario un estricto control en el pH, con especial cuidado en los pH alcalinos, que se alcanzan fácilmente por un mal diseño en los sistemas de adición de alcali o bien por fallas en los sistemas de mezclado o agitación.

ESTABILIDAD OPERACIONAL DEL BIOCATALIZADOR (Lote 5)

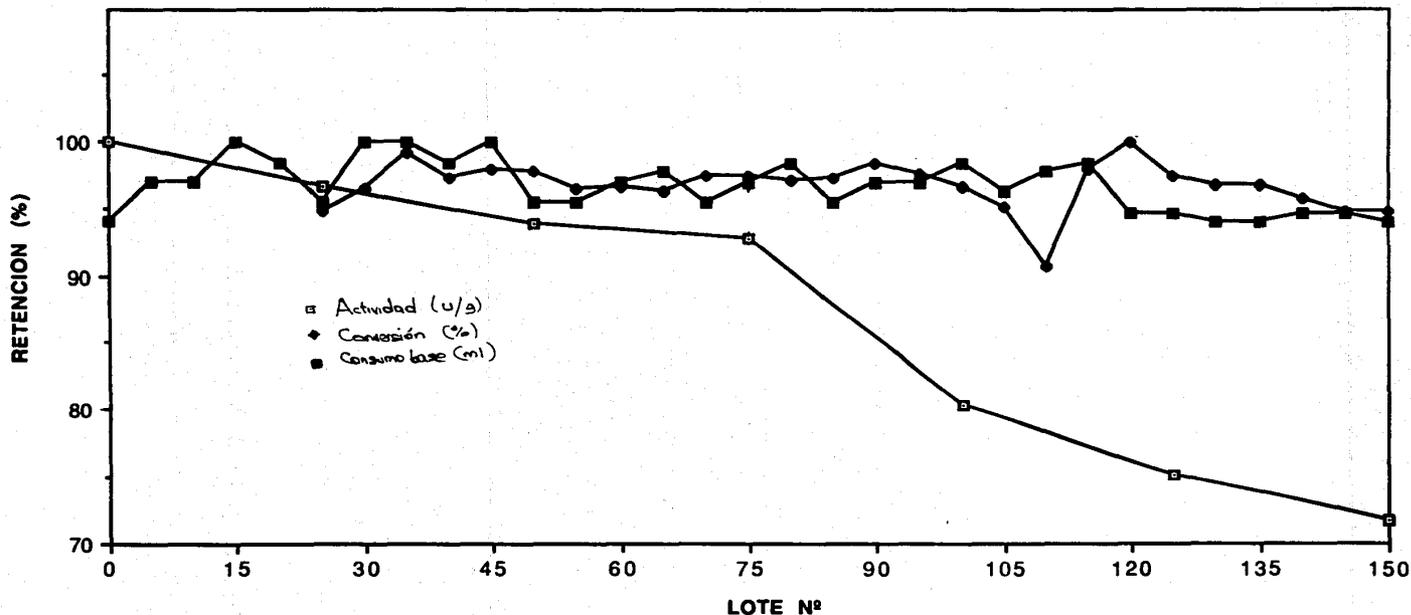


FIGURA 15. Estudio de estabilidad operacional del biocatalizador (Lote 5). Resultados correspondientes a 150 reacciones intermitentes de 2 horas, realizadas a 10% de PGK, 37°C y pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 3.4 g de biocatalizador, ajuste de pH con NH₄OH 2 M.

A pesar de tener estos inconvenientes, el tiempo de vida media del biocatalizador a una temperatura de 37°C permite competir con los biocatalizadores empleados industrialmente, que presentan tiempos de vida media de 1000 a 4000 horas, como se aprecia en la Tabla 12.

1.6. Constantes cinéticas del biocatalizador.

Una vez definidas las condiciones de actividad (temperatura y pH) del catalizador y su estabilidad, se procedió a la búsqueda de un modelo cinético para la predicción del comportamiento de la reacción. Este modelo resulta de fundamental importancia si se pretende realizar un diseño racional del proceso de reacción.

La Tabla 7 muestra las constantes cinéticas de la penicilino amidasa de *E. coli*, enzima que es inhibida tanto por los productos de la reacción, competitivamente por AFA y no competitivamente por 6-APA, como por exceso de sustrato (Penicilina G). Por esta razón se procedió a determinar estas tres constantes.

Para determinar el K_m y V_{max} del biocatalizador, se midió la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato. Los valores obtenidos se observan en la figura 16 de acuerdo con la gráfica directa y en la figura 17 en la gráfica de dobles recíprocos, mediante la cuál se determinaron K_m y V_{max} , por el intercepto y la pendiente de la parte recta de la línea a concentraciones bajas de sustrato, obteniéndose un valor de 4.17 mM y 0.568 U/mL (170 U/g), respectivamente.

En ambas figuras se constata una clara inhibición en presencia de altas concentraciones de penicilina. Para calcular la constante de inhibición por exceso de sustrato, se utilizó la ecuación de Michaelis Menten, que incluye este efecto inhibitorio.

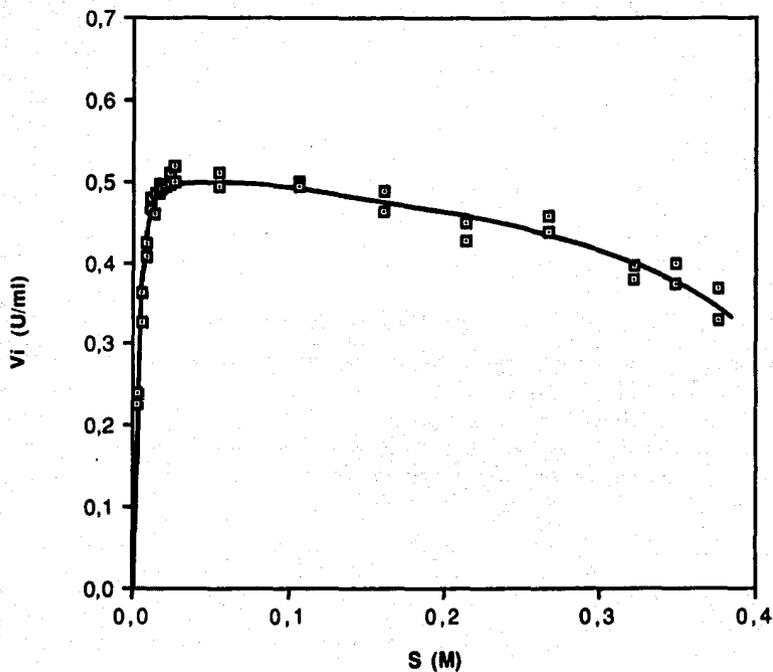


FIGURA 16. Efecto de la concentración de penicilina en la velocidad inicial de la penicilina amidasa: Representación clásica de la cinética de Michaelis Menten. 37°C, pH 7.8, amortiguador de fosfatos 0.1 M, volumen de reacción 30 ml, 0.1 g de biocatalizador con 170 U/g.

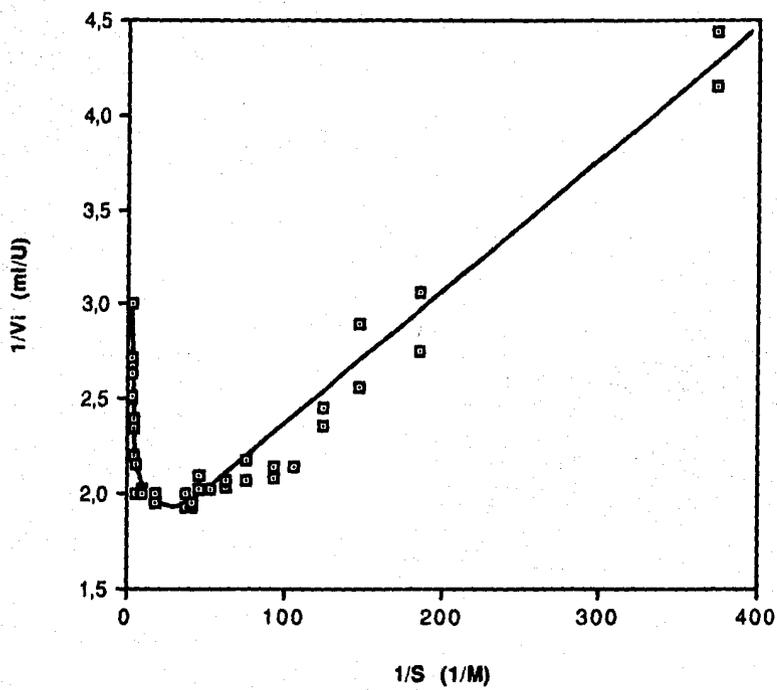


FIGURA 17. Representación de Lineweaver-Burk de la cinética de Michaelis-Menten para el biocatalizador de penicilino amidasa. 37°C, pH 7.8, buffer fosfatos 0.1 M, volumen de reacción 30 ml, 0.1 g de biocatalizador con 170 U/g.

$$V_i = \frac{V_{\max} S}{K_m + S + S^2/K_s} \quad (X)$$

Si calculamos los inversos:

$$1/V_i = 1/V_{\max} + K_m/V_{\max} \cdot 1/S + (1/V_{\max} K_s) S \quad (XI)$$

Para altas concentraciones de sustrato, en zona de inhibición el inverso de S es pequeño y el segundo término tiende a cero, por lo cual la ecuación (XI) se transforma en (XII):

$$1/V_i = 1/V_{\max} + (1/V_{\max} K_s) S \quad (XII)$$

De esta forma, al graficar $1/V_i$ vs S, en la zona de altos valores de S, se obtiene una línea recta de cuya pendiente se puede calcular el valor de K_s . Esta gráfica se presenta en la figura 18, siendo el valor encontrado para la constante de inhibición por exceso de sustrato 413 mM, valor más alto que el reportado para la enzima libre y algunas enzimas inmovilizadas como se aprecia en las Tablas 7 y 11, lo que indica un efecto menor de la penicilina.

La constante de inhibición por AFA se determinó midiendo la velocidad inicial en presencia de 2 concentraciones de inhibidor (0.75 y 1.5%). Posteriormente mediante la gráfica de dobles recíprocos en presencia de un inhibidor no competitivo, como se observa en la figura 19, se calculó la constante de inhibición de este compuesto, obteniendo un valor de 68.6 mM.

$$1/V_i = 1/V_{\max} + K_m/V_{\max} (1 + A/K_{afa}) \cdot 1/S \quad (XIII)$$

Para determinar la constante de inhibición por 6-APA, se tuvieron algunos inconvenientes, debido a la dificultad de medir el incremento en la concentración de 6-APA en presencia de altas concentraciones del mismo componente. Se trató de medir por el

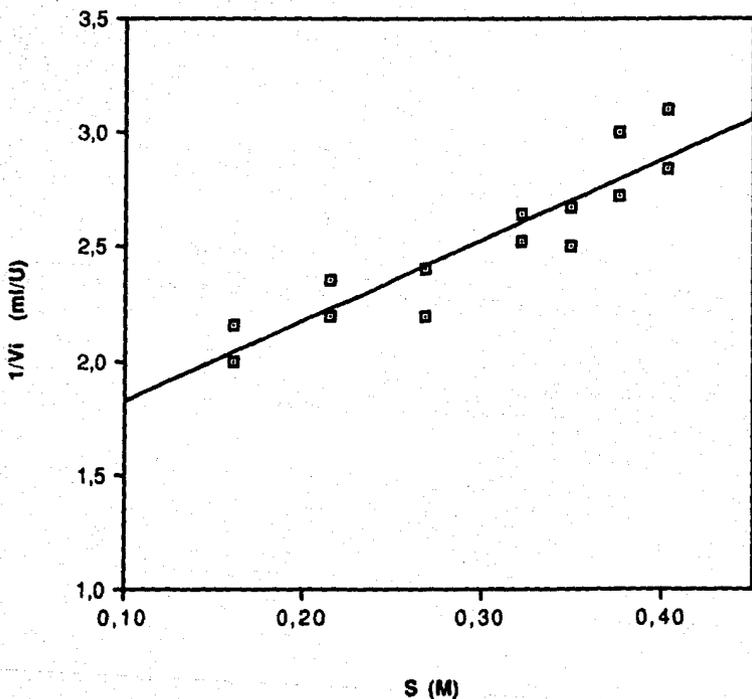


FIGURA 18. Método gráfico para la determinación de la constante de inhibición por exceso de sustrato del biocatalizador de penicilino amidasa. 37°C, pH 7.8, amortiguador de fosfatos 0.1 M, volumen de reacción 30 ml, 0.1 g de biocatalizador con 170 U/g.

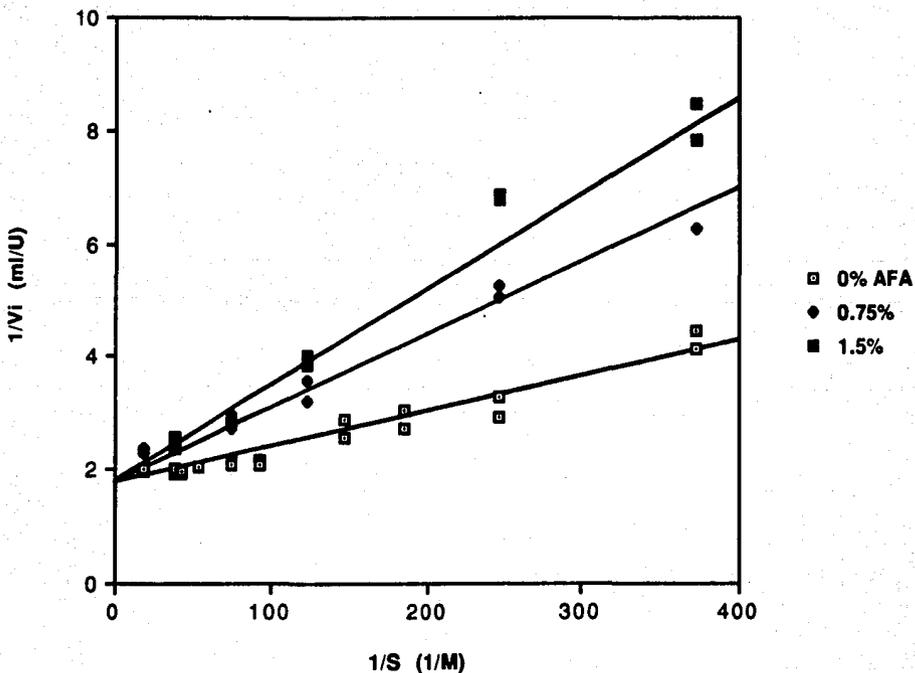


FIGURA 19. Método gráfico para la determinación de la constante de inhibición por AFA, basado en la cinética de Michaelis-Menten. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.1 M, volumen de reacción 30 ml, 0.1 g de biocatalizador con 170 U/g.

método de p-dimetil aminobenzaldehido, así como por un método de cromatografía de gases. Además se intentó realizar las determinaciones por el método reportado por Balasingham (14) y Sandoval (65) a concentraciones de 6-APA muy bajas (menores a 2 mM) pero no se detectaba efecto inhibitorio.

Considerando el modelo matemático que corresponde a las 3 inhibiciones antes mencionadas y los valores experimentales obtenidos, se estimó la constante de inhibición K_{6apa} que era del orden de 50 mM. Para constantes de esta magnitud a concentraciones de 6-APA como se habían venido ensayando (del orden de 2 mM) la inhibición es muy pequeña, lo que explica las dificultades antes mencionadas. El método de Balasingham (14) fué aplicado cuando K_{6apa} era del orden de 1-5 mM.

Considerando estas dificultades, se desarrolló la siguiente alternativa:

Para los primeros minutos de la reacción de hidrólisis en presencia de un inhibidor no competitivo es:

$$V_i = - \frac{dS}{dt} = \frac{V_{max} S}{(K_m + S) (1 + P/K_{6apa})} \quad (XIV)$$

La ecuación (XIV) integrada se transforma en la ecuación (XV):

$$S_0(1 + P/k_{6apa}) X - K_m (1 + P/K_{6apa}) \ln (1 - X) = V_{max} t \quad (XV)$$

$$\text{donde} \quad X = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (XVI)$$

Si la concentración de sustrato es suficientemente alta, la reacción es de orden cero, por lo cuál la ecuación queda reducida a la expresión:

$$S_0 X (1 + P/K_{6apa}) = V_{max} t \quad (XVII)$$

o bien:

$$X = V_{max} t / S_0 (1 + P/K_{6apa}) \quad (XVIII)$$

con lo cuál al graficar X (% de conversión) contra el tiempo, a

diferentes concentraciones de inhibidor (P), se puede calcular la constante de inhibición mediante la pendiente de cada una de las rectas, a condición de que la concentración de sustrato sea suficientemente alta para garantizar orden cero durante el experimento y suficientemente baja para evitar la inhibición por exceso de sustrato. Igualmente, las condiciones de este ensayo se seleccionaron para permitir que la medición de volumen de hidróxido de amonio fuera suficiente para dar una lectura representativa, y se pudiera observar la velocidad inicial en el tiempo. Las condiciones del experimento fueron:

Temperatura: 37°C pH : 7.5 Concentración de sustrato: 10% Concentración de enzima: 6 Unidades/ml Relación enzima/penicilina: 60 U/g Base neutralizante: hidróxido de amonio 2M Concentración de 6-APA: 0 a 3.6 %
--

Se midió el consumo de hidróxido de amonio cada 2.5 minutos y se calculó la conversión por medio de la fórmula:

$$\% \text{ Conversión} = \frac{\text{Vol. NH}_4\text{OH} \times N \times \text{PM 6-APA}}{\text{mg 6-APA totales}} \times 100$$

Vol. NH₄OH = mL de NH₄OH consumidos

N NH₄OH = Normalidad del NH₄OH.

PM 6-APA = Peso molecular del 6-APA = 216.28 g/mol

mg 6-APA totales = 2900 mg.

En la figura 20 se presentan los resultados experimentales para 5 concentraciones de 6-APA, de donde se encontró un valor de K_{6apa} de 100 mM, que es 2 órdenes de magnitud mayor que el de la enzima libre. Observando la ecuación empleada para calcular esta constante, se puede apreciar que un valor menor indica un efecto de inhibición más alto, o sea que el efecto inhibitorio del 6-APA es mayor para la enzima libre que para la enzima inmovilizada.

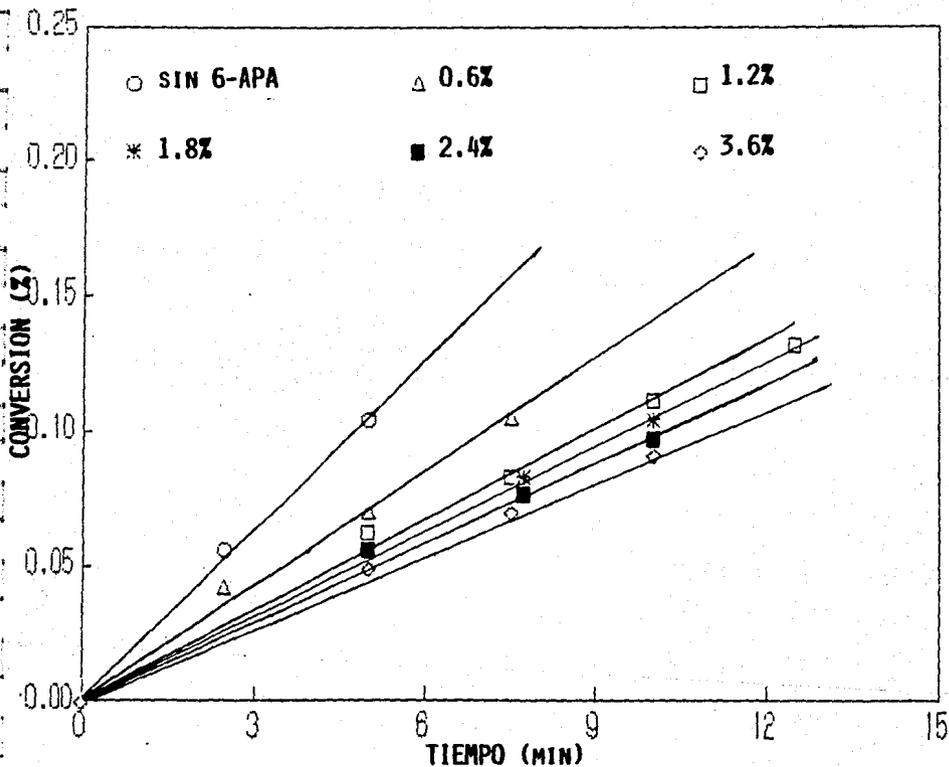


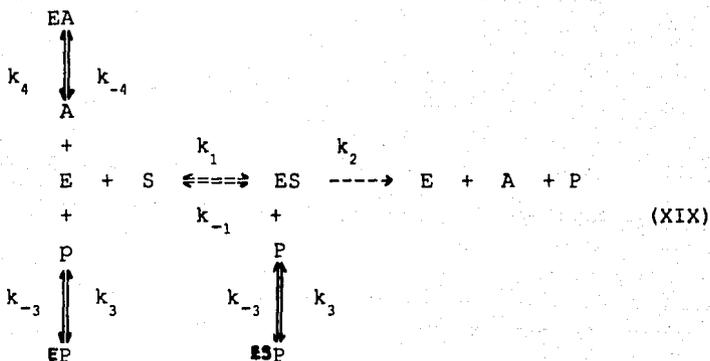
FIGURA 20. Método gráfico para la determinación de la constante de inhibición por 6-APA basado en la ecuación integrada de Michaelis-Menten en presencia de un inhibidor no competitivo. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 10% PGK, 60 U/g de PGK, volumen de reacción 50 ml, ajuste pH con NH₄OH 2 M.

2. MODELO CINETICO DEL BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA.

En la literatura se han reportado basicamente 2 modelos cinéticos para los biocatalizadores de penicilino amidasa: el modelo de doble inhibición, o sea la inhibición por los dos productos de la reacción y el modelo de triple inhibición, que incluye además el efecto inhibitorio de la penicilina.

Los modelos analizados en este trabajo se presentan a continuación.

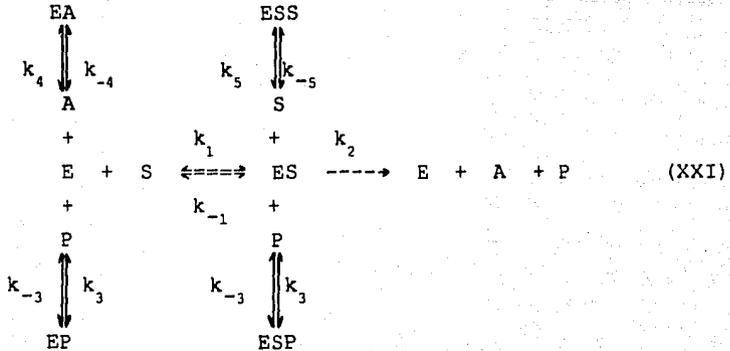
Modelo de doble inhibición.



Ecuación cinética.

$$V_i = \frac{V_{\max} S}{K_m (1 + A/K_{afa} + P/K_{6apa}) + S (1 + P/K_{6apa})} \quad (\text{XX})$$

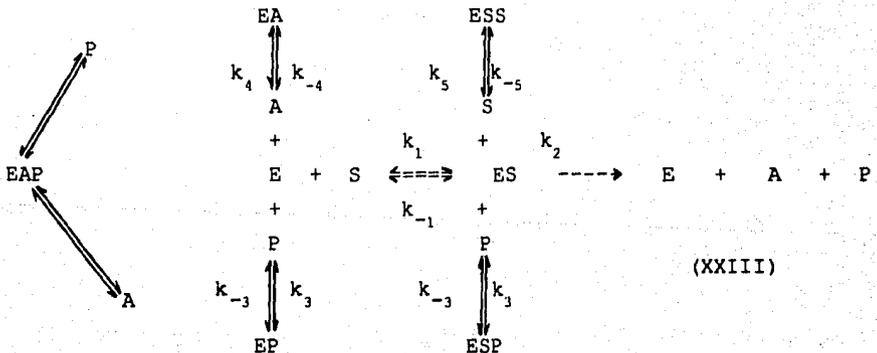
Modelo de triple inhibicion.



Ecuacion cinetica.

$$V_i = \frac{V_{\max} S}{K_m (1 + A/K_{a1} + P/K_{6apa}) + S (1 + P/K_{6apa} + S/K_s)} \quad \text{(XXII)}$$

Modelo de triple inhibicion modificado.



Ecuacion cinetica.

$$V_i = \frac{V_{\max} S}{\{ K_m (1 + A/K_{afa} + P/K_{6apa} + P A/(K_{6apa} K_{afa})) + S (1 + P/K_{6apa} + S/K_s) \}} \quad (XXIV)$$

Las ecuaciones fueron resueltas numericamente con ayuda del lenguaje de simulación ISIM[®] desarrollado por Salford University Industrial Center, LTD, Salford, Inglaterra. Este lenguaje utiliza cuatro diferentes métodos de integración para resolver ecuaciones diferenciales (Anexo 2).

Al comparar los diferentes modelos con los datos experimentales en varias condiciones de hidrólisis (concentración de penicilina y carga de enzima), se encontró que el modelo de triple inhibición modificado fué el que más se ajustó a los resultados. Así por ejemplo en hidrólisis realizadas con 10% de penicilina, en la zona en que el modelo presenta mayor desviación respecto a los datos experimentales, o sea entre 60 y 90 minutos, se encontró una diferencia de 25% entre el modelo I (ecuación XX) y los datos experimentales, la cuál disminuye a 20% con el modelo II (ecuación XXII) y 15% con el modelo III (ecuación XXIV). Por esta razón se decidió continuar trabajando con este modelo. Esta comparación se observa en la figura 21.

Sin embargo, en los experimentos realizados se observó que las hidrólisis no alcanzaban el 100% de conversión, sino que se estabilizaron en un valor menor; en la literatura se cita que la reacción es reversible y que dicha reversibilidad es altamente dependiente del pH (55); se trató de determinar la constante de equilibrio dejando la reacción por tiempos más largos (hasta 4 horas con 10% de penicilina y una carga de enzima de 120 U/g), y realizando la determinación de los productos por HPLC, pero debido a que las concentraciones obtenidas son muy altas y se debe hacer una dilución elevada para la determinación, el método no

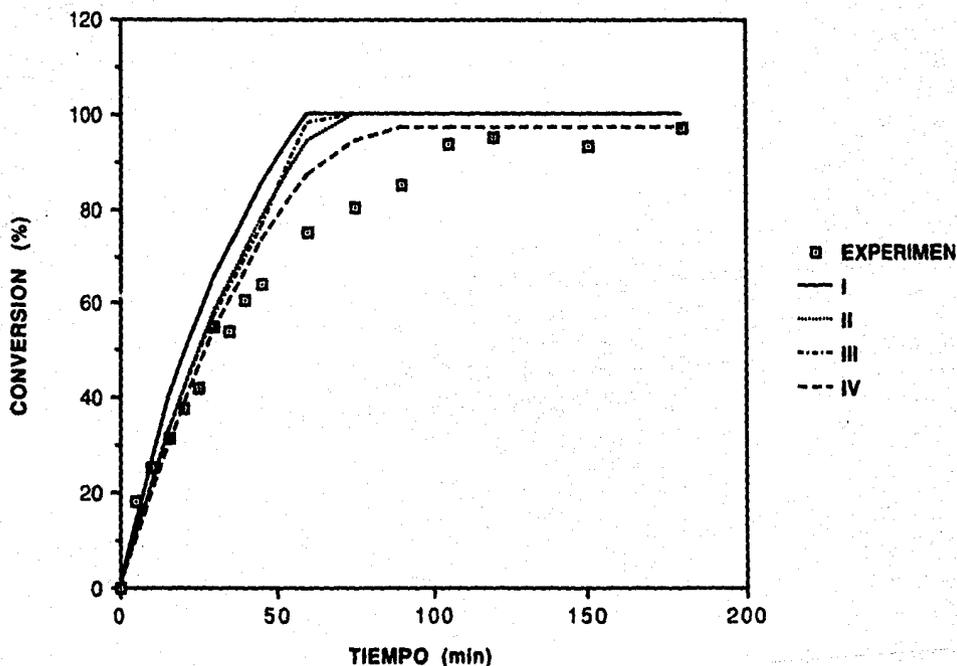


FIGURA 21. Comparación de 4 diferentes modelos cinéticos para la descripción de la reacción de hidrólisis de penicilina. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M, 10 % de PGK, 120 U/g de PGK, volumen de reacción 50 ml.

tuvo la resolución necesaria. Por esta razón se decidió realizar la reacción inversa, es decir, colocar la enzima en presencia de 6-APA y AFA, en las condiciones de la reacción, y observar la aparición de penicilina. Como se observa en el cromatograma de la figura 22, la enzima cataliza la reacción inversa y a pH 7.5 y 37°C con 10% de penicilina, se alcanza el equilibrio a una concentración de penicilina correspondiente al 97% de conversión, lo que corresponde a una constante de equilibrio de 6295 mM.

Con el objeto de introducir la constante de equilibrio en el modelo cinético, se revisó la literatura y se encontró que en la mayoría de los reportes, no se considera este factor, o bien se considera despreciable. Únicamente Haagensen et al (56) utilizan un modelo que incorpora a la cinética de Michaelis Menten para una reacción con inhibición competitiva por AFA y no competitiva por 6-APA, el efecto del pH sobre la actividad y el equilibrio de la reacción, pero no tienen en cuenta la inhibición por sustrato. Sin embargo, el desarrollo realizado por estos investigadores requiere de la determinación de varias constantes o bien de simplificaciones (como se hizo en dicho trabajo); se decidió entonces, no incluir la constante de equilibrio en el modelo sino hacer una corrección posterior, teniendo en cuenta que la conversión final no es 100, y calculando la conversión que se debe alcanzar en el equilibrio, definida como:

$$X_{eq} = \frac{S_0 - S_{eq}}{S_0} \quad (XXV)$$

siendo S_{eq} = concentración de penicilina en el equilibrio.

$$X_{eq} = \frac{S_0 - [S_0 - P_{eq}]}{S_0} = \frac{P_{eq}}{S_0} \quad (XXVI)$$

donde P_{eq} = concentración de 6-APA o AFA en el equilibrio

$$K_{eq} = \frac{[P_{eq}]^2}{S_{eq}} \quad (XXVII)$$

$$X_{eq} = \frac{-K_{eq}/S_0 - \sqrt{(K_{eq}/S_0)^2 + 4 K_{eq}/S_0}}{2} \quad (XXVIII)$$

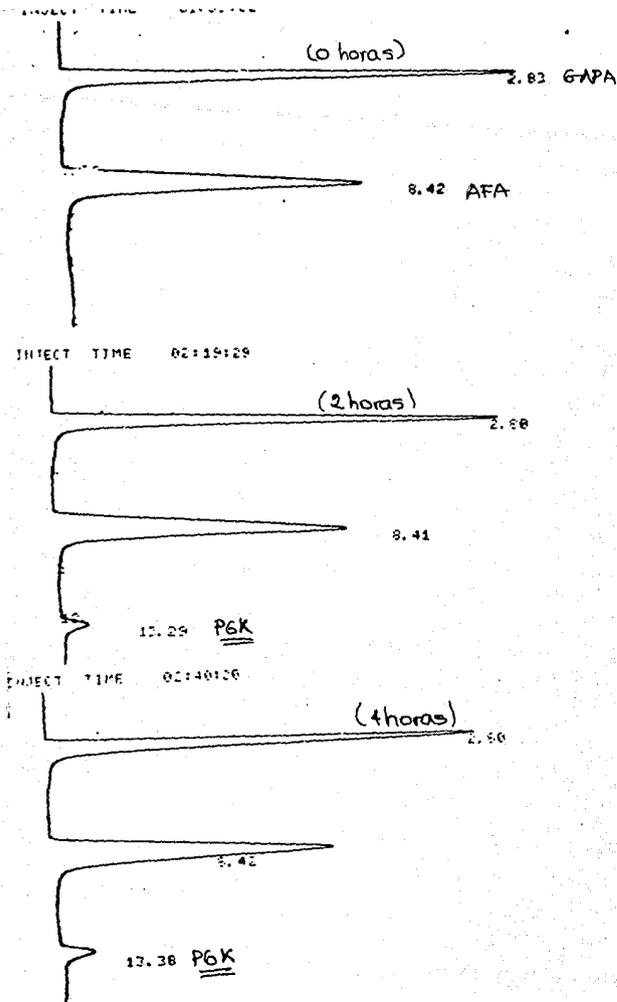


FIGURA 22. Cromatograma de muestras obtenidas durante la incubación de 6-APA y AFA con el biocatalizador de penicilina amidasa. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 6-APA y AFA 0.268 M.

Mediante esta ecuación (XXVIII) y utilizando la constante de equilibrio encontrada experimentalmente, se calculó la conversión en equilibrio para diferentes concentraciones de penicilina y con ello la concentración S_{eq} para cada una, y posteriormente se realizó esta corrección en el modelo, para hallar en cada momento la conversión corregida por el equilibrio. La conversión corregida se define como \bar{X} y para calcularla se realizaron las siguientes operaciones:

$$\bar{S} = S - S_{eq} \quad (XXIX)$$

$$\bar{S}_0 = S_0 - S_{eq} \quad (XXX)$$

$$\bar{X} = \frac{\bar{S}_0 - \bar{S}}{\bar{S}_0} \quad (XXXI)$$

de donde

$$X = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (XXXII)$$

$$S = \bar{S} + S_{eq} \quad (XXXIII)$$

$$X = \frac{S_0 - S + S_{eq}}{S_0} \quad (XXXIV)$$

En la Tabla 16 se observan las concentraciones de penicilina S_{eq} y conversiones X_{eq} en equilibrio, calculadas para diferentes concentraciones de penicilina, así como las obtenidas experimentalmente; en general, no se alcanzan las concentraciones calculadas, lo que puede indicar que ocurre otra reacción; Dennen (76) realizó un estudio de estabilidad del 6-APA con la temperatura y encontró que este compuesto sufre 2 clases de degradación: a pH ácido se rompe el anillo β -lactámico mientras que a pH neutro o alcalino sufre una reacción de polimerización, formándose inicialmente un dímero del compuesto. Se trató de observar entonces que tipo de reacción ocurría al 6-APA con la temperatura por tiempos prolongados (2-24 horas); se analizaron por HPLC y en el cromatograma se encontró un pico a un tiempo de retención cercano al del 6-APA; se comparó con el del 6-APA tratado con una β -lactamasa, encontrándose que éste aparecía a un tiempo de retención menor que el del 6-APA mientras que el

TABLA 16
CONCENTRACIONES DE PENICILINA EN EQUILIBRIO EN LA REACCION DE
HIDROLISIS DE PENICILINA EN TANQUE AGITADO EN LOTE

EXPERIMENTAL			TEORICO	
PARA $K_{eq}=6295$ mM				
S (%)	Seq (mM)	X (%)	Seq (mM)	X (%)
2	0.0	100.0	0.0	100.0
4	4.8	95.0	1.6	98.3
6	11.5	94.6	2.9	97.9
8	19.4	93.5	5.6	97.1
10	8.2	96.5	8.2	96.5
12	15.0	94.6	10.8	95.9
15	37.0	89.0	16.1	95.2

S = concentración de penicilina inicial

Seq = concentración de penicilina en equilibrio

X = % de conversión de penicilina

compuesto encontrado tenía un tiempo mayor, como se observa en la figura 23.

Dennen sintetizó el dímero de 6-APA y realizó un Espectro UV a longitudes de onda entre 200 y 340 nm y encontró un máximo a 280 a 300 nm; en nuestro caso se realizó un espectro similar con el 6-APA a tiempo 0 y 24 horas después de incubarlo a 37°C, y se encontró la aparición de absorbancia en la misma región como se observa en la figura 24. Esto indica que en las condiciones de hidrólisis utilizadas, el 6-APA puede sufrir dimerización en tiempos prolongados. Esta podría ser una de las causas para que la concentración de 6-APA medida por el método de p-dimetilamino benzaldehído sea menor, ya que para que el 6-APA reaccione, el grupo amino debe estar libre, y al formarse el dímero la concentración de éste grupo sería menor.

Se decidió entonces utilizar el modelo de triple inhibición modificado y corregido por el equilibrio, ecuación (XXIV), pero empleando las concentraciones en equilibrio determinadas experimentalmente y resumidas en la Tabla 16, para corregir el % de conversión por medio de la ecuación (XXV), con lo cuál la desviación entre los datos experimentales y el modelo, en la parte más alejada (60-90 min) disminuye a 10%.

Se procedió entonces a realizar ensayos de hidrólisis en tanque agitado operando en lote, y a compararlo con el modelo establecido.

2.1. Reacción en tanque agitado operando en lote.

Se realizaron ensayos de hidrólisis en tanque agitado en lote a diferentes concentraciones de penicilina (de 2 a 10%) con una concentración constante de enzima de 4.8 U/ml; estos resultados se observan en la figura 25, encontrándose buena correlación en bajas concentraciones de sustrato aunque existen desviaciones a concentraciones altas (mayores a 8%) especialmente en conversiones

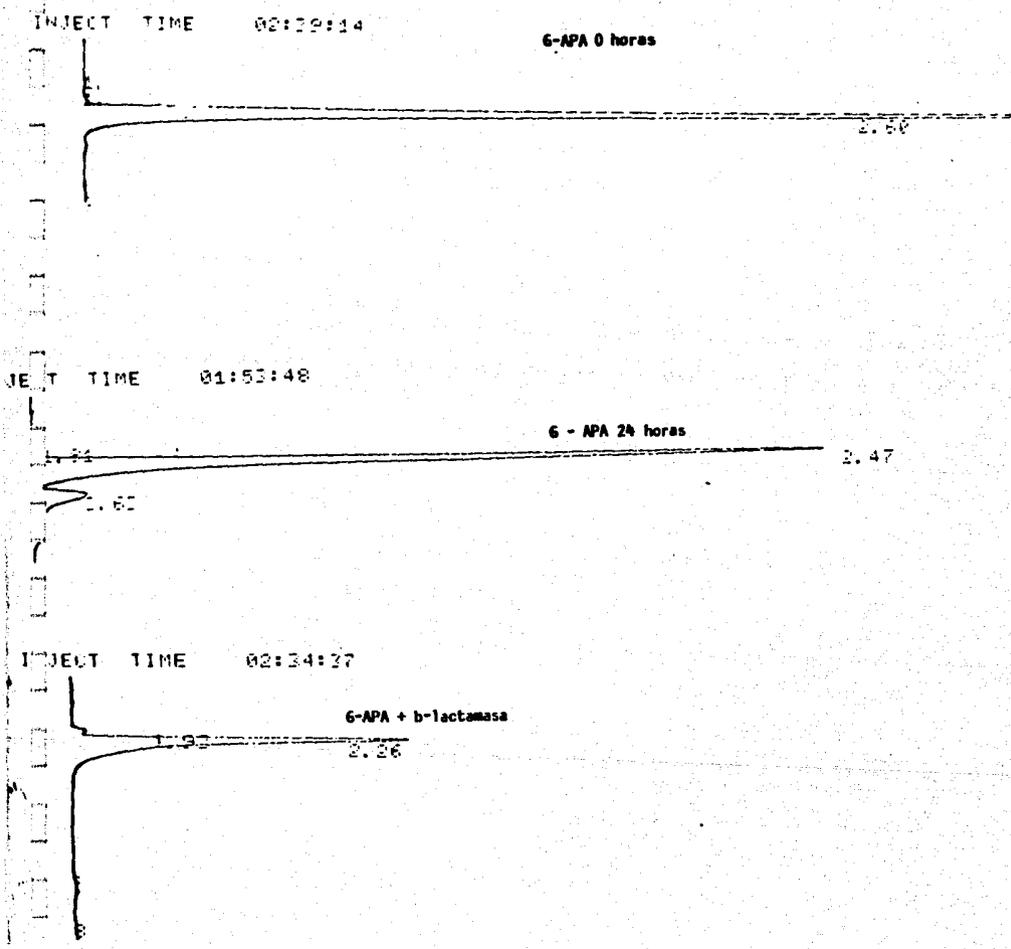


FIGURA 23. Cromatograma de la evolución de la reacción de degradación del 6-APA en solución, así como en presencia de B-lactamasa. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 6-APA 0.268 M.

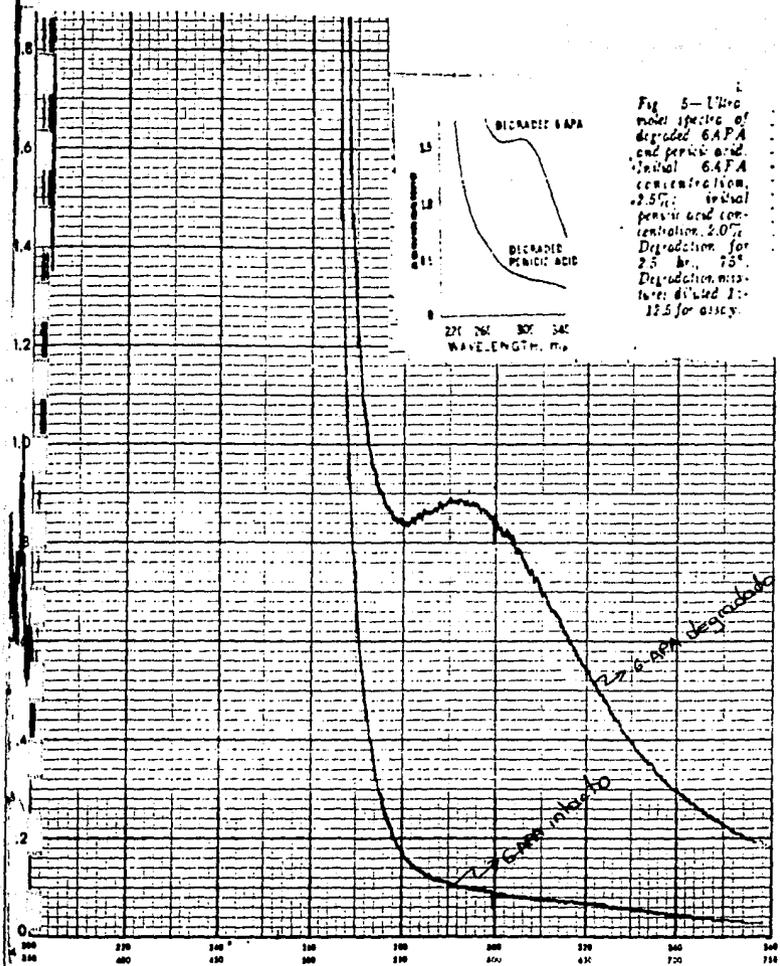


FIGURA 24. Espectro Ultravioleta de la evolución de la degradación del 6-APA. Compuesto incubado a 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, concentración de 6-APA : 0.268 M.

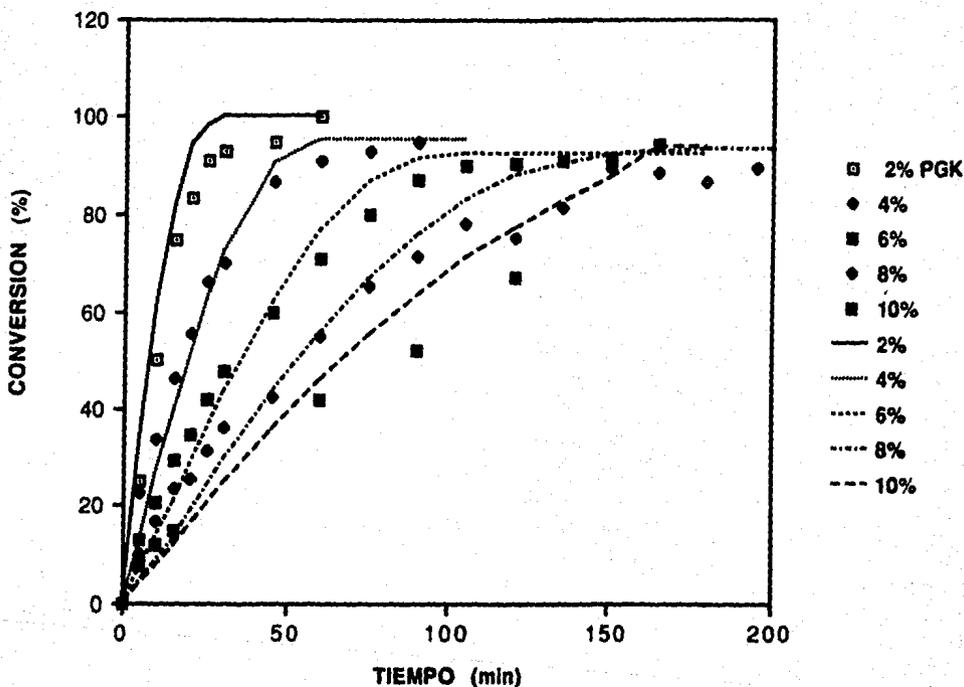


FIGURA 25. Descripción mediante el modelo de triple inhibición modificado con corrección por equilibrio (líneas continuas) de la evolución de la hidrólisis de penicilina en tanque agitado en lote a diferentes concentraciones de sustrato. 4.5 U/ml, carga variable U de enzima/ g PGK. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M. Promedio de determinaciones.

mayores a 80% donde el modelo predice mayores conversiones a las obtenidas experimentalmente; así, por ejemplo, realizamos una comparación a 90% de conversión, donde existen las mayores diferencias, encontramos una desviación entre 2 y 7%.

En estos experimentos la carga de enzima (U de enzima/g de penicilina) va disminuyendo al aumentar la concentración de penicilina y se observa que a cargas menores a 80 U/g no se alcanzan conversiones altas, aún dejando la reacción por tiempos muy largos, debido probablemente al efecto de la baja carga de enzima.

Posteriormente se realizó un ensayo a una carga constante (U de actividad/g de penicilina) y diferentes concentraciones de penicilina, como puede observarse en la figura 26. Conservando esta carga enzimática se alcanza una conversión mayor a 93% a concentraciones hasta de 12%; a 15% solo se alcanza un 88% de conversión, aún en un tiempo de 3 horas, donde la conversión se estabiliza en este valor; esto puede deberse al efecto inhibitorio de los productos (ahora en mayor concentración), razón por la cuál, es aconsejable trabajar a una concentración de penicilina menor a 12%, ya que concentraciones menores producen problemas en las etapas de purificación, resultando en una menor calidad en el 6-APA obtenido. Nuevamente, la diferencia entre el modelo y los resultados experimentales, en la zona en que más se alejan, presenta una diferencia de 6-10%..

2.2. Sistema de tanque agitado alimentado.

Para evitar el problema de la inhibición por sustrato a altas concentraciones de penicilina, se diseñó un sistema de tanque agitado alimentado, para lo cuál se colocó inicialmente en el tanque agitado un volumen de 30 mL de buffer de reacción junto con la enzima; se adicionó la penicilina concentrada correspondiente a un 15% de PGK, a un flujo tal que al final de 2 horas (tiempo de duración del lote) se hubiera adicionado el total de la penicilina. De esta forma, la concentración de

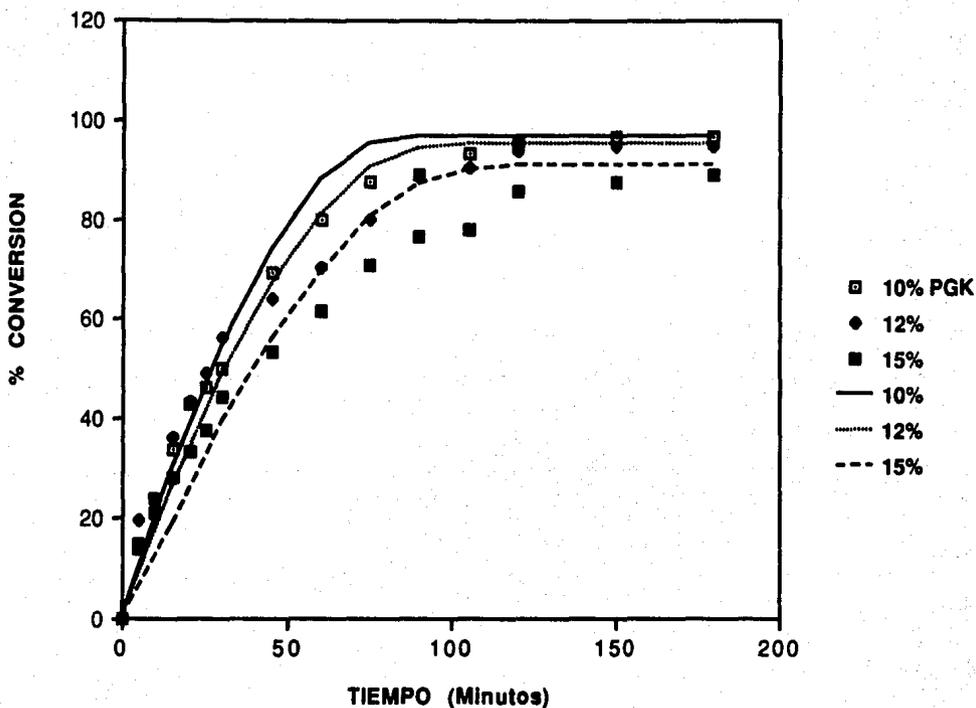


FIGURA 26. Descripción mediante el modelo de triple inhibición modificado con corrección por equilibrio (líneas continuas), de la evolución de la hidrólisis de penicilina en tanque agitado en lote a diferentes concentraciones de sustrato. 120 U/g de PGK, 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M. Promedio de 2 determinaciones.

penicilina en contacto con la enzima se mantiene baja. Sin embargo, se obtuvo una conversión menor a la obtenida en el sistema en lote; este resultado indica que aunque de esta forma se elimina el efecto del exceso de sustrato, no se elimina el principal efecto que es el de inhibición por producto y la velocidad global con que se desarrolla el proceso es menor. La evolución de la reacción se presenta en la figura 27.

2.3. Sistema de tanque continuo agitado.

Para este sistema se colocó la solución de penicilina en un recipiente enfriado a 4°C de donde se transportó mediante una bomba peristáltica a un tanque donde se calentó a 37°C para ser llevada al reactor a flujo constante, y la succión se realizó por medio de otra bomba a un mayor flujo al de entrada, manteniendo el volumen constante por medio del nivel de salida, como se observa en la figura 28.

El modelo empleado para la comparación fué el utilizado anteriormente para el sistema en lote, pero teniendo en cuenta que en estado estable el sistema permanece a una concentración de sustrato y productos constante, por lo cuál la conversión es constante, la ecuación de Michaelis-Menten con las 3 inhibiciones no se integra sino que se emplea directamente para calcular el tiempo de residencia necesario para obtener determinada conversión. La ecuación de diseño para un tanque continuo agitado es la siguiente:

$$\theta = \frac{S_0 X}{V_i} \quad (\text{XXXV})$$

donde θ es el tiempo de residencia y la ecuación cinética es:

$$V_i = \frac{V_{\max} S}{\left\{ K_m \left(1 + A/K_{afa} + P/K_{6apa} + P A / (K_{6apa} K_{afa}) \right) + S \left(1 + P/K_{6apa} + S/K_s \right) \right\}} \quad (\text{XXXVI})$$

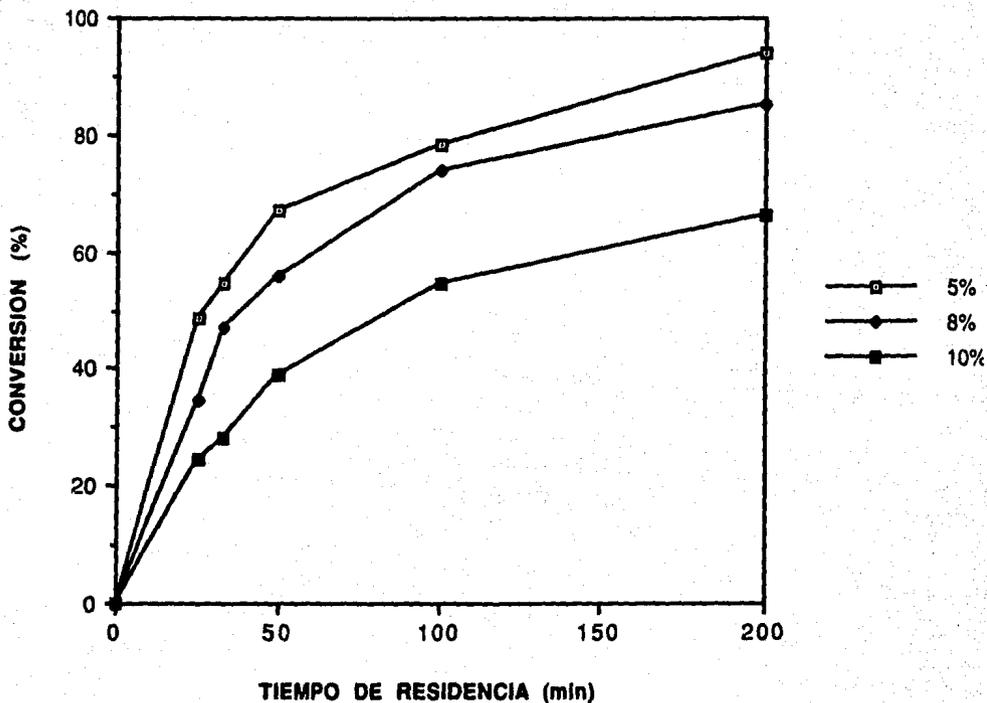


FIGURA 28. Reacción de hidrólisis de penicilina en reactor de tanque continuo agitado. Efecto del tiempo de residencia en el % de conversión a diferentes concentraciones de sustrato. 120 U/g de PGK, 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M. Promedio de 5 determinaciones.

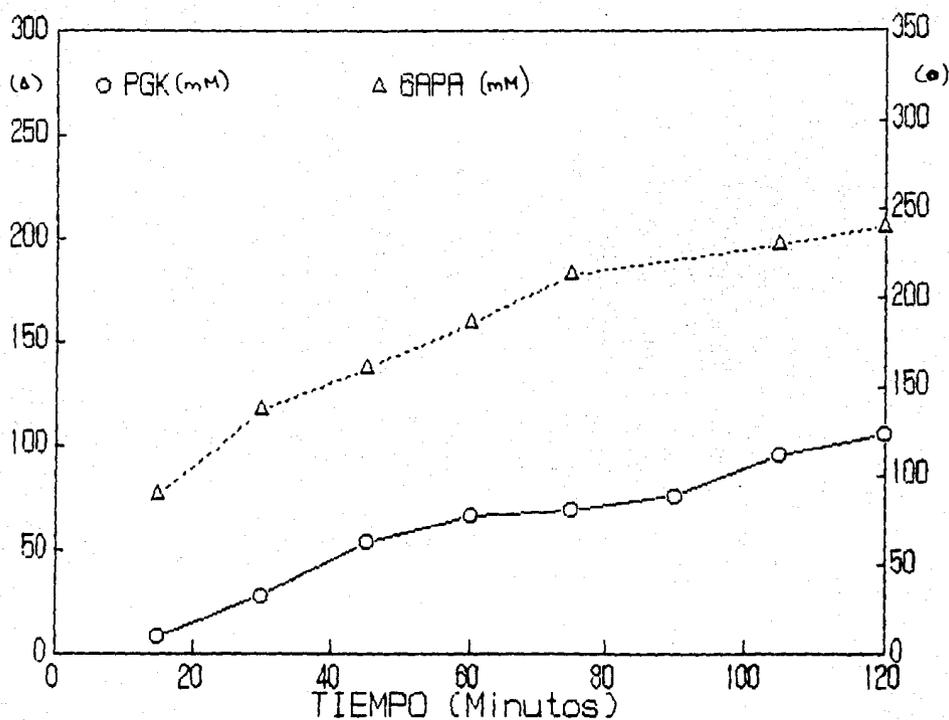


FIGURA 27. Evolución de la reacción de hidrólisis de penicilina en reactor de tanque agitado alimentado. 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, gasto de alimentación de sustrato: 0.25 ml/min, concentración final de sustrato: 15%, carga:120 U/g de PGK.

por lo cuál:

$$\theta = \frac{X \{K_m (1 + S_o X (1/K_a f_a + 1/K_{6a} p_a + S_o X / K_a p_a K_{6a} p_a))\}}{V_{max} (1-X)}$$

$$[S_o (1-X)] [1 + S_o X / K_{6a} p_a + (S_o (1-X)) / K_s] \quad (XXXVII)$$

La conversión se corrigió por el equilibrio utilizando la ecuación (XXV).

Se realizaron ensayos a 3 concentraciones de penicilina utilizando una carga de 120 U/g de penicilina y se encontró que solo a 5% se alcanzaba una conversión mayor a 93%, con un tiempo de residencia de 200 minutos (3.3 horas), a concentraciones mayores la conversión alcanzada era menor. Estos resultados se aprecian en la Tabla 17 y en la figura 28; el modelo describe adecuadamente el sistema a concentraciones de sustrato hasta 8% alejándose de los resultados experimentales especialmente a conversiones altas (tiempos de residencia altos).

Posteriormente se realizaron ensayos a 10% de penicilina, variando ahora la carga de enzima, observando que un aumento en la carga de enzima de 120 a 160 U/g no produjo un incremento en la conversión. Los resultados se aprecian en la figura 29.

En general se observa que las conversiones obtenidas en el sistema de tanque agitado continuo en todos los casos son menores a las alcanzadas en sistema en lote, lo cual se debe a que en el estado estacionario, la enzima está siempre en contacto con una alta concentración de productos, que es la concentración a la salida, por lo que en todo momento, el efecto inhibitorio de los mismos es elevado; esto no ocurre en el sistema en lote, en el cuál la concentración de productos aumenta a medida que avanza la reacción por lo que la inhibición al principio es baja y se alcanzan mayores velocidades de reacción.

Los experimentos realizados, permiten concluir que el sistema

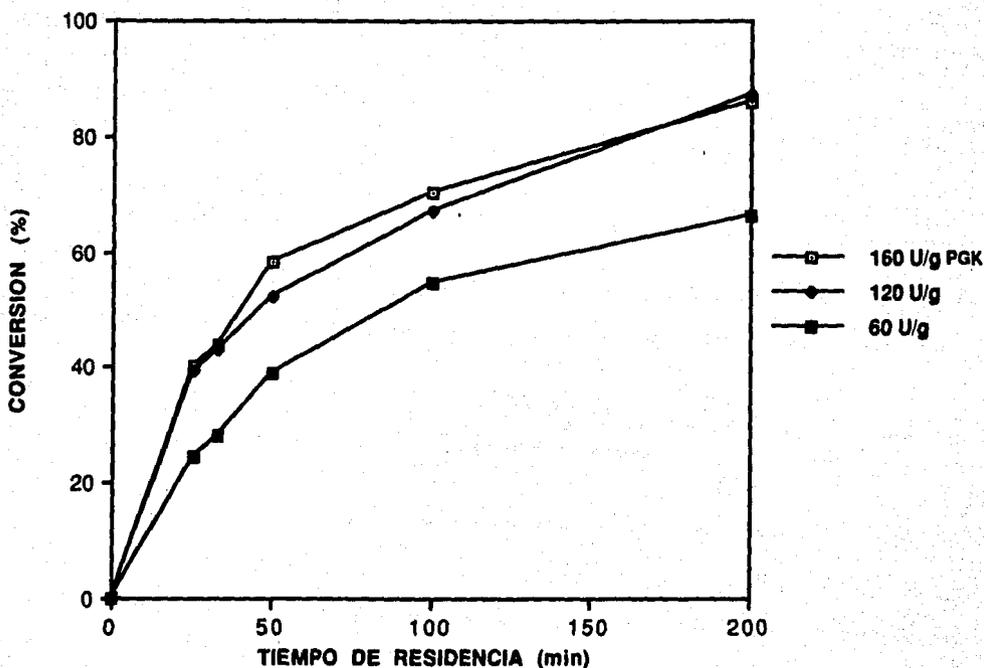


FIGURA 29. Reacción de hidrólisis de penicilina en el reactor de tanque continuo agitado. Efecto del tiempo de residencia en el % de conversión a diferentes cargas de enzima. 12 U/mL, 10% de PGK, 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH_4OH 2 M. Promedio de 5 determinaciones.

Óptimo para la utilización del biocatalizador de penicilino amidasa es el tanque agitado operando en lotes, con el cuál es posible alcanzar la conversión requerida en un tiempo adecuado, para obtener un producto de calidad aceptable. La concentración de penicilina que debe ser empleada es 10 a 12 %, para obtener, por una parte una concentración suficiente de 6-APA que permita una recuperación adecuada (ya que el empleo de menores concentraciones produce un 6-APA diluido que aumenta los costos de extracción) y por otra parte evitar la inhibición por exceso de sustrato.

No se realizaron ensayos en reactor en columna, ya que la literatura indica que el uso de una columna produce un perfil de pH que disminuye la velocidad de reacción a la vez que produce una mayor degradación del biocatalizador; por otra parte, para realizar el montaje de columnas en serie se requieren varios sistemas de control de pH y un sistema en paralelo requiere de un sistema complejo, con el cuál no se cuenta; sin embargo, se considera importante investigar en un trabajo posterior el comportamiento del biocatalizador en este tipo de reactores, en los cuales es posible trabajar en forma continua obteniendo mayores productividades debido a que el catalizador está en contacto con la menor concentración de productos, lo que reduce significativamente el efecto inhibitorio, pues solo al final de la columna se alcanza una conversión elevada.

2.4. Productividad del sistema en lote.

Un factor muy importante que permite la evaluación del biocatalizador frente a otros del mismo tipo es la productividad, definida como los Kg de 6-APA que se pueden producir por Kg de biocatalizador empleado.

Este parámetro depende de varios factores:

1. De la cinética de la reacción, siendo variables importantes la carga enzimática (que define la V_{max}), la concentración de

sustrato empleada, y la conversión requerida.

2. De la estabilidad del biocatalizador, que depende como se pudo apreciar, de la temperatura y el pH.

Se consideró por esta razón que la mejor forma de evaluar este parámetro era mediante la utilización del modelo cinético acoplado al modelo de desactivación de la enzima. Para ello se realizaron los siguientes cálculos, mediante el lenguaje de simulación ISIM, como se presenta en el Anexo 3:

1. Se definió la productividad por lote, como los g de 6-APA/g de catalizador.h.

2. Se definió el rendimiento por lote, como los g de 6-APA/g de catalizador correspondientes al 95% de conversión.

2. Con el modelo cinético se calculó el tiempo requerido para alcanzar el 95% de conversión para cada lote.

3. Mediante el modelo de desactivación de primer orden se calculó la pérdida de actividad que ocurre conforme transcurre cada ciclo, considerando el tiempo transcurrido desde el primer ciclo.

4. Se sumó el rendimiento correspondiente a cada ciclo, para obtener el rendimiento total, que en los catalizadores industriales es denominado productividad, como se observa en tabla 12.

En la figura 30 se observa la variación del rendimiento con el número de ciclos. El rendimiento obtenido para un tiempo de vida media (1155 horas) es de 525 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, que es un valor que se encuentra dentro de los reportados para los catalizadores industriales; la productividad promedio es 0.455 g 6-APA/g biocatalizador.h. Esto indica que el catalizador puede competir con los biocatalizadores industriales, si se emplea al menos durante un tiempo de vida media. En este tiempo se llega a

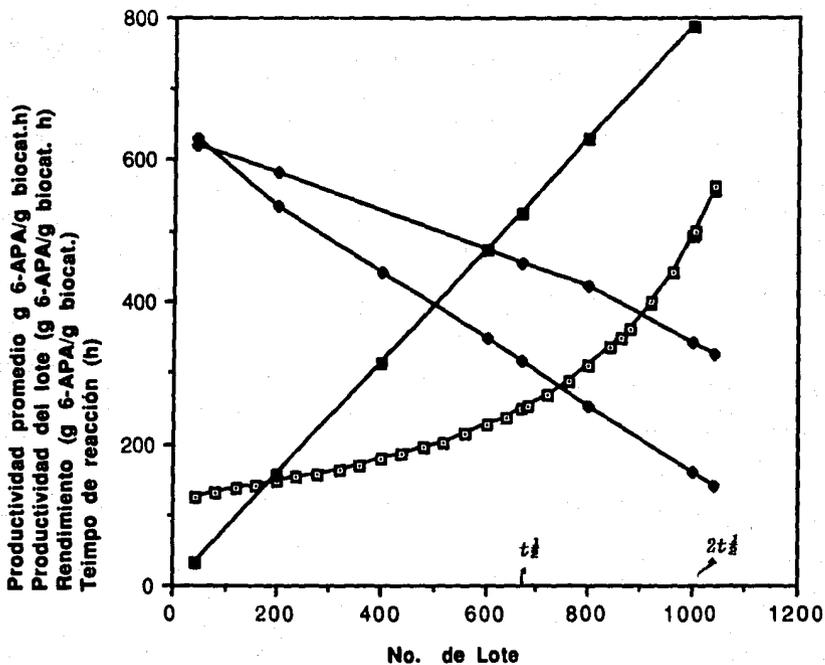


FIGURA 30. Efecto del número de lotes en la productividad del biocatalizador de penicilino amidasa y en el tiempo de la reacción tomando en cuenta su desactivación . Estudio realizado por simulación empleando el modelo de triple inhibición con equilibrio y la desactivación de primer orden. Condiciones de cálculo: 10% de PGK, 37°C, pH 7.5, carga de enzima 120 U/g de PGK.

ciclos de 2.5 horas, que es un tiempo adecuado para la reacción. Si el biocatalizador se emplea por dos tiempos de vida media, se logra un rendimiento de 790 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, sin embargo el ciclo se extiende a 5 h, que ya es un tiempo demasiado largo y con riesgo para el producto, si se tiene en cuenta que al prolongarse la reacción, ocurren reacciones secundarias indeseables; además, la productividad disminuye a 0.341 g de 6-APA/g de biocatalizador.h.

Por esta razón se considera que el biocatalizador debe ser empleado por un tiempo de vida media (1155 horas), a pH 7.5 y 37°C con bencilpenicilina potásica al 10% en reactor de tanque agitado por lote, para obtener un rendimiento de 525 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador y una productividad promedio de 0.455 g de 6-APA/g de biocatalizador.h para un 95 % de conversión.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización del biocatalizador de penicilino amidasa desarrollado por la empresa GENIN S.A. de C.V. Dicho catalizador es elaborado con penicilino amidasa purificada, extraída de una cepa de *E. coli*.

Se encontró que las características del biocatalizador son las siguientes:

Temperatura de máxima actividad	49° C
pH de máxima actividad	7.5-8.0
Energía de activación de la reacción en presencia del biocatalizador	10963 cal/mol

Condiciones óptimas de reacción:

pH	7.5
Temperatura	37°C
Concentración de sustrato	10-12% de PGK

Se estableció un modelo de desactivación del biocatalizador con el pH, lo cuál no había sido reportado previamente en la literatura. Este modelo resulta de fundamental importancia pues pone de manifiesto el efecto que tiene el pH sobre el proceso. Para efectos industriales, esto se traduce en recomendaciones específicas para lograr una regulación lo más precisa posible.

Considerando el efecto global de temperatura y pH sobre la estabilidad del catalizador, se concluye que debe operarse a 37°C con regulación rigurosa a pH 7.5.

El biocatalizador presenta una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ácido fenilacético, no competitiva por ácido 6-aminopenicilánico y acompetitiva por exceso de sustrato.

Las constantes cinéticas del biocatalizador son las siguientes:

K_m	4.17 mM
V_{max}	170 U/g
K_{afa}	68.6 mM
K_{6apa}	100.7 mM
K_s	430 mM

Dadas las dificultades de medición de la V_i en presencia de 6-APA para conocer su constante de inhibición, se utilizó la ecuación integrada de Michaelis-Menten en presencia de un inhibidor no competitivo para encontrar el valor dicha constante. Esta forma de determinar este parámetro, si bien no resulta de un complejo análisis teórico o matemático, a nuestro juicio, tiene la originalidad de no haber sido empleada anteriormente en problemas similares.

Se estableció un modelo cinético que contempla tanto la inhibición por los 2 productos de la reacción como la inhibición por exceso de sustrato, y además incluye una corrección por el equilibrio de la reacción. El modelo propuesto (ecuaciones XXIV y XXV) describe adecuadamente la reacción de hidrólisis de la penicilina, aunque presenta alguna desviación principalmente a altas conversiones.

Se compararon varios sistemas de reactores encontrándose que el mejor sistema de los ensayados es el reactor de tanque agitado en lote. El modelo cinético describe adecuadamente tanto el sistema de reacción por lote como el de tanque continuo agitado, a bajas concentraciones de sustrato.

Se emplearon las ecuaciones de desactivación y cinética para determinar la productividad del biocatalizador; se simuló la caída de actividad conforme se realizan los lotes, encontrándose un rendimiento calculado para el catalizador en función del número de lotes con 95% de conversión. El rendimiento del biocatalizador es de 525 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador para un tiempo de vida media y la productividad promedio, para este mismo tiempo es de

0.455 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador.h.

La conclusión general del trabajo es que el biocatalizador de la empresa GENIN SA de CV presenta características que lo hacen apto para competir con los biocatalizadores empleados industrialmente. Los datos aquí generados permiten establecer condiciones de proceso razonables para establecer un proceso industrial competitivo.

RECOMENDACIONES

Dimerización del 6-APA. Sería importante producir el dímero de 6-APA y estudiar la cinética de dimerización para determinar la constante de dimerización e involucrarla en el modelo para establecer si es este efecto el que produce las diferencias con los resultados experimentales.

Modelo de desactivación del biocatalizador por el pH. Estudiar el mecanismo de la desactivación estableciendo cuales son las formas activas e inactivas de la enzima respecto al pH. Además profundizar sobre el efecto del pH en la reacción de hidrólisis.

Diseño del reactor. Estudiar el sistema de columnas empacadas determinando el número de columnas requeridas para alcanzar la conversión requerida.

Escalamiento. Realizar ensayos de reacción a nivel piloto para comprobar la reproducibilidad de los resultados a mayor escala, donde los problemas de agitación y control de pH pueden ser más difíciles.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Burk, K., et al. (1988). New synthetic carriers for enzyme coupling. **Die Angewandte Makromolekulare Chemie**. **157**: 105-121.
- (2) Poulsen, P.B. (1984). Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes. **Biotechnol. and Gen. Eng. Rev.** **1**, 121-140.
- (3) Barber, M. and Ass. (1987). *Chemica. Medicinal chemical monographs. Monograph # 2. 6-APA, 7-ADCA and other penicillin transformation products.* PJB Publications. England.
- (4) Batchelor et. al. (1959). Synthesis of penicillins: 6-amino penicillanic acid in penicillin fermentations. **Nature**, **183**: 257-258.
- (5) Faith, W.F., Neubeck, C.E. and Reese. E.T. (1971). Production and application of enzymes. **Adv. Biochem. Eng.** **1**, 77-111.
- (6) Fosker, G.R., et al. (1971). Derivatives of 6 - amino penicillanic acid. Part. X. A nonenzymic conversion of benzyl penicillin into semi-synthetic penicillins. **J. Chem. Soc. C**, 1917-1919.
- (7) Kauffman, W., Bauer, K. and Offe, H.A. (1960). Enzymatic cleavage and resynthesis of penicillins. In **Antimicrobial Agents Annual**. P., Graym B., Tarbenkin and S. G. Bradley (Eds). NY., 1-5.
- (8) Rolinson, G. N., et al. (1960). Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymic hydrolysis. **Nature**. **187**, 236-237.
- (9) Claridge, C.A., Gourevitch. A. and Lein, J. (1960). Bacterial penicillin amidase. **Nature**. **187**, 237-238.

- (10) Huang, H.T., et al. (1960). Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillins. **J. Am. Chem. Soc.** **82**, 3790.
- (11) Hamilton-Miller, J.M.T. (1966). Penicillin acylase. **Bacteriol. Rev.** **30**, 761-771.
- (12) Carley Smith, S.W., Dunnill, P. and Lilly, D. (1980). Kinetic behavior of immobilized penicillin acylase. **Biotechnol. and Bioeng.** **22**: 735-756.
- (13) Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, M.D. (1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli*. **Biochim. Biophys. Acta.** **276**: 250-256.
- (14) Lowe, D.E., Romancik, G. and Elander, R.P. (1981). Penicillin acylases: A review of existing enzymes and the isolation of a new bacterial penicillin V acylase. **Dev. Ind. Microb.** **22**:163-180.
- (15) Shimizu, M., et. al. (1975). Purification and properties of penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*. **Agr. Biol. Chem.** **39**(8): 1655-1661.
- (16) Savidge, T.A. (1984). Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. en: Vandame, E.J. (Ed). **Biotech. of Ind. Antib.** Marcel Deckker. New York. 172-224.
- (17) Ryu, D.Y., et al. (1972). Microbial penicillin amidohydrolase and the performance of a continuous enzyme reactor system. **Proc. Int. Ferment. Symp.**, 4: 307-314.
- (18) Savidge, T. A. and Cole, M. (1975). Penicillin acylase (bacterial). In **Meth. in Enz.** **43**. J. Hash (Ed). Academic, New York. 705-721.
- (19) Kaufmann, W. and Bauer, K. (1960). Enzymatische spaltung und

- (20) Vojtisek, V., and Slezak, J. (1975). Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli*. II. Synthesis of the enzyme, kinetics and specificity of its induction and the effect of O₂. **Folia Microbiol.** 20: 298-306.
- (21) Sato, T., Tosa, T. and Chibata I. (1976). Continuous production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by immobilized microbial cells. **Eur. J. Appl. Microb.** 161-168.
- (22) Schomer, U., Segner, A. and Wagner, F. (1984). Penicillin acylase from the hybrid strain *Escherichia coli* 5K (pHM12). Enzyme formation and hydrolysis of β -lactam antibiotics with whole cells. **Appl. and Env. Microbiol.** 307-312.
- (23) Braun, J., Le Chanu, P. and Le Goffic, F. (1989). The immobilization of penicillin G acylase on chitosan. **Biotechnol. and Bioeng.** 33: 242-246.
- (24) Pereira Cardoso, J., and Correia da Costa, M.B. (1986). Modelling of the hydrolysis of benzylpenicillin to 6-amino penicillanic acid and phenyl acetic acid by an immobilized penicillin amidase in a small pilot plant batch recirculated reactor. **British Polymer Journal.** 18(5): 323-332.
- (25) Mahajan, P., and Prabhakar, B. (1984) Novel approaches to the purification of penicillin acylase. **App. Biochem. and Biotech.** 9: 421-437.
- (26) Rodriguez, M. E. Método de choque osmótico para la purificación de penicilino amidasa. In press.
- (27) Kutzbach, C., and Rauenbusch, E. (1974). Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.** 354, 45.

- (28) Bruns, W., et al. (1985). Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. **J. Mol. Appl. Gen.** **3**: 36-44.
- (29) Mahajan, P.B. (1984) Review. Penicillin acylases. An update. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** **9**: 537-555.
- (30) Marconi, W., et al. (1973). The hydrolysis of Penicillin G to 6-aminopenicillanic acid by entrapped penicillin acylase. **The Journal of Antibiotics.** 228-232.
- (31) Bryjak, J., Trochimczuk, A and Noworyta A. (1989). Immobilization of penicillin acylase on acrylic carriers. **Bioprocess. Eng.** **4**: 159-162.
- (32) Burteau, N., Burton, S., and Crichton R.R. (1989). Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. **FEBS Letters.** **258**,2:185-189.
- (33) Greco, G., Veronese F., Largajolli R. and Gianfreda L. (1983). Purified penicillin acylase performance in a stabilized ultrafiltration membrane reaction. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** **18**, 333-338.
- (34) Park, J. M., and Choi, C. (1982). The production of 6-aminopenicillanic acid by a multistage tubular reactor packed with immobilized penicillin amidase. **Biotechnol. and Bioeng.** **25**: 1623-1637.
- (35) Esparza, M.G. (1981). Inmovilización de la enzima Penicilino amidasa en fibras de acetato de celulosa. Tesis. UNAM México.
- (36) Shewale, J.G. and Sivaraman, H. (1989). Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. **Proc. Biochem.** 146-154.

- (37) Lagerlof, E., et al. (1976). Production of 6-amino penicillanic acid with immobilised *Escherichia coli* acylase. In **Meth. Enzymol.** 44. K. Mosbach Ed. Academic. New York. 759.
- (38) Lee, S. B. and Ryu, D. Y. (1982). Reaction Kinetics and mechanisms of penicillin amidase: a comparative study by computer simulation. **Enz. Microbiol. Technol.** 4: 35-38.
- (39) Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T. (1976). US Patent 3.953.291.
- (40) Klein, J., and Wagner, F. (1980). Immobilization of whole microbial cells for the production of 6-aminopenicillanic acid. In **Enz. Eng.** 5. Plenum Press. 335-345.
- (41) Casas, L.T., Quintero, R. R. (1981). Immobilized microbial cells for 6-aminopenicillanic acid production. **2nd. European Congress of Biotechnol.** England.
- (42) Warburton, D., Dunnill, P., and Lilly, M.D. (1973). Conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid in batch reactor and continuous feed stirred tank reactor using immobilized penicillin amidase. **Biotechnol. and Bioeng.** 15: 13-25.
- (43) Pereira C. J., et al. (1987). Enzymatic hydrolysis of 7-phenyl acetamido - deacetoxi cephalosporanic acid with immobilized penicillin amidase (E.C. 3.5.1.11) at laboratory and pilot plant scales using a novel type of enzymatic reactor. **International Conference of Bioreactors and Biotransformations.** Gleneagles. Scotland. 309-320.
- (44) Sauber, K, and Kramer, M. (1982). Stabilization of penicillin amido hydrolase immobilized on Eupergit C. **Enz. Eng.** 6: 235-236.
- (45) Mustafa-Nevzat. I. S., Goekcek, Z. (1987). Industrial production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) from

penicillin G via biocatalysis by Eupergit-penicillin-amidase (E-PCA). *Escherichia coli* enzyme immobilization on Eupergit C support. (Conference Abstract). **Eur. Congr. Biotechnol. 2:** 341.

- (46) Bihari, V. and Buchholz, K. (1984). A support-spacer ligand system for specific affinity adsorption of penicillin acylase. **Biotechnol. Letters. 6,** 9:571-576.
- (47) Zurkova, E., et al. (1983). Immobilization of *Escherichia coli* cells with penicillin - amidohydrolase activity on solid polymeric carriers. **Biotechnol. and Bioeng. 25:** 2231-2242.
- (48) Singh, D., Goel, R., and Johru, B.N. (1988). Deacylation of penicillins by the immobilized mycelia of the *Thermophile malbranchea*. **J. Gen. Appl. Microbiol. 34:** 333-339.
- (49) Klein, J., Vorlop, K.D., and Wagner, F. (1984). The implication of reaction kinetics and mass transfer on the design of biocatalytic processes with immobilized cells. **Enz. Eng. 434,** 7: 437-449.
- (50) Rousseau, C., Roth-Van, E. and Liou, J.K. (1984). Internal pH control of immobilized enzyme particles: penicillin acylase-urea system. in **Progress in Indust. Microbiol. 20.** Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 73-80.
- (51) Vandamme, E.J. (1988). Immobilized biocatalyst and antibiotic production: Biochemical, Genetical and Biotechnical aspects. In: **Bioreactor Immobilized Enzymes and cells.** Fundamentals and applications. Ed. Murray Moo-Young. Elsevier Applied Science. NY. 261-286.
- (52) Rohm Pharma GmbH. Eupergit PCA. (1983) Information Brochure.
- (53) Boeringer Mannheim GmbH. (1985). Specifications of penicillin G acylase, carrier fixed enzyme. Brochure No 520, 608.

- (54) Mollgaard, H., and Karlsen, L. (1987). 6-APA production in pilot plant with an immobilized penicillin V acylase (semacylaseTM). NOVO Industri, Denmark. **9th. International Enz. Eng. Conference**. Santa Bárbara, California, USA.
- (55) NOVO. (1987). Production of 6-APA from penicillin-V in a stirred batch system using semacylaseTM from NOVO Industri A/S. IB No 236d-6B. Novo Enzyme Information.
- (56) Haagenen, P., et al. (1983). The kinetics of penicillin V deacylation on an immobilized enzyme. **Biotechnol. and Bioeng. 25**: 1873-1895.
- (57) Mollgaard, H. (1987). Choice of reactor for semacylaseTM. An industrial penicillin V acylase. **Enz. Eng. 501**, 8: 473-476.
- (58) Gestrelus, S., Nelsen, B. H. and Mollgard, H. (1987). Continuous 6-APA and 7-ADCA production using semacylaseTM immobilized penicillin-V-acylase. **Ann. N. Y. Ac. Sci.** 554-556.
- (59) SCLAVO. (1990). Penicillin G-amidase beads immobilized. Milan Italia. Brochure.
- (60) Klyosov, A. (1989). Enzyme engineering at the industrial level. Present and future prospects. United Nations Industrial Development Organization.
- (61) Svedas, V.K., Margolin, A.L. and Berezin, I.V. (1984). Enzymatic modification of β -lactam antibiotics: problems and perspectives. In **Enz. Eng.** - Future directions. Plenum Press. N.Y. 257-293.
- (62) ORSABE. (1990). Procesos Biotecnológicos. Curso Avanzado, CIINGEBI, UNAM, Cuernavaca, México.

- (63) Giacobbe, F., Iasonna, A., and Cecere, F. (1978). Production of 6-APA in the penicillin G fermentation plant by using fiber-entrapped penicillin amidase. In: **Enz. Eng. 4**. Plenum Press, N.Y. 245-252.
- (64) Wang, Q. Ji, X. and Yuan, Z. (1982). Immobilization of microbial cells using gelatin and glutaraldehyde. In: **Enz. Eng. 6**. Plenum Press, N.Y. 215-216.
- (65) Sandoval, H. (1980). Cinética enzimática de la hidrólisis de penicilina G para la formación de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) por la penicilino amidasa de células completas de *E. coli*. Tesis. UNAM, México.
- (66) Morita, H. and Iwata, T. (1984). Penicillin acylase activity in mutants of *Escherichia coli* highly sensitive to penicillin G. **J. Ferment. Technol. 62**: 217-220.
- (67) Mahajan, P.B. (1984). Penicillin acylases. An update. **Appl. Biochem. Biotechnol. 9**: 537-554.
- (68) Daumy, G. O., et al. (1985). Experimental evolution of penicillin acylases from *E. coli* and *Proteus rettgeri*. **J. Bacteriol. 163**: 925-932.
- (69) Bruns, W., et al. (1985). Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. **J. Mol. Appl. Genet. 3**: 36-44.
- (70) Oliver, G., et al. (1985). A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. **Gene. 40**: 9-14.
- (71) McCullough, J.E. (1983). Gene cloning in *Bacilli* related to enhanced penicillin acylase production. **Biotechnology. 1**: 879- 882.

- (72) Meevootison, V. and Sauders, R. (1987). Cloning and expression of penicillin acylase genes from overproducing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. **Appl. Microb. Biotechnol.** **25**: 372-378.
- (73) Balbás, P. and Bolivar, F. (1990). Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. **Meth. Enzymol.** **185**. 14-37.
- (74) Valle, F., et al. (1991). The role of penicillin amidases in nature and in industry. **Trend. Biochem. Sci.** In press.
- (75) Shewale, J. G., et al. (1987). Evaluation of 6-amino penicillanic acid by p-dimethyl aminobenzandehide. **Biotech. Tech.** **1**, 1: 69-72.
- (76) Connors, K.A., Amidon, G.L. and Kennon, L.. (1979). Chemical stability of pharmaceuticals. A handbook for pharmacists. John Wiley & Sons. Eds. N.Y. 185-194.
- (77) Dennen, D.W. Degradation kinetics of 6-aminopenicillanic acid. **J. Pharm. Sci.** **56**, 10: 1273-1276.
- (78) ONUDI. (1987). Producción industrial de penicilino amidasa y su uso para la obtención de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Programa Regional de Biotecnología para la América Latina y el Caribe. PNUD.UNESCO.ONUDI.

ANEXO 1.

Metodo de paradimetilaminobenzaldehido para la determinacion de 6-APA.

Procedimiento.

1. De la solución problema tomar 0.1 ml y depositarlos en tubos de centrifuga, que contienen 2.4 ml de alcohol etílico absoluto.
2. Adicionar 1.25 ml del reactivo de p-dimetilamino benzaldehido a cada tubo y agitar, contando 15 minutos desde el momento de adicionar el reactivo.
3. Centrifugar a 4800 rpm durante 10 minutos.
4. A los 15 minutos de reacción, se lee en el espectrofotómetro a 415 nm, empleando como blanco de reactivos 0.1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.8.
5. Calcular la concentración de 6-APA por interpolación en la curva de calibración.

La curva de calibración se prepara realizando 5 diluciones 1:1 de una solución patrón que contiene 2.5 mg/ml de 6-APA en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.8, de las cuales se toman 0.1 ml para realizar la determinación de 6-APA por el procedimiento descrito.

La concentración de 6-APA se determina por la ecuación

$$\frac{(D.O._{415} - b) (1000)}{m \quad PM \text{ 6-APA}} = \mu\text{moles de 6-APA/ml}$$

$D.O._{415}$ = Densidad óptica medida a 415 nm

b = Intercepto de la curva patrón

m = Pendiente de la curva patrón

Peso molecular del 6-APA, 216.28 g/mol.

1000 = factor de conversión de mmoles de 6-APA a μ moles.

Preparacion del reactivo de p-dimetilaminobenzaldehido. Solución al 1% (p/v) en alcohol etílico al 60%, con ácido sulfúrico concentrado al 0.5% (v/v).

INTEGRACION DE LAS ECUACIONES DE LOS MODELOS CINETICOS DE LA PENICILINA
AMIDASA

```

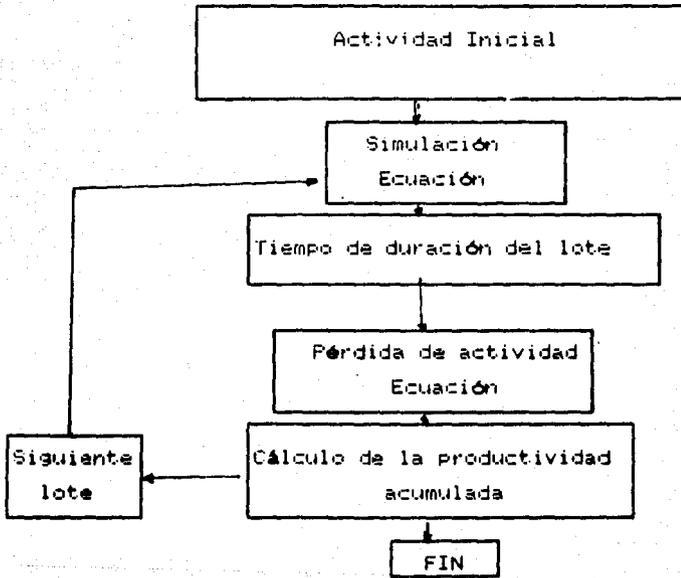
$ 1
1 : Reaccion intermitente. Diversos modelos cineticos
2 : para la enzima penicilina amidasa.
3 CONSTANT VF=0,KF=0,CF=0,F0=0,CS=0,CP=0,SEQ=0
4 CONSTANT CINT=5, T=0, TFIN= 500
5 PRINT "Especifique VF (Vmax mM/min), KF (Km mM), CF "
6 PRINT "(Ki del fenilacetico mM), CP (Ki del 6-APA mM)"
7 PRINT "CS (Ki del sustrato mM), F0 (SO de penicilina, mM)"
8 PRINT "SEQ (Concn. penicilina en equilibrio, mM)"
9 1 RESET
10 INTERACT
11 PRINT "Vmax PGK=",VF
12 PRINT "Km PGK=",KF
13 PRINT "Ki fen=",CF
14 PRINT "Ki 6apa=",CP
15 PRINT "Ks PGK=",CS
16 PRINT "SO PGK=",F0
17 PRINT "SEQ PGK=",SEQ
18 :
19 SIM
20 GO TO 1
21 :
22 INITIAL
23 T=0; F=F0; FI=F0; YI=F0; YX=F0; YZ=F0
24 DYNAMIC
25 :
26 : Michaelis Menten
27 F' = -(VF*F)/(KF+F)
28 XF=(F0-F)/F0
29 :
30 : Inhibicion Competitiva
31 FI' = -(VF*FI)/(FI+(KF*(1+(F0-FI)/CF)))
32 XI=(F0-FI)/F0
33 :
34 : Inhibicion Competitiva y Sustrato
35 YI' = -(VF*YI)/(YI+(KF*(1+(F0-YI)/CF))+(YI*YI/CS))
36 XS = (F0-YI)/F0
37 :
38 : Inhibicion Competitiva, Nocompetitiva y Sustrato
39 P=F0-YX
40 I=F0-YZ
41 S1=1+P/CP
42 R1=1+I/CP
43 S2=1+P/CF+P/CP
44 R3=1+I/CF+I/CP+I*I/(CF*CP)
45 :Modelo II.....Enz. Microb. Technol. 1982,4,35
46 YZ' = -(VF*YZ)/((YZ*R1)+(KF*R3)+(YZ*YZ/CS))
47 X2=(F0-YZ)/F0
48 :Modelo I.....Enz. Microb. Technol. 1982,4,35.
49 YX' = -(VF*YX)/((YX*S1)+(KF*S2)+(YX*YX/CS))
50 XT=(F0-YX)/F0
51 :
52 : tres inhibiciones, correccion por equilibrio
53 XE=(F0*XT-SEQ)/F0
54 X3=(F0*X2-SEQ)/F0
55 :
56 OUTPUT T,XT,XE,X2,X3
57 PREPARE T,XT,XE,X2,X3
$ VAL F0 = 268.00

```

\$ VAL CF	=	68.600
\$ VAL VF	=	12.000
\$ VAL CINT	=	1.0000
\$ VAL CS	=	413.00
\$ VAL CP	=	100.70
\$ VAL SEQ	=	8.2000
\$ VAL P	=	0.00000

ANEXO 3

PROGRAMA DE SIMULACION PARA DETERMINAR LA PRODUCTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA



ANEXO 3

PROGRAMA DE SIMULACION PARA DETERMINAR LA PRODUCTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA

```

$ 1
1 : ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA PENICILINO ACILASA
2 : BASADO EN CINETICA DE DESACTIVACION DE PRIMER ORDEN
3 : DE LA ENZIMA, UN MODELO DE TRIPLE INHIBICION CORREGIDO
4 : POR EL EQUILIBRIO Y REACCIONES EN LOTE.
5 CONSTANT VFO=0, KF=0, CF=0, FO=0, CS=0, CP=0, SEQ=0
6 CONSTANT N=0, TV=0, PD=0, PR=0, VFO=0
7 CONSTANT CINT=5, T=0, TFIN= 500
8 PRINT "Especifique VFO (Vmax mM/min), KF (Km mM), CF "
9 PRINT "(Ki del fenilacetico mM), CP (Ki del 6-APA mM)"
10 PRINT "CS (Ki del sustrato mM), FO (SO de penicilina, mM)"
11 PRINT "SEQ (Concn. penicilina en equilibrio, mM)"
12 PRINT "KD (cte desactivacion 1er orden min-1)"
13 : Para la carga recomendada de catalizador (120U/g pen) y con
14 : la actividad del catalizador GENIN (170 U/gcat) con 95% de
15 : conversion. El rendimiento por lote es de 0.787 g 6apa/g cat. y

16 : la productividad es este valor dividido entre el tiempo de
17 : duracion del lote: R es rendimiento y PR productividad.
18 : PL es la productividad de cada lote, equivalente a 0.787 g
19 : de 6 apa que se producen por lote entre TC, su tiempo de
20 : reaccion.
21 :
22 PRINT "PRO (productividad g 6APA/g cat lote)"
23 N=0
24 PD=0
25 TC=0
26 PL=0
27 TV=0
28 1 RESET
29 INTERACT
30 :
31 20 N=N+1
32 TV=TV+TC
33 VF=VFO*EXP(-KD*TV)
34 IF(N.EQ.1) GOTO 50
35 PD=(60*PRO*(N-1))/TV
36 R=0.787*(N-1)
37 PL=(0.787*60)/TC
38 GO TO 51
39 50 PR=0
40 PL=0
41 R=0
42 51 TAH=TV/60
43 PRINT " " ,

```

```

44 PRINT "Tiempo acumulado (hr)=" ,TAH
45 PRINT "lote #", N-1,"duracion (min)=" ,TC, "Vmax=" ,VF
46 PRINT "Productividad del lote (Kg 6apa/Kg cat*h)=" ,PL
47 PRINT "Productividad acumulada (Kg 6apa/Kg cat*h)=" ,PD
48 PRINT "Rendimiento acumulado (Kg 6apa/Kg cat)=" ,R
49 :
50 :
51 SIM
52 GO TO 1
53 :
54 INITIAL
55 T=0; YZ=F0
56 DYNAMIC
57 : Inhibicion Competitiva, Nocompetitiva y Sustrato
58 I=F0-YZ
59 R1=1+I/CP
60 R3=1+I/CF+I/CP+I*I/(CF*CP)
61 :Modelo II.....Enz. Microb. Technol. 1982,4,35
62 YZ'=- (VF*YZ)/((YZ*R1)+(KF*R3)+(YZ*YZ/CS))
63 X2=(F0-YZ)/F0
64 :
65 :tres inhibiciones, correccion por equilibrio
66 X3=(F0*X2-SEQ)/F0
67 TERMINATE (X3.GT.0.95)
68 TC=T
69 PREPARE T,X3
$ VAL VFO      = 12.000
$ VAL KF       = 4.1700
$ VAL PRO      = 0.78700
$ VAL KD       = 0.10000E-04
$ VAL CP       = 100.70
$ VAL VF       = 12.000
$ VAL CF       = 68.600
$ VAL CS       = 430.00
$ VAL SEQ      = 8.2000
$ VAL F0       = 268.00

```

```

44 PRINT "Tiempo acumulado (hr)=" ,TAH
45 PRINT "lote #", N-1,"duracion (min)=" ,TC, "Vmax=" ,VF
46 PRINT "Productividad del lote (Kg 6apa/Kg cat^h)=" ,PL
47 PRINT "Productividad acumulada (Kg 6apa/Kg cat^h)=" ,PD
48 PRINT "Rendimiento acumulado (Kg 6apa/Kg cat)=" ,R
49 :
50 :
51 SIM
52 GO TO 1
53 :
54 INITIAL
55 T=0; YZ=FO
56 DYNAMIC
57 : Inhibicion Competitiva, Nocompetitiva y Sustrato
58 I=FO-YZ
59 R1=1+I/CP
60 R3=1+I/CF+I/CP+I*I/(CF*CP)
61 :Modelo II.....Enz. Microb. Technol. 1982,4,35
62 YZ'=- (VF*YZ)/((YZ*R1)+(KF*R3)+(YZ*YZ/CS))
63 X2=(FO-YZ)/FO
64 :
65 :tres inhibiciones, correccion por equilibrio
66 X3=(FO*X2-SEQ)/FO
67 TERMINATE (X3.GT.0.95)
68 TC=T
69 PREPARE T,X3
$ VAL VFO      = 12.000
$ VAL KF       = 4.1700
$ VAL PRO     = 0.78700
$ VAL KD      = 0.10000E-04
$ VAL CP      = 100.70
$ VAL VF      = 12.000
$ VAL CF      = 68.600
$ VAL CS      = 430.00
$ VAL SEQ     = 8.2000
$ VAL FO      = 268.00

```