

03072

13
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DISEÑO Y CARACTERIZACION DE UN BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA

T E S I S

Que para obtener el título de:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

Ma. Elena Rodríguez Alegria

TESIS CON
FALLA LE 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.

NOMENCLATURA

6-APA	ácido 6-amino-penicilánico
AFA	ácido fenilacético
PGK	penicilina G potásica
UV	luz ultravioleta
P/P	peso/peso
p.h.	peso humedo
g	gramo
Kg	kilogramo
U	unidad
μ mol	micromoles
mg	miligramos
ml	mililitros
l	litros
°C	grados centígrados
°K	grados Kelvin
ATCC	American Type Culture Collection
PA	penicilino amidasa
η	factor de efectividad
mM	milimolar
Km	constante de Michaelis Menten
Ks	constante de inhibición por exceso de sustrato
K ₆ -APA	constante de inhibición por 6-APA
K _{AFA}	constante de inhibición por AFA
V _{máx.}	velocidad máxima
cal.	calorias
p.s.	peso seco
tons.	toneladas
et al	y colaboradores
rpm	revoluciones por minuto

INDICE

	pág.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	8
III. GENERALIDADES	9
Producción de 6-APA	9
Sustratos	9
Enzima penicilino amidasa	11
-Clasificación de la PA	11
-Características y propiedades de PA de <i>E. coli</i>	11
-Perfil de sustrato de la PA de <i>E. coli</i>	19
-Producción de PA	23
-Mejoramiento de cepas	24
-Ingeniería de proteínas	26
-Inmovilización de células por atrapamiento	26
Producción de biocatalizadores de PA	31
Condiciones de operación de biocatalizadores de PA	35
IV. METODOS Y MATERIALES	40
Materiales	40
Métodos	40
-Método de inmovilización	40
-Proceso de curtido	40
-Aspectos de la manufactura del biocatalizador	43
-Actividad enzimática	43
-Determinación de actividad proteolítica	43
-Factor de efectividad	43
-Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador	44
-Efecto del pH en la actividad del biocatalizador	44
-Efecto de la temperatura en la estabilidad de células libres y biocatalizador	44
-Efecto del pH en la estabilidad del bicatalizador	44
-Estabilidad operacional	44
-Determinación de las constantes cinéticas	44

	pág.
-Reacciones de hidrólisis	45
Definición de algunos parámetros mencionados a lo largo del manuscrito.	45
V. RESULTADOS	47
Diseño del biocatalizador	47
Elección del soporte	51
Aspectos del sistema a inmovilizar	54
Estudio para la selección del tamaño de partícula	54
Selección de las condiciones de agitación	62
Caracterización del biocatalizador	69
Caracterización fisicoquímica	69
Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador	69
Efecto del pH en la actividad del biocatalizador	69
Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador	75
Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador	75
Estabilidad operacional del biocatalizador	79
Caracterización cinética	83
Determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$	83
Determinación de K_s	83
Determinación de la K_{IAFA}	83
Determinación de la K_{IG-APA}	83
Aplicación del biocatalizador	88
Hidrólisis de penicilina por el biocatalizador	88
Análisis económico del biocatalizador diseñado	93
Extracción de PA por choque osmótico	94
VI. CONCLUSIONES	97
VII. RECOMENDACIONES	99
VIII. BIBLIOGRAFIA	100
IX. ANEXOS	107
Anexo I. Artículo "Design of two immobilized cell catalyst by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects.	107

Anexo II. Artículo "Penicillin acylase extraction by osmotic shock.	pág. 114
Anexo III. Estimación preliminar del costo del biocatalizador.	121
Anexo IV. Integración de las ecuaciones de los modelos cinéticos de la penicilino amidasa en reactor tanque agitado por lotes.	122

INDICE DE FIGURAS.

	pág.
Figura 1. Hidrólisis química de la penicilina para la obtención de 6-APA.	3
Figura 2. Estrategia global del proyecto.	7
Figura 3. Estructura básica de las penicilinas (a) y cefalosporinas (b).	10
Figura 4. Esquema de acción de la PA sobre la penicilina G.	16
Figura 5. Mecanismos de reacción y ecuaciones cinéticas descritas para PA.	21
Figura 6. Metodología de inmovilización por dispersión líquido-líquido.	41
Figura 7. Características del sistema para definir la velocidad de agitación en la manufactura del biocatalizador.	42
Figura 8. Sistema de reacción para la hidrólisis de penicilina G.	46
Figura 9. Dispositivo empleado para la inmovilización de células de <i>E. coli</i> por atomización a nivel laboratorio.	48
Figura 10. Dispositivo empleado para la inmovilización de células de <i>E. coli</i> por atomización a mayor nivel.	49
Figura 11. Actividad del biocatalizador en función de la relación células/gelatina (p/p), para un tamaño de partícula de 0.297 mm.	52
Figura 12. Efecto del pH en la estabilidad de la enzima contenida en células de <i>E. coli</i> a 55 °C. Las células resuspendidas en amortiguador de fosfatos pH 6, 6.5 y 7.5 en baño agitado y se determina actividad a los diferentes tiempos a 37 °C, pH 7.8.	56
Figura 13. Actividad del biocatalizador en función de la relación células/agar (p/p) para diferentes tamaños de partícula.	58
Figura 14. Actividad del biocatalizador en función del tamaño de partícula para diferentes relaciones células/agar (p/p).	59
Figura 15. Factor de efectividad en función del tamaño de partícula para diferentes relaciones células/agar (p/p).	60

- Figura 16. Factor de efectividad en función de la relación células/agar (p/p) para diferentes tamaños de partícula. 61
- Figura 17. Distribución del tamaño de partícula en función de la velocidad de agitación para el impulsor A-310. Temperatura de inmovilización 42 °C, relación células/agar (g/g) 8.25. 63
- Figura 18. Distribución del tamaño de partícula en función de la velocidad de agitación para el impulsor Rushton. Temperatura de inmovilización 42 °C, relación células/agar 8.25. 64
- Figura 19. Efecto del número de lotes de reutilización del biocatalizador de penicilino amidasa en el costo de producción del 6-APA para una actividad de 10 U/g de bioc., a diferentes estimaciones del costo del biocatalizador. 66
- Figura 20. Efecto de la actividad inicial del biocatalizador en el número de lotes de reutilización necesarios para obtener el precio de venta del 6-APA (80 dólares), a diferentes costos del biocatalizador. 67
- Figura 21. Metodología de inmovilización propuesta. 68
- Figura 22. Efecto de la concentración inicial de PGK en el factor de efectividad, para el biocatalizador de PA malla 50. 70
- Figura 23. Efecto de la temperatura en actividad del sistema libre (recuadro) e inmovilizado. Se determinó actividad en amortiguador de fosfatos 0.1M a los diferentes pHs y temperaturas en baño agitado. Las determinaciones se realizaron por duplicado, en la grafica se muestra el promedio de las determinaciones. 71
- Figura 24. Energía de activación para la hidrólisis de bencil penicilina del sistema inmovilizado y libre (recuadro). Las determinaciones se realizaron a pH 7.8 en amortiguador de fosfatos. 72
- Figura 25. Efecto del pH en actividad del sistema inmovilizado y libre (recuadro) a 37 y 55 °C. Se determino actividad en amortiguador de fosfatos 0.1M a los diferentes pHs y temperaturas en baño agitado. 73
- Figura 26. Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador a 37 y 55 °C (recuadro). El biocatalizador se incubo en amortiguador de fosfatos 0.1M a los diferentes pHs temperaturas, en baño agitado y se determinó actividad a pH 7.8 y 37 °C. 76

	pág.
Figura 27. Representación de gráfica para la determinación del tiempo de vida media del biocatalizador. Se determino actividad por duplicado a pH 7.8, 37 °C.	77
Figura 28. Efecto del pH en el tiempo de vida media del biocatalizador.	80
Figura 29. Efecto integral de la actividad y estabilidad del biocatalizador.	81
Figura 30. Estabilidad operacional del biocatalizador. Tiempo de reacción 2 hrs, 37 °C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 6% PGK.	82
Figura 31. Representación de Linewaver-Burk para la determinación de la Km.	84
Figura 32. Efecto de la concentración de penicilina en la velocidad inicial de la penicilino amidasa.	85
Figura 33. Representación grafica para la determinación de la constante de inhibición por exceso de sustrato.	86
Figura 34. Representación de Linewaver-Burk para la determinación del la constante de inhibición por AFA.	87
Figura 35. Representación grafica para la determinación de la constante de inhibición por 6-APA.	89
Figura 36. Cinéticas de hidrólisis para diferentes concentraciones de penicilina, utilizando células inmovilizadas como biocatalizador, se empleó una concentración de enzima de 3.4 U/ml. Se muestran los datos experimentales (puntos) y los que predice el modelo de triple inhibición modificado y corregido por equilibrio (líneas).	90
Figura 37. Cinéticas de hidrólisis para diferentes concentraciones de penicilina, utilizando células inmovilizadas como biocatalizador, se empleo una carga constante de enzima de 60 U/g de penicilina. Se muestran los datos experimentales (puntos) y los que predice el modelo de triple inhibición modificado y corregido por equilibrio (líneas).	91
Figura 38. Efecto del número de lotes de reutilización del biocatalizador de PA en el costo de producción del 6-APA a diferentes actividades específicas del biocatalizador.	95
Figura 39. Número de lotes requeridos para obtener el precio de venta del 6-APA (80 dól./Kg), en función de las actividad específica del biocatalizador, a diferentes costos relativos de la producción de las células (considerando a la unidad como el costo de producción de la cepa silvestre)	96

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Principales productores de 6-APA, tipo de proceso y materia prima empleada.	5
Tabla 2. Producción, uso y demanda de las penicilinas.	12
Tabla 3. Microorganismos que producen penicilino amidasa.	13
Tabla 4. Algunos microorganismos productores de PA utilizados por compañías productoras de 6-APA.	15
Tabla 5. Tabla comparativa de la estabilidad de la PA de <i>E. coli</i> y <i>K. citrophila</i> .	18
Tabla 6. Constantes cinéticas de la PA.	20
Tabla 7. Perfil de sustrato para PA.	22
Tabla 8. Cepas con actividad PA desarrolladas por Ingeniería Genética.	27
Tabla 9. Diferentes formas de inmovilización por atrapamiento.	28
Tabla 10. Métodos de inmovilización empleados para PA.	32
Tabla 11. Características de los biocatalizadores de PA de células completas.	33
Tabla 12. Características operacionales de biocatalizadores de células inmovilizadas.	38
Tabla 13. Comparación de los métodos: atomización y dispersión líquido-líquido para la inmovilización de células por atrapamiento.	50
Tabla 14. Resultados de la determinación de actividad proteolítica de células de <i>E. coli</i> ATCC 9637.	53
Tabla 15. Selección del soporte.	55
Tabla 16. Valores de pH, temperatura y E_a para penicilino amidasa.	74
Tabla 17. Efecto de la temperatura en el tiempo de vida media del biocatalizador.	78

RESUMEN

México cuenta con un biocatalizador de penicilino amidasa (PA) competitivo con los ya existentes a nivel internacional, fabricado por inmovilización de enzima parcialmente pura de *E. coli*, a un soporte epóxico, por lo que el costo del biocatalizador resulta ser relativamente alto. Evitar el paso de purificación inmovilizando a la célula como tal, disminuiría notablemente el costo del biocatalizador. No obstante, para obtener un biocatalizador de células inmovilizadas competitivo es necesario contar con una cepa de alta actividad específica, una metodología de inmovilización de células adecuada, alta eficiencia en la expresión enzimática, fácil de escalar, de bajo costo y un diseño óptimo del sistema de reacción.

Así, el objetivo de este trabajo es contribuir a mejorar la tecnología enzimática con que se cuenta en estos momentos para la hidrólisis de penicilina, en dos aspectos: uno global y otro parcial. En el mejoramiento global se diseñó un biocatalizador con actividad penicilino amidasa, empleando células completas de *E. coli*. El catalizador obtenido cuenta con adecuadas propiedades mecánicas, alta eficiencia catalítica, susceptibilidad de escalamiento. En el mejoramiento parcial se disminuyeron los pasos de purificación a que se sujeta la enzima, para elaborar el catalizador con la enzima inmovilizada. Se propone el choque osmótico como una alternativa a la ruptura mecánica de la célula.

Para la primera etapa, la técnica de inmovilización seleccionada fue el atrapamiento en gel. Se utilizó un sistema de dos fases basado en la dispersión de la suspensión células-gel (fase acuosa) en aceite (fase hidrofóbica). Para ello se probaron diferentes biopolímeros: gelatina, carragenina y agar. En base a la capacidad de atrapamiento, estabilidad y manejo, la mejor opción resultó ser el agar, con una relación células/agar de 8.25 g/g.

Se establecieron las condiciones de producción de biocatalizador a nivel de 225 ml de suspensión células/agar, obteniendo un rendimiento de inmovilización total de 90-95%, con la siguiente distribución de tamaño de partícula malla 200: 4.5%, malla 80: 15%, malla 50: 44.5%, malla 40: 29.5% y malla 30: 6.2%.

El biocatalizador se caracterizó en términos del factor de efectividad (η), determinando su dependencia con el tamaño de partícula y concentración de sustrato. Se encontró que los tamaños de partícula correspondientes a la malla 50 y 80, no presentan problemas difusionales ($\eta > 0.9$), y que a concentraciones mayores de 10 g/l de PGK η es 1. Este mismo estudio se realizó para el biocatalizador manufacturado con gelatina, para dos tamaños de partícula. Estos resultados se discuten en el artículo *Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects*, publicado en la revista *Enzyme Microb.*

Technol., vol. 13: 127-133 1991. (Anexo 1)

Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del biocatalizador, determinando que la temperatura y pH óptimos son: 55 a 60°C y 7.8-9 respectivamente, la energía de activación fue de 9474.5 cal/mol. Las condiciones de estabilidad óptimas resultaron ser 37°C y pH 6. Se observó que la desactivación sigue una cinética de primer orden.

Se determinó que después de 40 hidrólisis en reactor tanque agitado por lotes, el biocatalizador retiene 85% de su actividad inicial.

La caracterización cinética de la enzima se realizó en células completas de *E. coli*. Presenta una cinética de Michaelis Menten con un K_m de 12 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de 6.7 U/g de células (p.s), presenta inhibiciones competitiva por ácido fenilacético (AFA) K_{IAFA} de 51.55 mM, no competitiva por ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) K_{IG-APA} de 234.3 mM, así como por exceso de sustrato con un K_a de 459 mM.

El biocatalizador obtenido se utilizó para llevar cabo hidrólisis de penicilina en un reactor tanque agitado por lote. Se observó que el modelo de triple inhibición modificado con corrección por equilibrio describe adecuadamente la reacción de hidrólisis de la penicilina.

Se efectuó un análisis económico preliminar del proceso de producción del biocatalizador con el fin de determinar la factibilidad económica y perspectivas del biocatalizador. Del cual se desprende que para que el biocatalizador tenga factibilidad económica es necesario que tenga actividades superiores a 40 U/g, lo cual significa que las células de *E. coli* deberán tener al menos 270 U/g de células secas.

Por otro lado, se probó y optimizó el método de extracción de PA por choque osmótico con sacarosa. Se determinó que es una buena alternativa para sustituir a la ruptura mecánica, ya que además de ser menos drástica disminuye los pasos de purificación. Estos resultados se presentan en el artículo Penicillin acylase extraction by osmotic shock, anexo II, aceptado para su publicación en la revista *Process Biochemistry*.

I. INTRODUCCION

Los antibióticos son un grupo heterógeno de moléculas biológicamente activas de diversas estructuras capaces de inhibir el crecimiento o destruir selectivamente en bajas concentraciones células humanas, animales de plantas o microbianas (Demain, 1975)

Los antibióticos son utilizados terapéuticamente y en algunas ocasiones profilácticamente en el control de enfermedades infecciosas, y constituyen uno de los sectores mas importantes dentro de la industria farmacéutica.

En la industria de los antibióticos, los β -lactámicos son sin lugar a dudas los mas importantes, ya que representan alrededor del 60% de la producción total de antibióticos (Klyosov, 1989).

El grupo de los antibióticos β -lactámicos esta representado por las penicilinas y cefalosporinas. La penicilina desde su introducción en el campo terapéutico durante la segunda guerra mundial continúa siendo el antibiótico mas utilizado en el mundo. Sin embargo, su aplicación directa como penicilinas naturales, (penicilina G y V) es limitada debido a que la gran mayoría de microorganismos causantes de las principales infecciones son resistentes por un fenómeno denominado "resistencia bacteriana". Esta resistencia es ocasionada por la presencia de la enzima β -lactamasa, capaz de romper el grupo funcional de las penicilinas, transformándola en un compuesto inactivo.

Esta situación llevó a los investigadores a descubrir que la modificación de la cadena lateral de las penicilinas naturales, les conferia resistencia al ataque de la enzima β -lactamasa y adicionalmente incrementaban su actividad intrínseca y espectro de acción.

La modificación química de las penicilinas consiste básicamente en remover la cadena lateral. De esta manera se obtiene su núcleo estructural, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), del cual, con la adición de una cadena lateral adecuada da lugar a las penicilinas modificadas denominadas "penicilinas semisintéticas".

Las penicilinas semisintéticas actualmente son los antibióticos más baratos y efectivos en el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas. Aún con el surgimiento de las cefalosporinas, las penicilinas semisintéticas siguen dominando el mercado de los antibióticos principalmente por el elevado costo de las primeras. Adicionalmente la adición de ácido clavulónico a las penicilinas semisintéticas, potente inhibidor de β -lactamasas, ha permitido que estas recuperen y amplifiquen su intervalo de actividad.

El 6-APA es la materia prima para la producción de las penicilinas semisintéticas. Se obtenía inicialmente por proceso fermentativo (Batchelor, 1959). Sin embargo, dados los bajos rendimientos y la dificultad en su separación y purificación, este proceso resultó obsoleto siendo sustituido por hidrólisis vía química o enzimática de penicilina G o V. La hidrólisis química de las penicilinas naturales (fig. 1) para la producción de 6-APA consta de 4 pasos:

- 1.-Sililación
- 2.-tratamiento de los sililesteres con PCl₅ y piridina para formar un intermediario de cloruro de imino (-50°C).
- 3.-adición de un alcohol al intermediario imino ester (-50°C).
- 4.-Adición de agua para efectuar la hidrólisis a 6-APA (-20°C).

Como se observa, en este proceso se requiere de compuestos tóxicos y difíciles de manejar como son los silanos y el PCl₅. Las condiciones de temperatura son extremas y la recuperación de los disolventes resulta incosteable (Queener y Swartz, 1976).

Por otro lado, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo con la enzima penicilino amidasa (PA) generalmente inmovilizada, en un solo paso. Para el efecto, es necesario poner en contacto a la enzima con su sustrato en un intervalo de temperatura de 35-40°C, y de pH de 7-8, condiciones radicalmente mas suaves que las empleadas en el proceso químico.

Adicionalmente la hidrólisis enzimática presenta las siguientes ventajas con respecto a la hidrólisis química:

- dada la alta especificidad de las enzimas, este proceso solo permite la catálisis de un solo tipo de reacción, evitando así la producción de compuestos indeseables ocasionadas por reacciones colaterales inespecíficas, dadas en el proceso químico;
- las condiciones de operación relativamente suaves disminuyen los consumos energéticos y el empleo de equipos especiales para soportar condiciones extremas y finalmente;
- los problemas de contaminación se minimizan.

Por lo expuesto anteriormente, resulta evidente que la hidrólisis por vía enzimática resulta mas conveniente para el proceso. Esto se hace patente en los datos presentados en la tabla 1 donde se observa que los principales productores de 6-APA en 1985, ya usaban la vía enzimática. El mercado de la penicilino amidasa continua aumentando, ya que se ha estimado que de las 4 200 tons. de 6-APA producidas en 1985, el mercado se expandirá a 5200 tons. en 1990 y a 7000 tons. para 1991, produciendo principalmente ampicilina (56%) y amoxicilina (27%) (Barber, 1987).

Una de las primeras aplicaciones de la tecnología enzimática

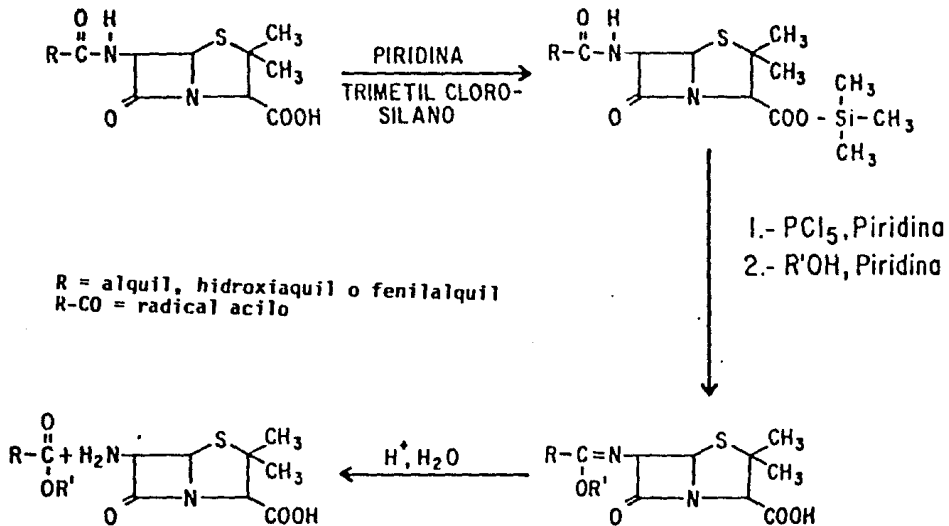


Figura 1. Hidrólisis química de la penicilina para la obtención de 6-APA.

a nivel comercial fue el proceso de producción de 6-APA. Por esta razón actualmente existen en el mundo muchas compañías que producen 6-APA (tabla 1). No obstante, los detalles específicos de producción son celosamente guardados por las diferentes compañías. Sin embargo, los principios generales tienen muchos puntos de similitud, difieren generalmente en las cepas utilizadas, en la composición de los medios utilizados, en el proceso de inmovilización de la enzima o de las células. Actualmente la economía de la producción de 6-APA se concentra fuertemente en la reducción de costos de proceso.

El precio de venta del 6-APA (80 dólares/Kg) es muy cercano al costo de producción ya que el precio de la penicilina es de 30 dólares/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. El costo de producción de 6-APA por vía química es de 10-12 dólares/Kg de 6-APA, mientras que por vía enzimática es de 3-4 dólares/Kg y si el mismo productor fabrica también la enzima este costo se reduce a solo 1 dólar/kg. 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 y del biocatalizador. Esto explica porque Bayer y Beecham son los principales productores de penicilina y de 6-APA a nivel mundial.

México cuenta con una tecnología para producir un biocatalizador de penicilino amidasa, competitivo con los biocatalizadores existentes a nivel industrial en el mundo. El proceso fue desarrollado entre el Instituto de Biotecnología y la empresa Genín S.A. de C.V. y ha sido escalado y transferido. En este proceso la enzima utilizada se obtiene de *E. coli* silvestre. Por esta razón para obtener el biocatalizador es necesario purificar la enzima y posteriormente inmovilizarla en un soporte que permita obtener altos rendimientos de inmovilización y que asegure su reutilización en un alto número de hidrólisis. La necesidad de purificar la enzima, el método de inmovilización y el soporte, hacen que el costo del biocatalizador resulte relativamente alto. Si se evitará el paso de recuperación y purificación de la enzima y se inmovilizará la célula como tal, el costo del biocatalizador se disminuiría notablemente. Igualmente, contribuciones tendientes a mejorar el proceso de purificación e inmovilización redundarían en un beneficio directo.

Para obtener un biocatalizador de células inmovilizadas competitivo con el de enzima inmovilizada es necesario considerar las siguientes estrategias:

- *El desarrollo de cepas con alta actividad específica,
- *El desarrollo de técnicas de inmovilización de células que proporcionen partículas con propiedades mecánicas adecuadas, alta eficiencia en la expresión enzimática (para hacer el mejor uso de su alta actividad específica), método simple, fácil de escalar y económico.

Tabla 1. Principales productores de 6-APA, tipo de proceso y materia prima empleadas (Barber, 1987).

Compañía	Producción para 1985 (Tons)	Proceso	Materia prima
Bayer	800	enzimático	penicilina G
Beecham	640	enzimático	penicilina G
Bristol	620	enzimático	penicilina V
Fermenta	500	enzimático	penicilina V
Antibióticos	480	enzimático	penicilina G
Biochimie	150	enzimático	penicilina V
Hoechst	150	enzimático	penicilina G
Fako	100	químico	penicilina G
otros	660	químico/enzimático.	penicilina G y V

*Estudios cinéticos con el fin de seleccionar el reactor mas apropiado, incluyendo la identificación y el control de las variables críticas.

Es evidente que para poder aplicar estas estrategias se requiere de un grupo interdisciplinario de científicos en las siguientes áreas:

1. *Biología molecular, para el desarrollo de cepas hiperproductoras

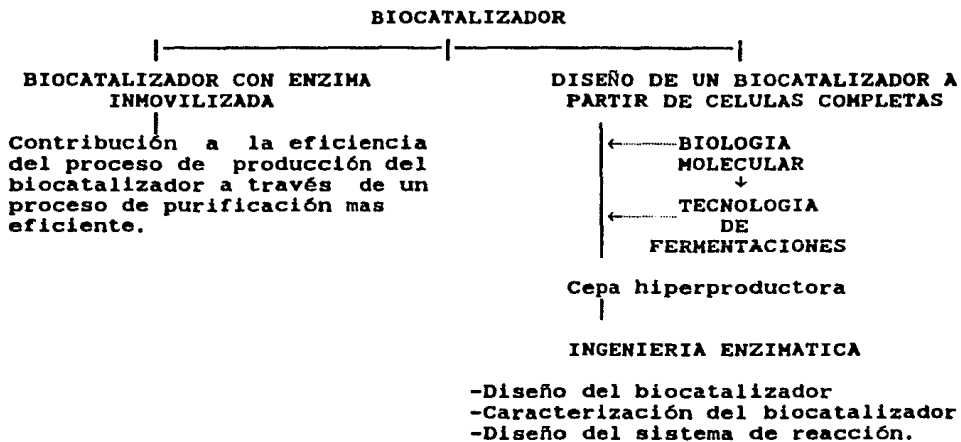
2. *Tecnología de fermentaciones, conservación de las cepas hiperproductoras y optimización de su producción en fermentadores.

3. *Ingeniería enzimática, para el desarrollo del biocatalizador y su uso óptimo.

4. *Ingeniería de proteínas, la cual puede contribuir a obtener enzimas con características "ad hoc" al proceso.

El objetivo de este trabajo es contribuir a un proyecto global del Instituto de Biotecnología sobre penicilino amidasa, en dos aspectos: producción de un biocatalizador de células con propiedades mecánicas adecuadas y alta eficiencia catalítica, así como la realización de estudios cinéticos y aplicación del biocatalizador en la hidrólisis de penicilina G. Por otro lado, mejorar parcialmente el proceso de producción del catalizador disponible actualmente, al disminuir los pasos de purificación de la enzima, proponiendo el choque osmótico como una alternativa a la ruptura mecánica de la célula. La estrategia se plantea en la figura 2.

Figura 2. Estrategia global del proyecto



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GLOBAL.

El objetivo de este trabajo es contribuir a mejorar la tecnología con que se cuenta actualmente, en dos aspectos: por un lado diseñar un biocatalizador con actividad penicilino amidasa empleando células de *E. coli*, con propiedades mecánicas adecuadas, alta eficiencia catalítica, susceptible de ser escalado y mas barato. Por otro lado se pretende mejorar parcialmente el proceso de producción del biocatalizador con enzima inmovilizada al disminuir los pasos de purificación de la enzima, proponiendo el choque osmótico como una alternativa a la ruptura mecánica de la célula.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Selección del soporte y condiciones de inmovilización.
- Caracterización fisicoquímica y cinética del biocatalizador
- Aplicación del biocatalizador.
- Optimización del método de extracción por choque osmótico de penicilino amidasa de *E. coli*.

III. GENERALIDADES.

Producción de 6-APA.

Se entiende por una reacción enzimática la transformación de uno o mas sustratos en productos por medio de una enzima que actúa como biocatalizador. En toda reacción enzimática es posible establecer condiciones de reacción óptimas para lograr altos rendimientos en el menor tiempo posible y, en el caso de utilizar la enzima inmovilizada, una vida operacional alta. En el caso específico de producción de 6-APA vía enzimática los sustratos pueden ser penicilina G ó penicilina V, la enzima es la penicilino amidasa, que para efectos del proceso puede constituir un biocatalizador de diversas características: enzima soluble o inmovilizada, o bien células libres o inmovilizadas.

En la producción de 6-APA, vía enzimática se pueden distinguir tres aspectos fundamentales: los sustratos (penicilina G o V), la enzima (penicilino amidasa) y las condiciones de reacción. A continuación se describirán estos aspectos haciendo énfasis en los dos últimos puntos.

Sustratos

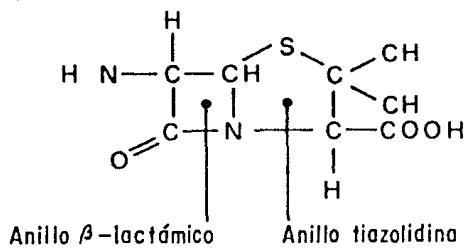
-Penicilinas

Las penicilinas pertenecen al grupo de los antibióticos β -lactámicos, el cual está comprendido por las penicilinas y cefalosporinas. Sus estructuras son similares pero difieren en que las primeras contienen un anillo β -lactama tiazolidina pentagonal en lugar del anillo β -lactama dihidrotiazina hexagonal de las últimas (fig. 3). Su biosíntesis se lleva a cabo por un grupo reducido de microorganismos, todos ellos filamentosos pero no relacionados taxonómicamente: algunos son hongos (eucariotes) y otros bacterias (procariotes) (Flynn, 1972).

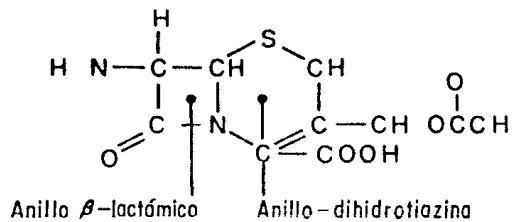
Las especies productoras mas comunes son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* y *Streptomyces*, aunque las principales especies involucradas son básicamente *Penicillium* y *Cephalosporium*.

La síntesis de penicilinas específicas se lleva a cabo por la adición de la cadena lateral precursora al medio de cultivo, tal es el caso de la penicilinas G y V que se producen al adicionar ácido fenilacético ó fenoxiacético como precursores respectivamente. Durante la fermentación de esta especie de microorganismos se acumula 6-APA, especialmente en ausencia de precursores.

La aplicación de las penicilinas como agentes terapéuticos se extendió durante la segunda guerra mundial por una cooperativa Anglo Americana (Flynn, 1972). El avance de esta empresa estuvo dado por tres factores principalmente: la obtención del *Penicillium* sobreproductor, el descubrimiento de la estructura de las penicilinas para lograr el establecimiento de las condiciones de recuperación y purificación y el desarrollo del proceso a gran escala.



(A)



(B)

Figurá 3. Estructuras de las penicilinas (A) y cefalosporinas (B)

Las penicilinas G y V han llegado a convertirse en agentes importantes tanto terapéuticamente así como por ser materia prima para la producción de penicilinas semisintéticas. Esta última opción cubre la mayor parte del mercado y de la demanda futura (tabla 2).

Enzima penicilino amidasa.

Clasificación y microorganismos productores.

La enzima penicilino amidasa es conocida como: penicilino amido hidrolasa, penicilino acil transferasa, penicilino amidasa, penicilino acilasa (Hamilton, 1966). La comisión de enzimas le ha otorgado la clasificación E.C. 3.5.1.11.

Las penicilino amidasas se pueden clasificar en base al tipo de microorganismo que las sintetiza (Claridge, 1963), o bien al tipo de penicilina que preferencialmente hidrolizan (Vandamme y Voets, 1974). De acuerdo a esta última clasificación de dividen en:

- I. fenoximetilpenicilino (penicilino V) amidasas,
- II. bencilpenicilino (penicilino G) amidasas y
- III. D- α -aminobencilpenicilino (ampicilino) amidasas.

La enzima del tipo I hidroliza preferencialmente penicilina V, la del tipo II penicilina G y la del tipo III ampicilina. Las penicilino V amidasas son producidas principalmente por hongos, las penicilino G amidasas por bacterias y las ampicilino amidasas por algunas especies de *Pseudomonas*.

En la tabla 3 se presentan microorganismos productores de la enzima y en la tabla 4 algunos microorganismos utilizados por compañías productoras de 6-APA.

La enzima utilizada en este trabajo pertenece al tipo II, específicamente de *E. coli* ATCC 9637. Por este motivo se describirán en particular las características y propiedades de esta enzima.

Características y propiedades de la penicilino amidasa de *E. coli*.

La enzima cataliza la reacción de hidrólisis de la bencilpenicilina, obteniéndose como productos de reacción los ácidos 6-aminopenicilánico y fenilacético (fig. 4).

La penicilino amidasa de *E. coli*, se encuentra localizada en el espacio periplásmico. Tiene un peso molecular de $71\ 000 \pm 2000$ daltones determinado por sedimentación (Cole, 1975) y de 70 000 daltones por filtración en gel (Kutzbach, 1974). No obstante muchos investigadores que han reportado su comportamiento electroforético en geles de poliacrilamida-SDS han determinado que la enzima esta compuesta por dos subunidades: una pequeña (α) y una grande (β), con un peso molecular de 20,500 a 25,000 daltones y 62,000 a 70,000 daltones respectivamente.

Tabla 2. Producción, uso y demanda de penicilinas (Barber, 1987)

	Penicilina G	Penicilina V	Total
Porcentaje (%)	75	25	100
demanda (tons para 1985)	11 200	3 800	15 000
millones de dólares	430	180	610
uso en producción de penc. semist. (ton)	--	--	11 500
uso en terapia de humanos y animales	1 750	750	2 500
uso en alimentos animales	1 000	--	1 000
proyección de la demanda para 1990	13 000	4 700	17 400
2000	17 000	5 700	22 700

Tabla 3. Microorganismos que producen penicilino amidasa
(Vandamme, 1981).

<u>Bencil penicilino amidasa</u>	<u>* fenoximetil penicilino amidasa</u>
<u>Bacterias</u>	<u>Hongos</u>
<u>Rhodopseudomonas spheroides</u> K.Y. 4112	<u>Penicillium chrysogenum</u> Q 176
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> K.Y. 3591 K.Y. 8501	<u>Penicillium chrysogenum</u> A-9342
<u>Pseudomonas cruciatae</u> K.Y. 3960	<u>Penicillium chrysogenum</u> S.C-6481
<u>Pseudomonas</u> sp.	<u>Emmenthospora minuta</u> (Stolk) I.M.I-69015
<u>Zanthomonas</u> sp.	<u>Cephalosporium</u> C.M.T. 49137
<u>Alcaligenes faecalis</u> A-9424	<u>Cephalosporium acremonium</u> A.T.C.C. 11550
<u>Alcaligenes faecalis</u> B.R.L. 1237, 1238	<u>Aspergillus niger</u>
<u>Bacterium faecalis alcaligenes</u> 415	<u>Aspergillus ochraceus</u> B.R.L. 731
<u>Ischermichia coli</u> sp.	<u>Phlebotomus</u> B.R.L. 623 B.R.L. 722
<u>Ischermichia coli</u> N.Y. 1/3-67	<u>Trichoderma</u> spp.
<u>Ischermichia coli</u> N.C.I.B. 9465	<u>Battilyticinera</u>
<u>Ischermichia coli</u> ATCC 9637 (N.C.I.B. 8666)	<u>Funarium aculeatum</u>
<u>Ischermichia coli</u> ATCC 11105 (N.C.I.B. 8878)	<u>Levulinas</u>
<u>Kluyvera citrophila</u> K.Y. 3461, P.L.-10, P.L.21	<u>Trichoderma</u> , <u>Zygasaccharomyces</u> , <u>Debaryomyces</u>
<u>Irwina</u> sp.	<u>Trichosporon</u> spp.
<u>Serpella</u> sp.	<u>Hongos</u>
<u>Hongos</u>	<u>Bacterias</u>
<u>Neurospora</u> F.S.C. 987, D.G.C. 757	<u>Irwina arceidiae</u> R.R.R.I. B-138
K.I. 424 K.W.B. 622 F.C.S.C. 262. 3a6A	<u>Aerobacter</u> sp. B.R.L. 1755
	<u>Microcococcus</u> ureae

D- a aminobencilpenicilino amidasa

Pseudomonas melanogenum K. Y. 3987

K. Y. 4030, K. Y. 4031

Pseudomonas ovalis K. Y. 3962

Tabla 4. Algunos microorganismos productores de PA utilizados por compañías productoras de 6-APA (Savidge, 1984).

Compañía	Microorganismo	Tipo de enzima
Bayer	<i>E. coli</i> ATCC 11105 y 9637	I
Beecham	<i>Streptomyces lewendulae</i>	II
Squibb	<i>Bacillus megaterium</i>	I
Pfizer	<i>Proteus rettgeri</i>	I
Eli Lilly	<i>Actinoplanes sp</i>	II
Biochemie	<i>Bobista plumbea</i>	II
Kyowa Hakko	<i>Kluyvera citrophila</i>	I
Novo	bacillus gram negativos	II

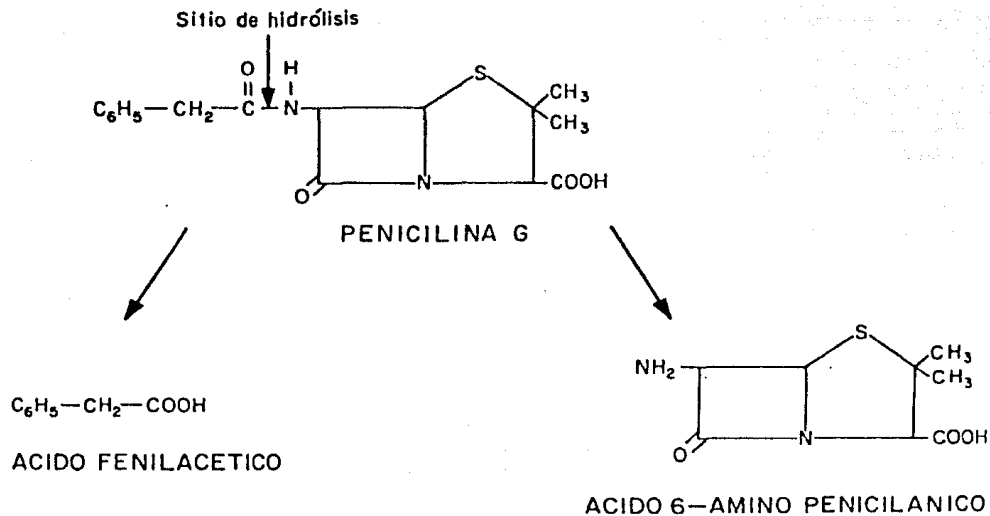


Figura 4. Esquema de acción de la PA sobre la penicilina G.

Los puntos isoelectrónicos de la penicilino amidasa de *E. coli* 11105 reportados por Kutzbach (1974), fueron de 6.7-6.8 y 6.3-6.4 y para la enzima de *E. coli* ATCC 9637 de 7.4 (Daumy, 1985).

Bruns et al., (1985) es sus estudios concluye que las dos subunidades que conforman a la penicilino amidasa de *E. coli* se producen a partir de un precursor de mayor peso molecular (90 000 daltones), durante la secreción de la enzima. Este tipo de procesamiento es muy común en enzimas producidas por eucariotes y hormonas, parece ser el único para proteínas procaríóticas. Es importante mencionar que los precursores por separado no presentan actividad penicilino amidasa.

Daumy et al., (1985), reportan que la penicilino amidasa de *P. rettgeri*, también esta constituida por dos subunidades de diferente peso molecular y que el sitio catalítico reside en la subunidad grande, mientras que subunidad pequeña confiere especificidad a la enzima.

En lo que se refiere a la temperatura y pH óptimos de la enzima para la hidrólisis de bencilpenicilina se encuentran entre 50 y 55 °C y pH de 8⁻ 0.5 (Balansingham y Waburton, 1972). El valor de la energía de activación para enzima y células se encuentra entre 8500 a 14000 cal/ mol. Debido a la inestabilidad de la enzima a sus valores de temperatura y pH óptimos, ésta se emplea a temperaturas de 28 a 40 °C y pH de 7 a 8.

Son pocos los reportes de estabilidad a la temperatura y pH para enzima pura y contenida en células. En lo que se refiere a termoestabilidad de la enzima, los reportes de la literatura en general coinciden en que temperaturas por encima de 50-55 °C son determinantes en la estabilidad de PA. Erarslan et al., (1991), reportan que la enzima de una cepa mutada de *E. coli* ATCC 11105 después de 120 minutos de incubación a 55 °C, perdió totalmente su actividad. De igual forma Burteau (1989), realizó otro estudio incubando la enzima a 55 °C en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.8 y observó total desactivación después de 30 min. Bryjak et al., (1989), determinaron que la enzima libre de *E. coli* almacenada a 4 °C, perdió menos de 10% de la actividad inicial después de 10 días de almacenamiento, 10% a 45 °C y 20% a 55 °C, después de una hora de incubación. Guisán et al., (1990), realizaron un estudio comparativo entre la enzima de *E. coli* y *K. citrophila* determinando que la enzima de *K. citrophila* es mas estable que la de *E. coli*. Los tiempos de vida media se muestran en la tabla 5. Así mismo lograron obtener preparaciones 1400 y 650 veces mas estables, para *K. citrophila* y *E. coli* respectivamente, por inmovilización en agarosa en presencia del inhibidor, sulfóxido de penicilina G. Greco et al., (1983) 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. El tiempo de vida media que determinaron fue 1.6 horas. También realizaron el estudio a 35 °C, obteniendo un tiempo

Tabla. 5 Tabla comparativa de la estabilidad de PA de *E. coli* y *K. citrophila* (Guisán et al., 1990)

Condiciones	$t_{1/2}$ (h)	
	<i>E. coli</i>	<i>K. citrophila</i>
pH 5 y 58 °C	0.5	35
pH 8 y 45 °C	2	20
pH 10 y 20 °C	2.5	6

de vida media de 4.8 días. Ospina, (1991) reporta que la termoestabilidad de la enzima inmovilizada por enlace covalente depende del pH, encontrando que la estabilidad óptima se encuentra a pH 7.5 y 37 °C.

No existen muchos reportes acerca de la estabilidad de la enzima al pH. Sin embargo, los reportes coinciden en que la estabilidad de la enzima es mayor a valores de pH ácidos (5-7) que alcalinos. Shimizu, *et al.*, (1975), reportan que la máxima estabilidad de PA de *K. citrophila*, expuesta durante 15 min a 50 °C se encuentra entre 5 y 7. Erarslan *et al.*, (1991), reportan que la estabilidad de la enzima almacenada a 4 °C por dos días, fue estable a valores de pH de 5, 6, 7 y 8. A pH 9 se pierde un 19% y a pH 10 no se detectó actividad.

Los valores de Km y velocidad máxima reportados en la literatura son muy variados, estando en función del origen de la enzima, de las condiciones y métodos para su determinación, del grado de pureza de la enzima etc.. En la tabla 6 se muestran algunos valores de Km y otras constantes de inhibición reportados en la literatura.

La enzima presenta inhibición por exceso de sustrato (penicilina G) y por sus productos de reacción: el 6-APA causa inhibición no competitiva y el ácido fenilacético inhibición competitiva (Balansingham y Waburton, 1972). Los valores de estas constantes dependen de los mismos factores que los valores de Km y Vmáx.

Se han propuesto varios modelos cinéticos para la reacción de hidrólisis de penicilina con PA de *E. coli*, en los cuales se incluye la inhibición por ambos productos de reacción (modelo de doble inhibición) (Lee y Ryu, 1982). Waburton *et al.*, (1972) plantean un mecanismo de reacción en el que se incluye la inhibición por exceso de sustrato (modelo de triple inhibición) y se considera la interacción entre el complejo enzima-AFA con 6-APA y de la enzima-6-APA con AFA, para rendir en ambos casos, el complejo enzima-AFA-6APA (modelo de triple inhibición modificado). Los mecanismos de reacción y ecuaciones cinéticas correspondientes se describen en la fig. 5.

Perfil de sustrato de la penicilino amidasa de E. coli.

El sustrato que preferencialmente hidroliza la PA de *E. coli* es la penicilina G. Sin embargo, se reporta que existen otros sustratos que son hidrolizados por esta enzima (tabla 7). El tamaño y la naturaleza química de la cadena lateral es muy importante en la especificidad de la PA de *E. coli*, siendo óptimo para la cadena fenilacetil, tolera sustituyentes tales como grupos amino o hidroxil, pero no carboxi (Savidge y Cole, 1975).

Dado que la estructura de las cefalosporinas es muy semejante a la de las penicilinas, las penicilino amidasas de *E. coli*

Tabla 6. Constantes cinéticas de la penicilino amidasa

Organismo	T(°C)	Km (mM)	K _{i5} (Mm)	K _{i6} -APA (Mm)	K _{iAFA} (Mm)	Referencia
<i>E. coli</i> NCIB 8743A (enzima)	37	0.67-0.8	250-280	5.3-7.1	4.7-5.8	Balansin- gham, (1972)
<i>E. coli</i> (enzima)	-	20	-----	15	200	Kutzbach, (1974)
<i>E. coli</i> G 5K pHM-12 (células)	-	9-11	1570	131	130	Savidge, (1984)
<i>E. coli</i> ATCC 9637 (células)	40	0.14	460	7.2	1.1	Sandoval, (1980)
(enzima)	40	0.236	238	1.56	0.94	Esparza, (1981)
(enzima inm.)	37	4.17	413	100	68.6	Ospina, (1991)

Figura 5. Mecanismos de reacción y ecuaciones cinéticas descritas para PA.

MECANISMO	MODELO
	DOBLE INHIBICION
$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P+A$ $ES+P \rightleftharpoons ESP$ $E+A \rightleftharpoons EA$ $E+P \rightleftharpoons EP$ $E+S \rightleftharpoons EPS$	$V_{m\acute{a}x} \cdot S$ $V_i = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{A}{K_{i_{afa}}} + \frac{P}{K_{i_{6apa}}} \right) + S \left(1 + \frac{P}{K_{i_{6apa}}} \right)}$
	TRIPE INHIBICION
$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P+A$ $ES+P \rightleftharpoons ESP$ $E+A \rightleftharpoons EA$ $E+P \rightleftharpoons EP$ $ES+S \rightleftharpoons ESS$ $EP+S \rightleftharpoons ESP$	$V_{m\acute{a}x} \cdot S$ $V_i = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{A}{K_{i_{afa}}} + \frac{P}{K_{i_{6apa}}} \right) + S \left(1 + \frac{P}{K_{i_{6apa}}} + \frac{S}{K_S} \right)}$
	TRIPE INHIBICION MODIFICADO
$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P+A$ $ES+P \rightleftharpoons ESP$ $E+A \rightleftharpoons EA$ $E+P \rightleftharpoons EP$ $ES+S \rightleftharpoons ESS$ $EA+P \rightleftharpoons EAP$ $EP+A \rightleftharpoons EAP$ $EP+S \rightleftharpoons ESP$	$V_{m\acute{a}x} \cdot S$ $V_i = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{A}{K_{i_{afa}}} + \frac{P}{K_{i_{6apa}}} + \frac{PA}{K_{i_{6apa}} K_{i_{afa}}} \right) + S \left(1 + \frac{P}{K_{i_{6apa}}} + \frac{S}{K_S} \right)}$

E=enzima, S=PGK, A=AFA, P=6-APA

Tabla 7. Perfil de sustrato para la penicilino amidasa de *E. coli*.

Sustratos	Velocidad relativa de hidrólisis
<u>Penicilinas:</u>	100
(Bencil-)	
p-hidroxibencil	150
DL- α -hidroxibencil	88
D- α -aminobencil	50
α -carboxibencil	5
2-furilmetil	91
2-tienilmetil	80
fenoximetil	5.5
α -fenoxietil	5
n-propoximetil	40
Isobutoximetil	29
n-heptil	5
fenil	5
2,5-dimetoxifenil	5
<u>Cefalosporinas:</u>	
Cefalotina	120
Cefaloridina	104
Cefaloglicina	48
<u>Otros sustratos:</u>	
Fenilacetamida	140
n-fenilacetilglicina	182
n-fenilacetil-DL-leucina	73
ácido n-fenilacetil-D- α -aminofenilacético	0
ácido n-fenilacetil-L- α -aminofenilacético	139
ácido bencilpenicilóico	22

utilizan como sustrato algunas cefalosporinas, en especial aquellas que contienen una cadena lateral fenilacetil como en el caso de la penicilina G. La cefalosporina C, única cefalosporina que se produce por fermentación, no es sustrato de la penicilino amidasa y no se ha encontrado la amidasa que pueda hacer esta importante transformación de una manera competitiva.

La penicilino amidasa de *E. coli* también cataliza la reacción de síntesis de penicilinas y cefalosporinas, tales como la ampicilina (López, 1982) y cefalexina (Choi, 1981), solo que en este caso, el pH de reacción es ácido. Los rendimientos que se han logrado obtener son bajos. En este sentido, se sabe que la enzima proveniente de *Klyuvera citrophila* ha sido utilizada eficientemente para ambas reacciones (Shimizu et al., 1975). Recientemente Fernández R. et al., (1991), reportaron la síntesis de antibióticos semisintéticos, (empleando la enzima de *K. citrophila* inmovilizada) en solventes orgánicos, encontrando que la dimetilformamida fue un solvente adecuado para llevar a cabo la síntesis de penicilina a partir de 6-APA y AFA.

La enzima de *E. coli* desde el punto de vista cinético presenta mayores ventajas que la enzima de *K. citrophila*, pero esta última es mas estable y eficiente en la síntesis de penicilinas semisintéticas.

Producción de la penicilino amidasa.

Los aspectos mas importantes relacionados con la producción de PA por *E. coli* son:

1. La enzima es inducible, por lo que en el proceso debe estar presente su inductor: el ácido fenilacético. Por otro lado, la síntesis de la enzima presenta represión catabólica, por lo que el medio de cultivo debe estar libre de carbohidratos fermentables tales como lactosa, maltosa, glucosa y parcialmente acetato (Klein y Wagner, 1980; Vojtisek, 1976). La glucosa, mejor fuente de carbono para la producción de *E. coli* no se puede adicionar al medio de cultivo. Vojtisek y Slezak (1975a), reportan que la enzima presenta su máxima actividad específica en medio mínimo, utilizando ácido fenilacético como fuente de carbono e inductor. En un reporte posterior (Vojtisek y Slezak, 1975b), se indica que la represión por glucosa es independiente de la concentración en un intervalo de 0.1 a 1%.

2. La temperatura óptima de producción de la enzima (29 °C) se encuentra por debajo de la temperatura óptima de crecimiento de microorganismo (37 °C), ya que a esta temperatura la enzima no se sintetiza. Kaufmann y Bauer (1960), reportan una temperatura de producción de 24 y 31 °C respectivamente. Klein y Wagner, (1980), determinaron que la producción de PA de *E. coli* ATCC 11105, se incrementa cambiando la temperatura de 27 a 24 °C, cuando la concentración de células es de 1.8 g/l con un nivel de oxígeno disuelto menor de 2%. Es importante mencionar la enzima β -lactamasa es sintetizada por *E. coli*, sin embargo, a

temperaturas de 24 a 32 °C, la β -lactamasa se sintetiza en bajas concentraciones (Bautista, 1983).

3. En general niveles bajos de aireación favorecen la producción de PA, sin embargo, es necesario optimizar estos requerimientos ya que a niveles de aireación muy bajos se produce poca biomasa y a niveles altos no se produce enzima (Vojtisek y Slezak, 1975a). En el caso de *E. coli*, se han reportado niveles de aireación de 0.4, 0.9 y 1 vvm por Cole, (1969); Kaufman y Bauer, (1960); y Klein y Wagner, (1980) respectivamente.

En la producción de PA por *E. coli* se han utilizado medios complejos y medios químicamente definidos. En el caso de los medios complejos las fuentes orgánicas más comunes han sido extracto de levadura, extracto de malta, harina de soya, licor de maíz y proteínas hidrolizadas o mezclas de aminoácidos (Savidge y Cole, 1975). Cole, (1975) describe un medio de cultivo con licor de maíz (1.2% p.s.), sulfato de amonio 0.1% y fenilacetato de sodio, potasio o amonio al 0.1%, el pH se ajusta a 6.5 con KOH o NaOH después de la esterilización.

En el caso de medios químicamente definidos el medio contiene ácido fenilacético, glutamato, fosfatos, sulfato de amonio y sulfato de magnesio (Self, 1969).

En una revisión realizada por Shewale y Sivaraman, (1989), se describe la producción PA de *E. coli* ATCC 9637 por cultivo continuo, a una tasa de dilución de 0.5hr^{-1} . La productividad fue 7 veces mayor que en cultivo por lote, sin embargo, la cantidad de fenilacetato de amonio requerido fue 10 veces mayor que en cultivo por lote.

Mejoramiento de cepas.

Como ya fue mencionado, la síntesis de PA en *E. coli*, presenta tres grandes mecanismos de regulación: AMP cíclico (represión catabólica), concentración de AFA y termo-regulación. El mejoramiento de cepas está dirigido a evitar o atenuar estos mecanismos de regulación.

Por otro lado, desde el punto de vista comercial se requiere contar con cepas que produzcan altas cantidades de PA, preferencialmente de carácter constitutivo para producir grandes cantidades de biomasa y evitar represión catabólica, y por último libres de enzima β -lactamasa.

Las estrategias que se han seguido para resolver los aspectos antes mencionados han sido:

- Desarrollo de procesos de bioingeniería.
- Desarrollo de cepas por técnicas de genética microbiana clásica.
- Uso de metodologías de ADN recombinante.

El desarrollo de procesos de Bioingeniería se ha realizado básicamente en cepas silvestres, dirigidos principalmente, a la optimización de las condiciones de crecimiento para maximizar la producción de la enzima a nivel industrial.

Las técnicas de genética microbiana han sido favorablemente utilizadas para incrementar la productividad de cepas portadoras del gen que codifica para la enzima PA. Los agentes utilizados para aislar mutantes hiperproductoras de PA son: luz UV, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, etilmetano sulfonato. También se han aislado mutantes usando cultivo continuo en presencia de aminos como única fuente de nitrógeno. Se han obtenido cepas resistentes a represión catabólica utilizando glucosa en el medio de cultivo, que producen de 8 a 20 veces mas actividad penicilino amidasa, comparada con la cepa silvestre.

La tecnología del ADN recombinante ha hecho posible alterar en forma precisa, algunas secuencias que regulan la expresión de los genes. Las estrategias que se han seguido son: transformación de genes de PA de cepas productoras de la PA a diferentes cepas (tabla 8), clonación del gen de PA usando cósmidos, clonación del gen de PA en plásmidos multicopia para incrementar la dosis de genes de una copia por cromosoma a mas de 20. Además, el conocimiento acerca de las regiones de DNA y de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de la enzima, han hecho posible reemplazar regiones regulatorias nativas por otras mas eficientes.

El empleo de técnicas de Ingeniería Genética ha dado como resultado el desarrollo de cepas hiperproductoras de la enzima, sin embargo, los valores absolutos en términos de actividad no han sido tan altos como los esperados. La inestabilidad de los plásmidos y la saturación de los mecanismos de exportación (procesamiento) son dos posibles explicaciones de estos resultados.

Es importante resaltar que gracias a los esfuerzos que se han hecho por obtener cepas mejoradas por técnicas de ADN recombinante, el conocimiento acerca de la enzima y los genes que codifican en diferentes microorganismos es muy amplio.

Merino, et al., (1991) estan tratando de corregir el problema del transporte, tratando de aislar cepas mutantes que no producen algunas proteínas periplásmicas o extramembranales, y así disminuir la competencia por los sitios secretores. Por otra parte, el desarrollo de sistemas de expresión de plásmidos de otros organismos, como *Streptomyces* y *Aspergillus* puede ser una herramienta poderosa para eliminar los problemas de secreción.

Mayer et al, (1979, 1980) han logrado obtener una cepa de *E. coli* 5K/pHM 12 constitutiva, que no produce β -lactamasa con una actividad de 1050 U/g de células secas con un rendimiento de 0.1 g/l de PA. Esto ha sido gracias a el empleo de técnicas de

Genética clásica y de Ingeniería Genética: el gene de PA se clono en un plásmido multicopia pBR322 y pOp203-3, de los cuales fue deletado el gene que codifica para la β -lactamasa. La cepa así obtenida fue mutada con luz UV.

Ingeniería de proteínas.

Con esta nueva área de la Biotecnología, la tecnología de enzimas cuenta, sin lugar a dudas, con una herramienta muy poderosa para diseñar enzimas de acuerdo con las necesidades del proceso. En el caso de PA, ya se están diseñando enzimas más estables a valores de pH alcalinos (Soberón, 1991). Enzimas cuya especificidad se ha cambiado para sustratos tales como las cefalosporinas.

Inmovilización de células por atrapamiento.

Como ya ha sido mencionado, para que un biocatalizador de PA de células inmovilizadas pueda ser empleado a nivel industrial es necesario contar con una cepa de alta actividad específica. Sin embargo, para que esta actividad pueda ser expresada eficientemente, es necesario contar con una metodología de inmovilización que permita obtener biocatalizadores de tamaño de partícula pequeño, sin problemas difusionales. Por otro lado, la metodología de producción deberá tener factibilidad técnica, es decir, sencilla de realizar y fácil de escalar.

La técnica más factible para llevar a cabo la inmovilización de células completas es el atrapamiento en gel, ya que es relativamente sencilla de realizar y de bajo costo, no obstante, entre sus principales desventajas está su difícil escalamiento y control del tamaño de partícula. Sin embargo, en los últimos años esta técnica ha logrado superar en parte, algunas de estas desventajas. A continuación se describen los avances que se han logrado.

Con el fin de disminuir los problemas difusionales, se han diseñado técnicas de inmovilización por atrapamiento que permiten obtener partículas esféricas, con la posibilidad de manipular el tamaño de partícula (tabla 9). Dichos métodos se pueden dividir en dos categorías: extrusión (manual o automática) y dispersión líquido-líquido o líquido-gas.

La extrusión manual es la más utilizada, consiste en alimentar la suspensión células-polímero a través de tubos capilares a soluciones gelificantes (soluciones de Ca_2^+ para alginato de Na^+ ó K^+ para carragenina o soluciones cortientes a temperatura baja). Con esta técnica el flujo de alimentación de la suspensión células/biopolímero es baja y la productividad depende ampliamente del número de capilares empleados y el tamaño de partícula que se obtiene es de 2 a 4 mm. Verlop y Klein, (1981) describen un equipo con un sistema de 42 salidas y capacidad de 3-5 kg por hora, obteniendo tamaños de partícula de 3 mm de diámetro. Al tratar de producir tamaños de partícula más pequeños,

Tabla 8. Cepas con actividad PA desarrolladas por Ingeniería Genética (Shewale y Sivaraman, 1989).

Cepa	Cepa recom- binante	vector	incremento producción	tipo de construcción
<i>B. sphaericus</i>	<i>B. subtilis</i>	pOH 38	1.7	constitutiva
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> KFCC-84-3	ND*	2.0	constitutiva
<i>K. citrophila</i> ATCC 21285	<i>E. coli</i>	ND	30.0	ND
<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	pPL608	1.2	ND
<i>E. coli</i> 194	<i>E. coli</i> pMLV7	pACYC	10.6	constitutiva
<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>E. coli</i> 5K/pHm6	pBR322	4.6	constitutiva

ND no determinada

Tabla. 9: Métodos de inmovilización por atrapamiento.

METODO	PRINCIPIO	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
Extrusión por gravedad.	la suspensión cél./biopol. se extruye a través de capilares.	los flujos que se pueden manejar son muy bajos por lo que para obtener grandes cantidades de bioacetalizador se requieren de un gran número de capilares, que fácilmente se obstruyen. Se obtienen tamaños de partícula de 2-4 mm.	Ogbonna, <i>et al.</i> (1989).
Extrusión automática por vibración.	la suspensión cél./biopol. se extruye por capilares de diámetro pequeño, los cuales a la salida están provistos de un sistema de vibración.	el diseño del equipo es complejo ya que se requiere de un generador de ondas. Se obtienen tamaños de partícula de alrededor de 1.1 mm.	Hulst, <i>et al.</i> (1985)
Atomización	la suspensión cél./biopol. se alimenta a la parte superior de un disco que se encuentra girando, rompiéndola en pequeñas partículas, las cuales caen a la solución curtidora.	el tamaño de partícula depende de la velocidad de alimentación de la suspensión cél./biop., a velocidades de alimentación altas no se forman esferas. El diseño del equipo es complejo.	Ogbonna, <i>et al.</i> (1989)
Dispersión con aire.	la suspensión cél./biopol. se extruye por capilares de diámetro pequeño, al mismo tiempo se alimenta	El tamaño de partícula es función de la altura de los capilares respecto a la solución gelificante, de la velocidades de alimentación de	Regh, (1986)

continua...

continuación tabla 9.

METODO	PRINCIPIO	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
	una corriente concéntrica con lo que se logra disminuir el tamaño de partícula.	la suspensión cél./biopol. y de la corriente de aire. Se han diseñado equipos para producir grandes cantidades de biocatalizador, pero la distribución de tamaño de partícula se incrementa y los capilares se obstruyen.	
Dispersión liq-liq.	se basa en la dispersión de la suspensión cél./biopol. en una fase continua de aceite.	El tamaño y distribución de partícula depende de las propiedades hidrodinámicas del sistema. Su escalamiento es muy factible se pueden obtener tamaños de 0.1-5mm. La productividad depende de la relación de las dos fases en el reactor.	Lacroix y Audet, (1989)

cél. células
biopol. biopolímero

se pierde la capacidad de formar esferas.

Hulst et al., (1985) desarrollaron un sistema de vibración mecánica con una capacidad de 24 litros de biocatalizador por hr; consiste en alimentar la suspensión células/biopolímero a través de capilares provistos de un sistema de vibración. Al aplicar una frecuencia determinada se producen esferas de tamaño uniforme, las cuales caen a una solución gelificante. Se obtienen esferas de alrededor de 1.1 mm de diámetro. Sin embargo, dicho sistema es aplicable a suspensiones células/polímero de baja viscosidad, por lo que los biocatalizadores obtenidos presentan baja estabilidad operacional.

Ogbonna et al., (1986) reportan una técnica de extrusión automática, consiste en alimentar la suspensión células-alginato a la parte superior un disco que se encuentra girando. Cuando dicha suspensión cae al disco, se desintegra en pequeñas gotas, las cuales se gelifican al caer a un recipiente que contiene una solución de CaCl_2 . En este caso se obtuvieron esferas de 0.5 mm de diámetro; la formación de las esferas depende de la velocidad de alimentación de la suspensión células-polímero. Solo se pueden emplear suspensiones de baja viscosidad y a velocidades de alimentación altas no se forman esferas. Un equipo descrito por Mutulovic et al., (1986) puede manejar suspensiones de alta viscosidad.

Otro método por el cual el tamaño de partícula se puede manipular esta basado en la dispersión de la suspensión células/biopolímero con aire. Consiste en alimentar la suspensión células/biopolímero a través de capilares, al mismo tiempo se alimenta una corriente concéntrica de aire, de esta forma el aire dispersa la suspensión células/biopolímero, formándose tamaños de partícula mas pequeños. Las partículas se colectan en una solución gelificante. Con este sistema el diámetro de partícula promedio es función de la altura de los capilares respecto a la solución gelificante, de la velocidad de alimentación de la suspensión células/biopolímero, del diámetro de los capilares y la velocidad de alimentación del aire. El problema de esta técnica es que la velocidad de producción es muy lenta. Para facilitar su producción a gran escala es necesario incrementar el número de capilares y operar en forma simultánea. Sin embargo, el control de las variables críticas es difícil y la dispersión en el tamaño partícula se incrementa, por otro lado los capilares se obstruyen fácilmente. Su et al., (1989) empleando este sistema obtuvieron tamaños de partícula de 0.05 a 0.5 mm de diámetro.

Mas recientemente Audet y Lacroix, (1989) y Castillo, et al., (1991), reportan la producción de biocatalizadores esféricos por dispersión de la suspensión células-gel en aceite. La técnica consiste en mezclar la suspensión células-gel en aceite, después de cierto tiempo de mezclado, se enfria el sistema para se inducir la gelificación. La dispersión y tamaño de partícula dependen de

las condiciones hidrodinámicas y temperatura del sistema, relación fase acuosa/fase oleosa, velocidad de mezclado, entre otras, y por otro lado el escalamiento es factible.

Con el desarrollo de estas metodogías aunado al diseño de cepas hiperproductoras de la PA, se abre la posibilidad de utilizar biocatalizadores de células inmovilizadas, competitivos a nivel comercial.

Producción de biocatalizadores de PA.

a) Biocatalizadores de enzima.

Una revisión muy completa de biocatalizadores industriales de PA ha sido realizada por Shewale, (1989) y Ospina, (1991). La mayor parte de ellos se producen a base de enzima purificada e inmovilizada por métodos químicos y físicos a diversos soportes (tabla 10). Solo una pequeña parte se hace por inmovilización de células completas.

Recientemente, se han reportado dos alternativas diferentes, para reutilizar la PA, que aún no han sido comercializadas. En una revisión realizada por Shewale, (1989) reporta el desarrollo de un sistema de dos fases. La enzima esta enriquecida en una de las fases y dado que la tensión interfacial entre las dos fases es muy baja, se promueve una buena transferencia de masa, evitando problemas difusionales. En esta misma revisión Margolin et al, reportan el empleo de PA soluble en agua, pero que precipita con complejos polielectrolíticos. La precipitación se promueve al disminuir el pH a 5.7, como resultado de la protonación de los grupos carboxilo. El complejo enzima-polímero, después de separarlo se solubiliza fácilmente a pH alcalino.

La eficiencia y propiedades de los biocatalizadores, dependen de la fuente de la enzima, su pureza, naturaleza del soporte y método de inmovilización. Las propiedades fisicoquímicas pueden sufrir cambios como resultado de la inmovilización. Las limitaciones difusionales y uniones multi-puntos al soporte pueden alterar el valor del Km. La unión a soportes cargados puede alterar el perfil de pH. La termoestabilidad de la enzima generalmente se incrementa porque se reduce la flexibilidad por cambios conformacionales. La oclusión de centros alostéricos o repulsión debido a grupos cargados en el soporte alteran las constantes de inhibición. En general, los efectos sobre el Km y Ki son mas notorios que en pH y temperatura óptimos.

La actividad de las preparaciones comerciales de biocatalizadores de enzima inmovilizada se encuentran entre 60 y 350 U/g. El número de ciclos y el rendimiento de 6-APA/Kg de biocatalizador se encuentran entre 100 y 620 ciclos y entre 100 y 2000 Kg 6-APA/Kg de biocatalizador respectivamente (Shewale, 1989).

b) Biocatalizadores de PA con de células completas .

En la tabla 11 se muestran los métodos de inmovilización y

Tabla 10. Métodos de inmovilización empleados para la penicilino amidasa (Osipina, 1991).

Enzima	Fuente	Preparación	Método de Inmovilización	Soporte
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Precipitación	Adsorción entrecruzamiento	Quitosano
PG acilasa	<i>E. coli</i>	---	Enlace covalente	Acrílico
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Células	Atrapamiento en gel	Poliacrilamida
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Acoplamiento	Silica gel activada
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Células	Extrusión	Gelatina-DEAE-Celulosa
PG acilasa	<i>B. megaterium</i>	Centrifugación	Adsorción	Bentonita
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Atrapamiento	Triacetato de celulosa
PG acilasa	<i>E. coli</i>	---	Unión Covalente	Eupergit C.
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Células	Atrapamiento	Acrílico
PV acilasa	<i>Halbran. pulchella</i>	Células	Atrapamiento	Alginatos poliacrilamida
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Prec. alcohol isopropílico	Entrecruzamiento	Glutaraldehído
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Células	Atrapamiento	Carragenina
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Células	Atrapamiento	Eugradit
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Enzima pura	CoInmovilización con ureasa	Gelatina glutaraldehído
PG acilasa	<i>E. coli</i>	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografía	Unión covalente	DEAE-celulosa
PG acilasa	<i>B. mega-</i>	---	Unión covalente	Fibras de poliacrilonitrilo
PV acilasa	---	Células homogenizadas	Unión covalente	Glutaraldehído

Tabla 11 Características de biocatalizadores de PA de células completas.

CELULAS	SOPORTE	METODO	REND.(%)	AE (U/g)	ESTAB. OPERACIONAL	REFERENCIA
<i>E.coli</i>	triacetato de celulosa	atrapamiento	24	40	NR*	Marconi, 1973
<i>E.coli</i> (300 U/g)	quitosano	NR	NR	60-101	después de 70 reacciones perdió 10% de la actividad inicial.	Klein, 1984a
<i>E.coli</i> (pHM12) 1000 U/g	quitosano	(30-50 % de carga celular)	40	30	después de 30 reacciones perdió 20% de la actividad inicial.	Klein, 1984b.
<i>E.coli</i> ATCC 9637 2.35 U/g p.h.	poliacrilamida	atrapamiento (1.35 g cél/g soporte)	93.6	0.314	tiempo de vida media a 40°C 17 días y a 30°C 14 días.	Sato, 1976
<i>K. citrophila</i> .	poliacrilamida	atrapamiento (4.3 g cél'	NR	NR	tiempo de vida media 14 días.	Marikawa, 1980.
<i>E.coli</i>	---	floculación mas agregación con agentes entrecruzantes.	10-80	NR	no hubo perdida de integridad fisica y actividad despues de 60 dias en -- agitación a 30 °C.	Vojtisek, 1983
<i>E.coli</i>	--	agregados unidos covalentemente por entrecruzamiento en presencia de fragmentos celulares.	NR	NR	después de 10 reacciones no hubo perdida de actividad.	Vojtisek, 1983.
<i>E.coli</i>	resina epóxica	atrapamiento (0.17-1.13 g cél/g sop.)	28-40	15	después de 22 ciclos se se perdió 15% de la act. inc.	Klein, 1981a

continua....

Continuación tabla 11

CELULAS	SOPORTE	METODO	REND.(%)	AE (U/g)	ESTAB. OPERACIONAL	REFERENCIA
<i>Malbranchea pulchella</i> var. sulfurea	agar poliacril-amida	doble atrapamiento	NR	NR	después de 10 reacciones perdió mas del 90% de su actividad inicial.	Sing, 1988
<i>E.coli</i>	colágena	atrapamiento	NR	26	tiempo de vida media 350 días.	Venkatsubramanian (datos no publicados)
<i>E.coli</i>	eugradit	atrapamiento	65	NR	NR	Klein, 1981b
	alginatos	atrapamiento	60	NR	NR	
	epóxido	atrapamiento	40	NR	NR	
¹ <i>E.coli</i>	gelatina glutaraldehído (0.5 g cél/g sop.)	atrapamiento	45	1	NR	Padilla, 1985

NR datos no reportados.

soportes empleados en la inmovilización de células completas con actividad de PA. La mayor parte de ellos se fabrican inmovilizando las células por atrapamiento en gel.

Se han utilizado varios soportes: poliacrilamida (Sato et al., 1976), carragenina (Casas, 1981), eugradit y matrices epóxicas (Klein, 1981a y 1981b), quitosano (Klein, 1984b) gelatina (Castillo et al., 1991) y agar (Padilla, 1985).

Al comparar las características entre los biocatalizadores de células inmovilizadas con los de enzima inmovilizada se observa que las actividades específicas (0.314 a 100 U/g de biocat. p.h), los rendimientos (la mayoría menores de 40%) y la estabilidad operacional son bajas en comparación con los biocatalizadores de enzima inmovilizada. Seguramente estas son las razones por las cuales los biocatalizadores de enzima inmovilizada son preferencialmente utilizados.

Condiciones de operación de biocatalizadores de PA

Los biocatalizadores de PA a nivel industrial no se utilizan en condiciones óptimas de reacción. Existe un compromiso entre la estabilidad de la enzima, la penicilina y el 6-APA. La reacción se lleva a cabo a valores de pH entre 7.5-8 y temperaturas de 28-37 °C. La concentración de penicilina G varía entre 7 y 10%, dependiendo de las propiedades de la enzima. La relación enzima/penicilina que se maneja es para obtener arriba del 95% de conversión en un tiempo de 2 a 3 horas. Durante la hidrólisis hay liberación de AFA, el cual de no ser neutralizado disminuye el pH y por lo tanto la velocidad de reacción. El pH de la reacción se mantiene por la adición de alcali (NH₄OH, NaOH, KOH) utilizando controladores de pH, este debe ser cuidadosamente controlado para evitar gradientes de pH que puedan causar desactivación de la enzima.

Reactores utilizados en la hidrólisis de penicilina con biocatalizador de enzima.

La hidrólisis penicilina G se ha llevado a cabo en lote y en continuo, empleando reactores tanque agitado, columna empacada y de membrana.

Lagerlof et al., (1976) llevaron a cabo la reacción en un reactor tanque agitado con enzima inmovilizada, con control de pH y temperatura. El pH se controla por la adición de alcali. Después de la reacción la enzima inmovilizada se recupera por filtración en filtro prensa. Rhom Pharma y Boehringer Mannheim recomiendan el uso de una malla en el fondo del reactor, para evitar la pérdida física del biocatalizador y para reducir los tiempos muertos. La agitación debe ser vigorosa con el fin de mantener el biocatalizador en suspensión y evitar gradientes de pH.

Carleysmith y Lilly, (1979), diseñaron un sistema que consiste en cuatro tanques agitados en serie, cada reactor esta

enchaquetado y provisto de filtros para retener el biocatalizador, tiene un sistema de control de pH en línea, dos impulsores de paleta para asegurar circulación axial y flujo hacia arriba. La conversión en el primer tanque fue 54%, en el segundo 81%, en el tercero 91% y en el cuarto de 97%. Este tipo de sistema tiene la ventaja de no formar gradientes de pH, como sucede en el reactor de columna empacado, donde las velocidades de recirculación deben ser muy altas.

En el sistema reactor tanque agitado continuo el catalizador se ve afectado por la inhibición por productos. Carleysmith y Lilly, (1979) reportan un sistema tanque agitado continuo de dos estados (dos tanques en serie). La productividad fue 50% mayor, comparado con el de un solo estado.

Otro sistema que ha sido ampliamente utilizado sobre todo para biocatalizadores de células inmovilizadas, es el reactor de columna empacado con recirculación (Savidge y Vandamme, 1984). El biocatalizador se encuentra empacado en una columna y la solución de penicilina G se recircula desde un tanque agitado, con control de pH y temperatura. La agitación en el tanque debe ser vigorosa para minimizar la degradación alcalina de la penicilina y 6-APA. Con este sistema se minimiza la inactivación del biocatalizador debido al contacto directo con el alcali, la pérdida física del biocatalizador y la contaminación microbiana. El flujo através de la columna debe ser alto para evitar gradientes de pH a lo largo de la columna, sin embargo, deben cuidarse las caídas de presión.

Un sistema parecido al reactor de columna con recirculación se ha reportado por Novo, (1982) y Gómez, (1992). En este caso el biocatalizador esta repartido en varias columnas en paralelo. Las ventajas de este sistema son, por un lado que se pueden manejar flujos altos sin que se generen altas caídas de presión, y por otro el biocatalizador no se encuentra expuesto altos gradientes de pH, lo que incrementa la vida media del mismo.

La empresa Fersinsa de México emplea un sistema de columnas empacadas, con recirculación que trabajan en paralelo. El biocatalizador consiste en enzima de *B. megaterium* inmovilizada en fibras de poliacrilonitrilo hidrogenadas. El proceso empieza manejando 8 columnas y cuando el tiempo de hidrólisis llega a 3 horas, adicionan otra columna. De igual forma cuando el tiempo de reacción llega a 3 horas nuevamente se adiciona otra columna y así hasta llegar a 18 columnas. Para evitar problemas de pH en las columnas se manejan flujos del orden de 1600 l/h. Con este sistema han logrado 1200 ciclos.

Se han realizado comparaciones entre diferentes reactores. Shewale, (1989), observó que al hidrolizar penicilina V con "Semacylase" de Novo, en reactor tanque agitado y columna empacada, el primero dio mejores resultados. Ospina, (1991) determinó que el reactor tanque agitado por lotes, presentó mejores resultados que el reactor tanque agitado continuo, al

hidrolizar penicilina G con enzima inmovilizada.

Reactores provistos con membranas de ultrafiltración (UF) se han utilizado para separar la enzima (Ryu et al., 1972; Greco et al., 1983). Estos sistemas tienen la desventaja de que las membranas sufren el fenómeno de polarización.

Reactores utilizados en la hidrólisis de penicilina empleando biocatalizador de células completas.

En la tabla 12 se muestran las características operacionales de biocatalizadores con células inmovilizadas.

Tanabe Seikaku Co. (Sato et al., 1976) emplea células de *E. coli* inmovilizadas en gel de poliacrilamida en un reactor columna empacada, con penicilina G (0.05M) en amortiguador de fosfatos-boratos 0.01 M pH 8.5 a 30 °C con un rendimiento de 80%; el tiempo de vida media es de 42 días a 30 °C y 17 a 40 °C.

En un proceso industrial chino, con biocatalizador de células inmovilizadas en agar y gelatina, después de 285 ciclos (7.5 meses) la velocidad inicial permanece constante. Este biocatalizador también se ha utilizado (en reactor de columna empacado) para la producción de 7-ADCA, después de 23 lotes (30 días) la actividad permaneció constante; en un reactor similar operado a nivel industrial se realizaron 72 hidrólisis en un período de 3 meses.

Vojtisek et al., (1979), en un reactor intermitente agitado emplearon un biocatalizador de células completas de *E. coli* inmovilizadas por entrecruzamiento. Después de 25 hidrólisis a 37 °C, pH 7.6-7.8 con 65 g/l de penicilina, logra mantener 95% de conversión.

Klein et al., (1984), reporta que un biocatalizador de células de *E. coli* (hiperproductora de la enzima) inmovilizadas en quitosano, retuvo 80% de su actividad inicial después de 30 hidrólisis a 37 °C, pH 7.8, 100 g/l de penicilina, alcanzando 95% de conversión en 90 minutos.

Como conclusión en lo referente a los reactores utilizados en la hidrólisis de penicilina, el diseño y fabricación de los reactores se hace de acuerdo a las propiedades del biocatalizador. El tipo y configuración del reactor afecta considerablemente la productividad, por lo que en la selección del mismo se debe hacer considerando la máxima productividad en términos de 6-APA por cantidad de biocatalizador.

Tabla 12. Características operacionales de biocatalizadores con células inmovilizadas.

Biocatalizador	Reactor	pH	T (°C)	Estabilidad operacional	[S] (g/L)	Conv. %	Referencia
Células-poliacril- amida (<i>E. coli</i>)	Columna	8.5	30	$t_{1/2} = 30$ días	18.62	80	Sato et al, 1976
	Tanque agitado por lotes	8.5	40	$t_{1/2} = 30$ días	18.62	80	
Células-agar- carragenina	Columna y Tanque agitado por lotes	8.0	37	sin pérdida de actividad después de 280 ciclos	-----	---	Klyosov, 1989
Células agregadas (<i>E. coli</i>)	Tanque agitado por lotes	7.6-7.8	37	después de 25 hidrólisis se mantiene la conversión inicial	65	90	Vojtisek et al, 1983
Células-quitosano (<i>E. coli</i>)	Tanque agitado por lotes	7.8	37	después de 70 hidrólisis re- tuvo el 90% de la actividad inicial	100	95	Klein et al, 1984

NO MAY PAG.

39
||

IV. MATERIALES Y METODOS.

Microorganismo.

Las células de *E. coli* ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa fueron proporcionadas por la compañía GENIN S.A. de C.V. (México).

Materiales.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo J.T. Baker. Se empleo 6-APA y p-dimetil-aminobenzaldehído (Sigma), ácido fenilacético (Fisher), gelatina (Cosmopolita), carragenina (Química Hércules), agar (Difco), glutaraldehído al 25% (Merck), aceite de cártamo comestible, la penicilina G potásica (PGK) Glaxo, fue proporcionada por la compañía ORFAQUIM S.A. (México).

METODOS.

Método de inmovilización.

El método de inmovilización empleado fue atrapamiento en gel. La metodología esta basada en la dispersión de la fase células/biopolímero en aceite. El biopolímero se resuspende en amortiguador de fosfatos a temperatura de esterilización (121 °C, a 1 Kg/cm²) por 2 min. La solución de biopolímero se enfría a 50-55 °C, y entonces se incorpora a la suspensión celular, la cual se encuentra a temperatura de 42-50 °C, posteriormente la suspensión células/biopolímero se vierte a la fase oleosa, la cual se encuentra a temperatura de 42 a 50 °C. Cuando la temperatura de ambas fases es de 42 a 50 °C se inicia la agitación. Posteriormente el biocatalizador es tratado con glutaraldehído. La metodología se muestra en la fig. 6.

En la selección del soporte y condiciones de inmovilización se trabajó a nivel de 45 ml de suspensión células-biopolímero y 150 ml de aceite, en un vaso de precipitados de 400 ml. Para llevar a cabo la selección del impulsor y de las condiciones de agitación, los experimentos se realizaron en un tanque de 2 litros con las características que se muestran en la fig. 7. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando 225 ml de suspensión células/biopolímero, 750 ml de aceite. Se probaron dos tipos de impulsores Rushton y A-310 (Lighnin).

Proceso de curtido

En relación con el proceso de curtido, se empleó glutaraldehído considerando que ha sido utilizado convenientemente para llevar a cabo reacciones de entrecruzamiento, dada su estabilidad en soluciones acuosas y la facilidad con que reacciona con grupos amino a valores de pH neutros.

De acuerdo a los resultados previos, obtenidos con gelatina y lo reportado en la literatura, se fijaron las siguientes

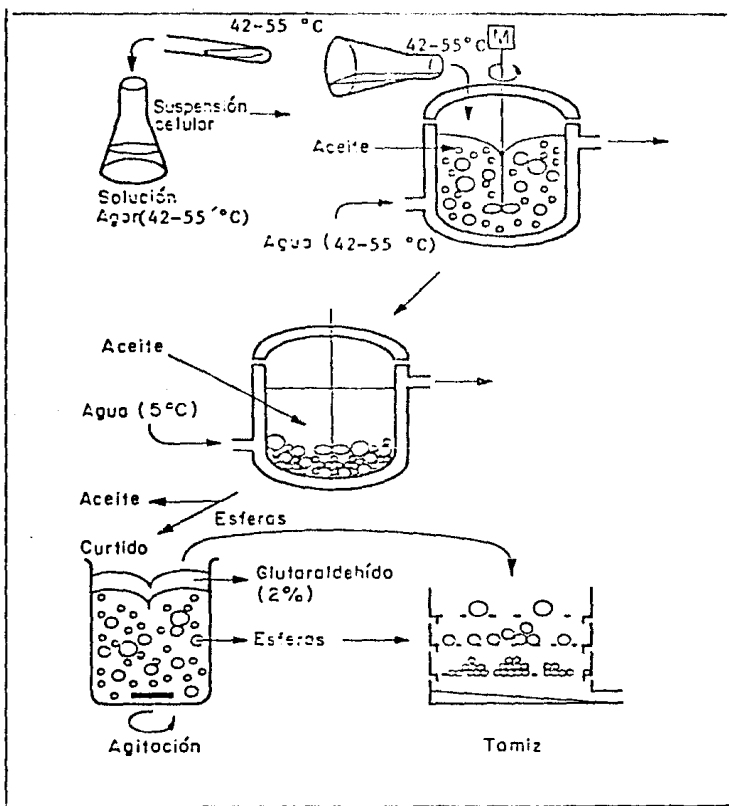


Figura 6. Metodología de inmovilización por dispersión líquido-líquido.

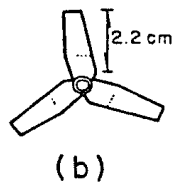
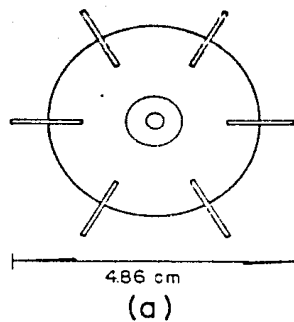
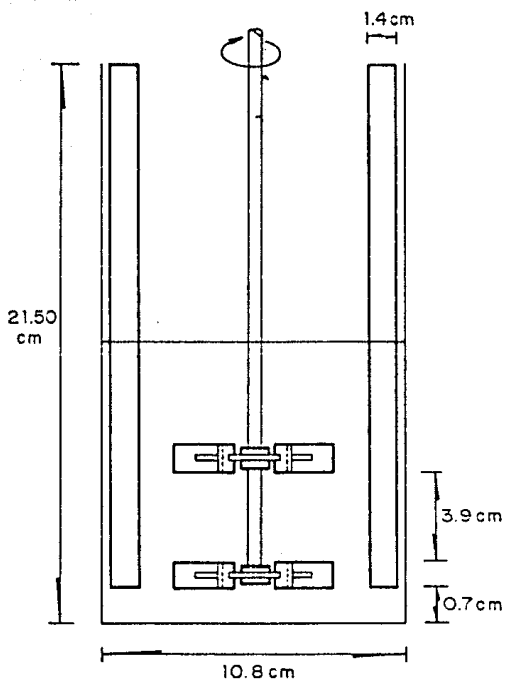


Figura 7. Características del sistema para definir la velocidad de agitación en la manufactura del biocatalizador, se muestran los dos diferentes tipos impulsos empleados (a) Impulsor Rushton (b) Impulsor A-310 (Lightnin).

condiciones de curtido: 360 ml de glutaraldehído al 2% por 100 g de biocatalizador peso humedo, pH 7.5, tiempo de curtido 1 h, temperatura 25 °C.

Aspectos de la manufactura del biocatalizador.

Otro aspecto importante en la manufactura del biocatalizador es que se queda una gran cantidad de aceite impregnado a la preparación. Este problema es mayor en tamaños de partícula pequeños. Castillo et al., (1991) reportan que este problema se minimiza lavando con una solución de Tween 80 al 7%. En este caso se observó que este problema es menor si antes de lavar con la solución de Tween 80, el biocatalizador se lava abundantemente con agua. Posteriormente se curte, se lava con la solución de Tween 80, y finalmente el biocatalizador se lava con solución amortiguadora de fosfatos pH 6.

Actividad enzimática.

La actividad penicilino amidasa en células y biocatalizador fue medida en presencia de PGK al 2%, en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.8 a 37°C. El 6-APA producido durante la reacción fue medido por el método de p-dimetilaminobenzaldehído (Casas, 1981).

La medición de las velocidades iniciales en células intactas se llevaron a cabo en tubos de ensaye de 10 por 100 con 1 ml de mezcla de reacción. La actividad específica se reporta como U/mg de proteína, esta última medida por el método de Lowry (Lowry, 1951).

La medición de las velocidades iniciales en el biocatalizador se realizaron en un volumen de 10 ml de reacción con 0.2 g de biocatalizador, el biocatalizador filtrado en malla 80, lavado con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.8, secando con papel adsorbente hasta que el biocatalizador se desprenda fácilmente se la espátula. La actividad específica se reporta como U/g de biocatalizador (p.h.).

Determinación de actividad proteolítica.

En un tubo de ensaye se colocan 1,9 ml de caseína al 1% y se adiciona 0.1 ml de la suspensión celular con 100-150 g/l células, se incuba a 37 °C, se agregan 3 ml de ácido tricloroacético al 5%, se centrifugan por espacio de 5 minutos a 3500 rpm. Finalmente se lee densidad óptica a 280 nm contra blanco de reactivos.

Factor de efectividad

El factor de efectividad se determinó experimentalmente midiendo actividad al biocatalizador íntegro y después de ser desintegrado mecánicamente. El factor de efectividad se obtiene de la relación entre ambas actividades:

$$\eta = \frac{v_i \text{ (biocat. intacto)}}{v_i \text{ (biocat. desintegrado)}}$$

Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador.

Para determinar la temperatura óptima de la PA en células intactas y biocatalizador se midió actividad a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, y 60 °C, a valores de pH de 7.5 y 7.8.

Efecto del pH en la actividad del biocatalizador.

Para determinar el pH óptimo de la PA de células intactas se midió actividad a diferentes valores de pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 7.8, 8, en amortiguador 0.1 M, a temperaturas entre 25 y 65 °C.

Efecto de la temperatura en la estabilidad de células libres e inmovilizadas.

Se colocaron varias muestras de suspensión celular (2 ml) y biocatalizador (1 g) en amortiguador de fosfatos 0.1 M a un pH determinado, en un baño agitado a la temperatura de estudio, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó actividad.

Efecto del pH en la estabilidad del biocatalizador.

Se siguió la metodología del inciso anterior, solo que variando el pH del amortiguador. Se ensayaron valores de pH entre 6 y 8.

Estabilidad operacional.

Se realizaron 40 ciclos sucesivos de hidrólisis de 2 horas cada uno, y se determinó en cada hidrólisis, la conversión al final de la reacción y la actividad del biocatalizador cada 10 ciclos. Las condiciones de las hidrólisis fueron las siguientes:

Temperatura	37 °C
pH	7.5-7.6
volumen de reacción	50 ml
concentración de PGK	6%
velocidad de agitación	300 rpm
Relación enzima/PGK	60 U/g
Concentración de NH ₄ OH	2 M
Actividad del catalizador	10 U/g peso humedo.

Determinación de las constantes cinéticas Km, Vmáx, KiAPA, Ki6-APA, Ks.

Los valores de Km y Vmáx en células intactas fueron determinados por medición de velocidad inicial con diferentes concentraciones de sustrato. Los valores de Km y Vmáx se obtuvieron de graficar los datos de acuerdo a la representación de Lineweaver y Burk (Segel 1976) y el valor de la K_s se obtuvo por medición de velocidad inicial a altas concentraciones de sustrato de la grafica 1/V vs S.

La determinación de K_{iAFA} en células intactas fue determinada por medición de velocidad inicial con diferentes concentraciones de sustrato en presencia de dos diferentes concentraciones de AFA. El valor de K_{iAFA} se obtuvo siguiendo la metodología clásica de Lineweaver y Burk.

Debido a que en la determinación de K_{i6-APA} se debe hacer en presencia de 6-APA se planteó una alternativa que se trata en la sección de discusión y resultados.

Reacciones de hidrólisis

Las hidrólisis de PGK se llevaron a cabo en un tanque agitado 50 ml con control de pH entre 7.5 y 7.6 con NH_4OH 2 N. En la fig.8 se muestra un esquema del sistema de reacción. Se tomaban muestras y se diluían, para posteriormente medir la concentración de 6-APA por el método de p-dimetil-aminobenzaldehído. Las hidrólisis se realizaron por triplicado, entre cada hidrólisis se daba un ligero lavado al biocatalizador con 5 ml de amortiguador de fosfatos 0.03 M, pH 7.5 por 5 min.

Todas las ecuaciones se resolvieron numéricamente con ayuda del lenguaje de simulación ISIM^h desarrollado por el Centro Industrial Universitario de Salford, LTD, Salford, England. Este lenguaje utiliza cuatro diferentes métodos de integración para resolver ecuaciones diferenciales.

Definición de algunos parámetros mencionados a lo largo del manuscrito.

Una *unidad* (U) es definida como la cantidad de enzima que produce una μmol de 6-APA por minuto. Las células con aproximadamente 50% de proteína, tienen una actividad de 50 a 100 U/g de células peso seco.

Carga enzimática se define como la relación unidades de enzima inmovilizada o en células intactas/g de penicilina

Concentración de enzima se refiere a unidades de enzima inmovilizada o en células intactas/ml de reacción.

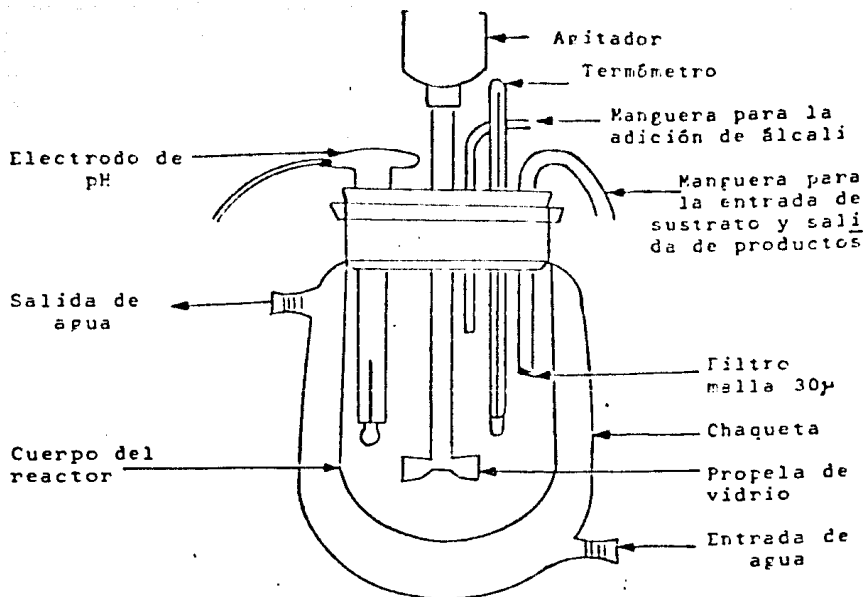


Figura 8. Sistema de reacción para la hidrólisis de penicilina G.

V. RESULTADOS

DISEÑO DEL BIOCATALIZADOR.

Como se mencionó, uno de los objetivos de este trabajo es el diseño de un biocatalizador de penicilino amidasa empleando células completas de *E. coli*. Dado que dentro de las perspectivas del proyecto se incluye la incorporación posterior de una cepa de *E. coli* hiperproductora de la enzima, es necesario, por un lado diseñar un biocatalizador eficiente, de tal forma que la actividad enzimática se exprese totalmente. Por otro lado, es recomendable que el proceso de fabricación sea sencillo, económico y escalable con el fin de obtener un biocatalizador de bajo costo y con adecuadas propiedades mecánicas.

La técnica de inmovilización elegida es el atrapamiento en gel, dado que es ampliamente utilizado, relativamente sencillo y económico, además de tener la posibilidad de obtener biocatalizadores de diferentes formas y tamaños.

En la sección de antecedentes se hace referencia a los métodos de inmovilización por atrapamiento en gel reportados en la literatura. Un análisis de estos métodos se muestra en la tabla 9. De estos métodos, se seleccionó el de inmovilización por atomización de la suspensión células-biopolímero con aire, ya que para entonces resultó ser el mas conveniente en términos prácticos. El dispositivo empleado a nivel laboratorio se muestra en la fig. 9. Se diseño un prototipo para llevar a cabo la producción del biocatalizador a mayor nivel (fig. 10). Las pruebas se realizaron utilizando gelatina como soporte, con una relación células/gelatina de 3.3 g/g. En el método original la suspensión células-biopolímero después de ser dispersada, se recibe en una solución acuosa curtiende para lograr su gelificación. Sin embargo, al utilizar una solución de glutaraldehído al 1.25% a 4 °C, no se formaron esferas, las partículas de solubilizaron. Se encontró que al emplear aceite comestible de cártamo a 10 °C se lograban obtener esferas, por lo que se seleccionó el aceite como fase gelificante.

El problema principal de este método es su baja reproducibilidad, sobre todo a gran escala, ya que se requiere de un control muy preciso de los parámetros que influyen el tamaño de partícula.

En reportes mas recientes Audet y Lacroix, (1989) y Castillo et al., (1991) reportaron un método de inmovilización de células, basado en la dispersión de la suspensión células-gel (fase acuosa) en una fase hidrofóbica (aceite). El proceso consiste en mezclar ambas fases a una velocidad de agitación determinada. Dada la sencillez del método, se realizaron pruebas para valorar el proceso. En la tabla 13 se presenta un análisis comparativo de ambos métodos. Se puede concluir que el método basado en la dispersión de dos fases, es mas eficiente, fácil de realizar y de

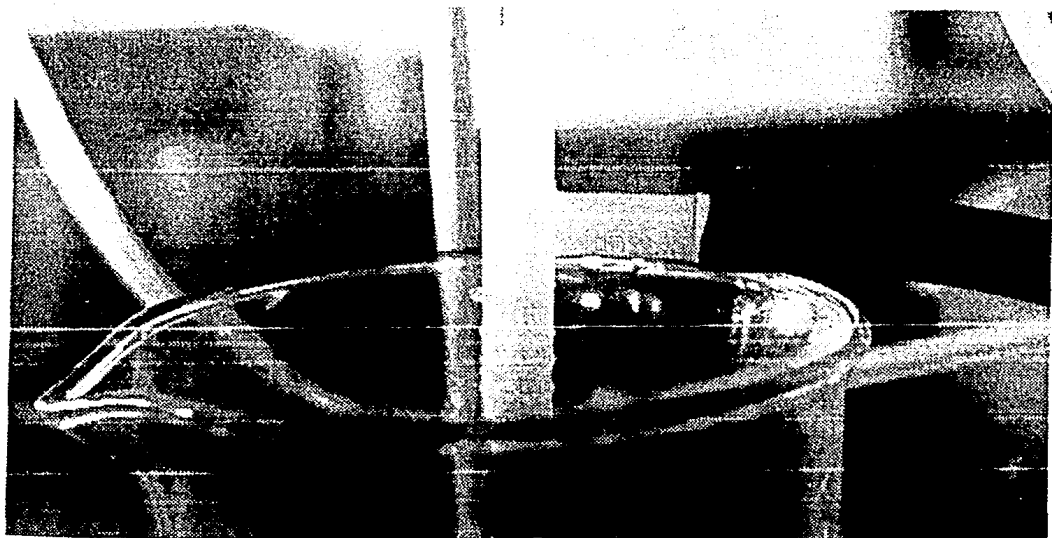
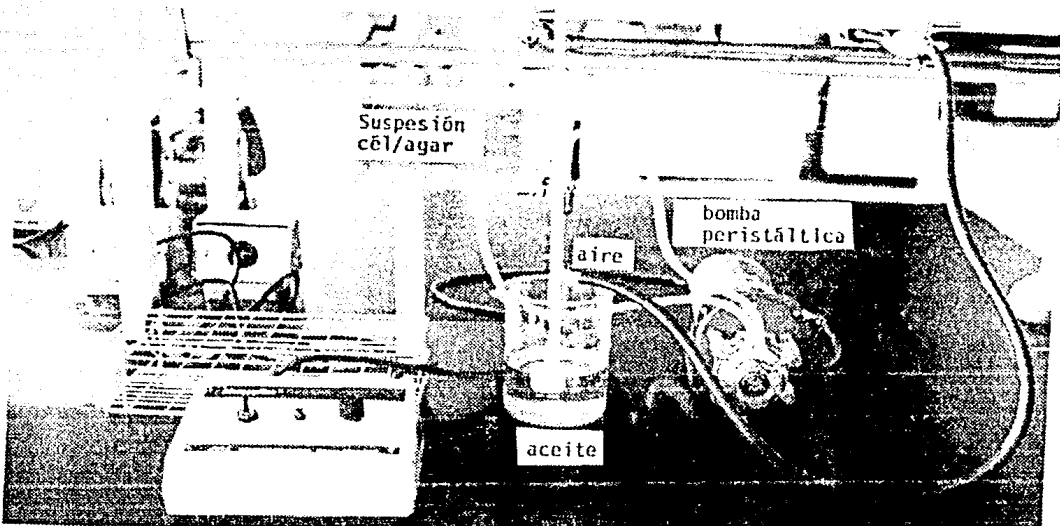


Figura 9. Dispositivo empleado para la inmovilización de células de *E. coli* por atomización a nivel laboratorio. La suspensión células/agar se alimenta al dispositivo por medio de una bomba peristáltica y al mismo tiempo se alimenta aire, para formar partículas mas pequeñas. En la figura inferior se muestra en detalle el dispositivo.

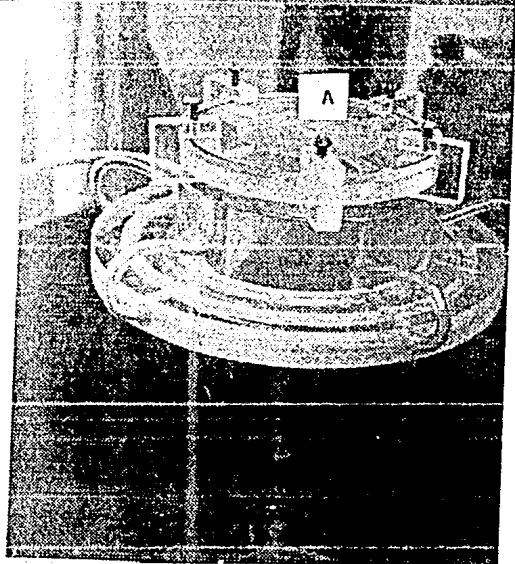
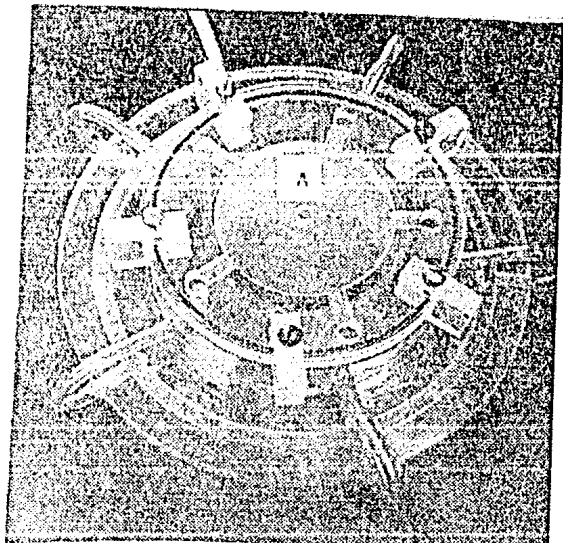
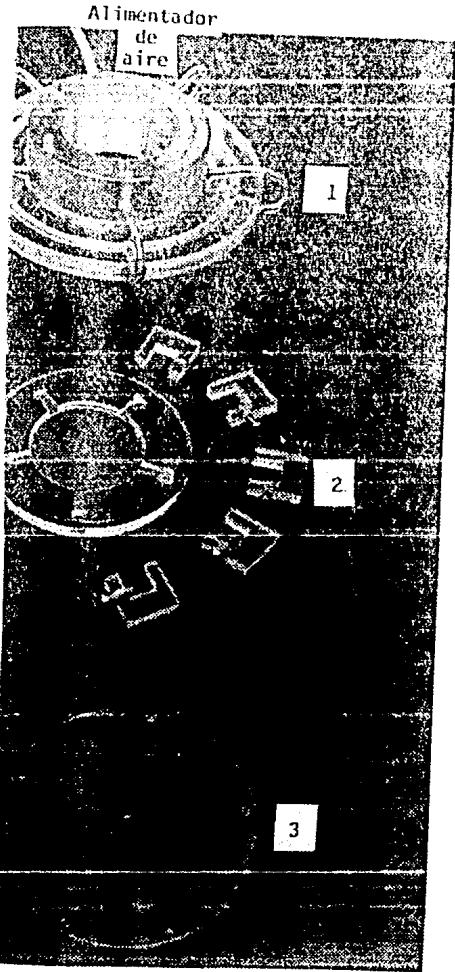


Figura 10. Dispositivo empleado para la inmovilización de células de *E. coli* por atomización a mayor nivel. Este sistema consta de 3 partes, la señalada como 1 esta compuesta por cinco unidades a las cuales se les adaptan pipetas Pasteur, cuenta con un alimentador de aire diseñado de forma tal que a cada unidad le corresponde el mismo flujo de aire. La parte señalada como 2 se adapta a 1 y finalmente se adapta la 3. La alimentación de la mezcla células/agar se realiza por A.

Tabla 13. Comparación de los métodos de inmovilización por dispersión con aire y dispersión líq-líq.

	DISPERSION con aire	DISPERSION líq-líq.
PREPARACION	COMPLICADA	SENCILLA
CONTROL DEL PROCESO	DIFICIL	FACIL
PRODUCTIVIDAD	BAJA	*
ESCALAMIENTO	COMPLICADO	POSIBLE
REPRODUCIBILIDAD	NO	SI

*Hasta el momento se tienen las condiciones para producir 225 g de biocatalizador en 15 min, producir esta misma cantidad por dispersión con aire consumiría de 45 a 60 min.

controlar las variables que influyen en el tamaño de partícula, por otro lado, presenta mayores probabilidades de escalamiento. Estas razones dieron la pauta para decidir emplear este método en el desarrollo del proyecto.

Elección del soporte.

La elección del soporte más apropiado se realizó en base a las siguientes consideraciones:

1. Capacidad de atrapamiento, definida como g de células/g de soporte.
2. Facilidad de manejo de la suspensión células-gel para llevar a cabo la inmovilización.
3. Estabilidad a la agitación rotatoria.

Considerando los criterios de disponibilidad, factibilidad técnica y antecedentes en la elaboración de biocatalizadores se probaron tres biopolímeros: gelatina, carragenina y agar. Como primera etapa en la caracterización de cada sistema, se determinó la capacidad de atrapamiento del sistema, seleccionando aquella que permite un adecuado manejo de la suspensión células-gel. Los biocatalizadores así obtenidos son entonces sometidos a pruebas de estabilidad a la agitación, seleccionando el soporte que permite la producción del biocatalizador con las mejores condiciones de estabilidad a la agitación y capacidad de atrapamiento.

Gelatina.

En la fig. 11 se muestran los resultados referentes a la capacidad de atrapamiento de la gelatina. Se puede observar que entre mayor es la relación células/gelatina, mayor es la actividad del biocatalizador. Se seleccionó a una relación células/gelatina de 6.6 g/g en 100 ml de preparación. Para relaciones mayores el manejo de la suspensión es difícil.

Al realizar pruebas de estabilidad, se observó que antes de 24 hrs el biocatalizador se desintegra. Ante la posibilidad de que la concentración de células usada fuera muy alta se disminuyó a 3.3 g cel/g del gel: el biocatalizador así elaborado resistió solamente 48 hrs. La segunda hipótesis planteaba la presencia de actividad proteolítica en células. Se decidió entonces medir esta actividad, las determinaciones se llevaron a cabo a diferentes valores de pH: 7, 7.5 y 8, usando como sustrato caseína y midiendo los productos de hidrólisis como se menciona en la sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la tabla 14. Como se puede observar las densidades ópticas se incrementan al paso del tiempo, lo cual nos indica la presencia de actividad proteolítica, particularmente importante a pH de 7.5, valor al que se llevó a cabo la inmovilización y la reacción enzimática. Esta situación descalifica a la gelatina como material de soporte.

Carragenina.

Al emplear la carragenina como soporte a diferentes

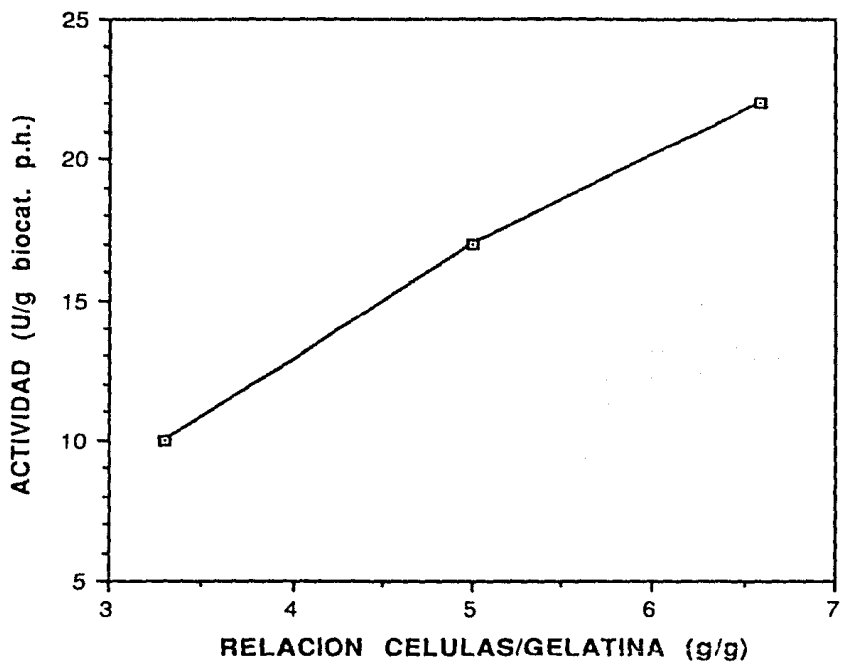


Figura 11. Actividad del biocatalizador en función de la relación células/gelatina, para un tamaño de partícula de 0.297 nm.

Tabla 14. Actividad proteolítica en células de *E. coli* ATCC 9637 (Condiciones de reacción 37 °C, amortiguador de fosfatos, sustrato caseína al 1%).

pH	DO _{280nm}				
	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr	5 hr
7	0.6225	0.7015	0.7400	0.8300	0.9320
7.5	0.6675	0.8220	0.8740	1.0600	1.0800
8	0.5950	0.7270	0.7640	0.8670	0.8880

relaciones células/carragenina (1.5, 2.25, 4.5 y 9 g/g), no fue posible obtener biocatalizadores esféricos dado que la suspensión células-carragenina gelifica a temperaturas del orden de 50 °C, dificultando el manejo.

Agar.

Se utilizó agar como soporte empleando las relaciones células/ agar de 2.25, 4.5, 8.25 y 11.25 g/g. Se observó que hasta 8.25 g/g tanto el manejo como la capacidad de formar catalizadores esféricos es factible. Se realizaron pruebas de estabilidad y los biocatalizadores no se desintegraron aún después de 360 hrs de agitación a 37 °C.

En la tabla 15 se presenta un resumen de los resultados. Con base en los resultados antes obtenidos, se decidió continuar el desarrollo del proyecto inmovilizando las células en agar.

Aspectos del sistema a inmovilizar (temperatura y pH de inmovilización).

En lo que se refiere al soporte, Padilla (1986), reporta que entre las dos marcas comerciales de agar (Difco y Bioxón) no existen diferencias notables para la formación de geles, y que a valores de pH comprendidos entre 6 y 8.5 la formación y estabilidad del gel resulta muy adecuada.

Para seleccionar los valores de pH y temperatura de inmovilización se determinó la estabilidad de la enzima en las células intactas a dichos parámetros. Durante el proceso de inmovilización, es necesario manejar temperaturas de 50-55 °C para facilitar el manejo de la suspensión células-gel. Por esta razón se llevaron a cabo estudios de estabilidad a 55 °C a valores de pH de 6, 6.5 y 7.5. Valores de pH inferiores a 6, la estabilidad del gel no es suficientemente buena (Padilla, 1986), mientras que valores superiores de 7.5 la enzima es menos estable. Los resultados se muestran en la fig. 12. Se puede apreciar que la enzima presenta máxima estabilidad a pH 6, con un tiempo de vida media de 5 horas. De acuerdo a estos resultados las condiciones de pH y temperatura seleccionadas fueron 6 y 55 °C, respectivamente. Sin embargo, al realizar los ensayos a estas condiciones se formó una emulsión muy estable, aún a bajas velocidades de agitación, situación que hace que se formen esferas muy pequeñas y de difícil recuperación. Para aplicar esta metodología evitando la formación de emulsiones estables, fue necesario manejar la suspensión células-agar a una temperatura menor. Para ello fue necesario determinar la temperatura mínima de la suspensión células-agar, a la que aún no gelificaba, resultando ser de 42 °C. Los experimentos se llevaron a cabo a esta temperatura, obteniendo buenos resultados.

Estudio para la selección del tamaño de partícula.

La selección del tamaño de partícula se realizó tomando en

TABLA 15. SELECCION DEL SOPORTE

soporte	máx. capacidad de atrapamiento g cél./ g de soporte	manejo	estabilidad* (hrs)
gelatina	6.6	adecuado	24
carragenina	--	difícil	-
agar	8.25	adecuado	360

* integridad del biocatalizador a la agitación: 200 rpm, pH 7.8
temperatura 37° C.

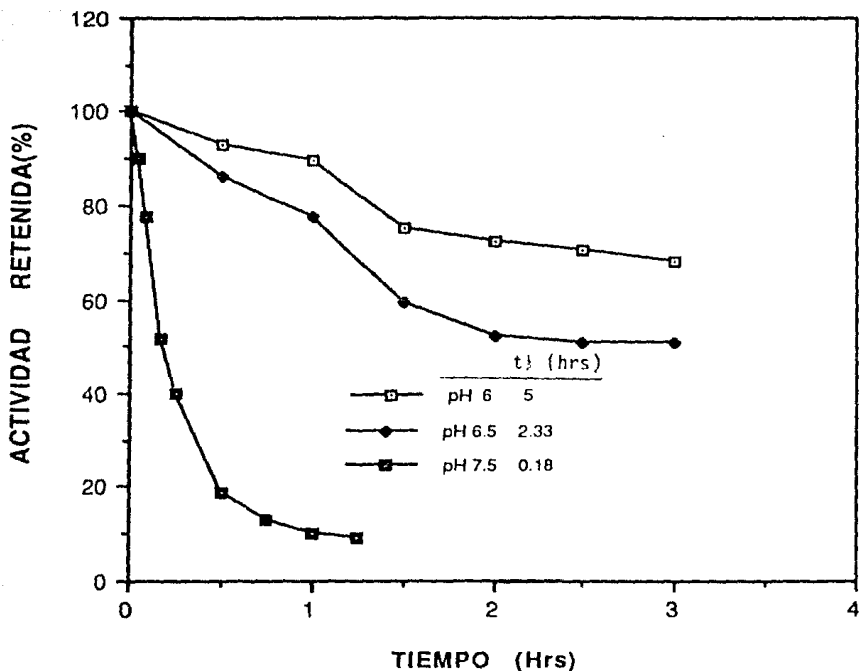


Figura 12. Efecto del pH en la estabilidad de la enzima contenida en células de *E. coli* a 55 °C. Las células resuspendidas. Las células se resuspenden en amortiguador de fosfatos pH 6, 6.5 y 7.5 en baño agitado y se determina actividad a diferentes tiempos a 37 °C, pH 7.8.

consideración dos factores: altos valores de actividad específica y de factor de efectividad.

Primeramente se determinó la actividad de los biocatalizadores obtenidos a diferentes relaciones células/agar, observándose que la actividad de los biocatalizadores se incrementa a medida que se aumenta la relación células/agar (fig. 13). Se observa además que la actividad es mayor en los tamaños de partícula mas pequeños (malla 50 y 80). Esta tendencia se aprecia en forma mas clara en la fig. 14.

En lo que se refiere al comportamiento en términos de factor de efectividad, se observa que éste disminuye a medida que se incrementa la relación células/agar. No obstante, las mallas 50 y 80 tienen valores de factor de efectividad superiores a 0.9. (figs. 15 y 16).

En conclusión los biocatalizadores malla 50 y 80 con la relación células-agar 8.25, son los que presentan mayor actividad específica, con factores de efectividad superiores a 0.9. No obstante, el tamaño de partícula malla 80 presenta algunos problemas técnicos: es un tanto difícil eliminar el aceite remanente y por otro lado al emplearlo en un reactor tanque agitado es difícil su manejo, por lo que se seleccionó el tamaño de partícula malla 50.

Selección de las condiciones de inmovilización.

El objetivo de este estudio fue el seleccionar las condiciones de inmovilización que nos llevarán a obtener óptimos rendimientos de esferas malla 50, tamaño elegido como mas adecuados para este sistema. En la literatura se menciona que son varios los parámetros que influyen en la distribución y tamaño de partícula: temperatura, concentración de soporte, velocidad de agitación, tiempo de mezclado, tipo de impulsor, relación células-agar/aceite, entre otras. En lo que se refiere al tiempo de mezclado (15 min), concentración de soporte (2%) y la relación células-agar/aceite (30%), son parámetros establecidos con anterioridad en trabajos realizados en el laboratorio (Castillo et al., 1992), que se tomaron como iniciales.

Al llevar a cabo el proceso de inmovilización según lo ya establecido, se observó que no había reproducibilidad en los resultados, probablemente por la forma en que se agregaba la mezcla células-agar al aceite, la cual se realizaba en una sola etapa como se ilustra en la fig. 6. De esta manera se forman gradientes de temperatura a lo largo del proceso de inmovilización, que dependen de la rapidez con que se adicione la suspensión células-agar al aceite. Por lo que se pensó entonces llevar a cabo la inmovilización, en condiciones isotérmicas globales (ambas fases aceite y la suspensión células-agar a la misma temperatura). De esta manera se obtuvieron resultados reproducibles.

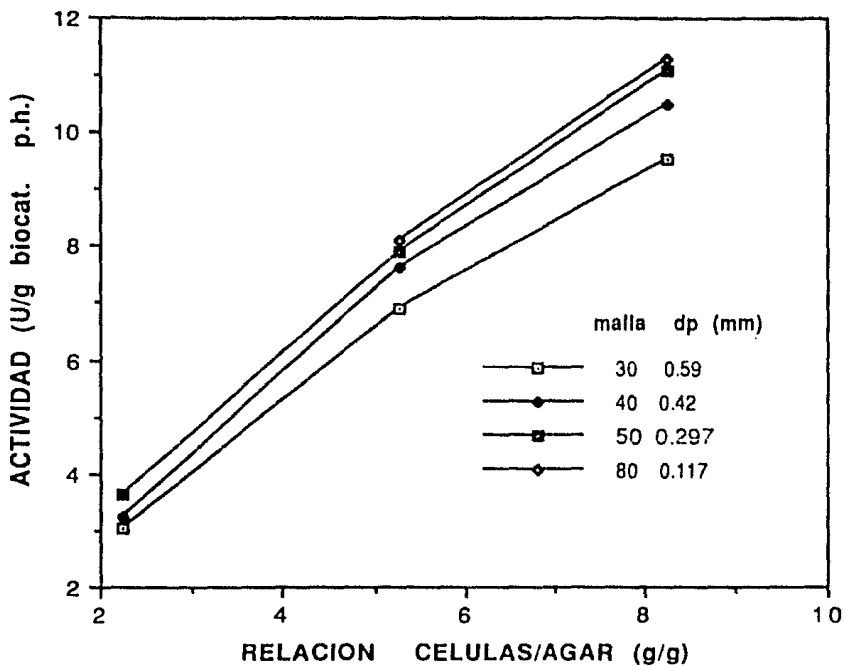


Figura 13. Actividad del biocatalizador en función de la relación células/agar (p/p) para diferentes tamaños de partícula.

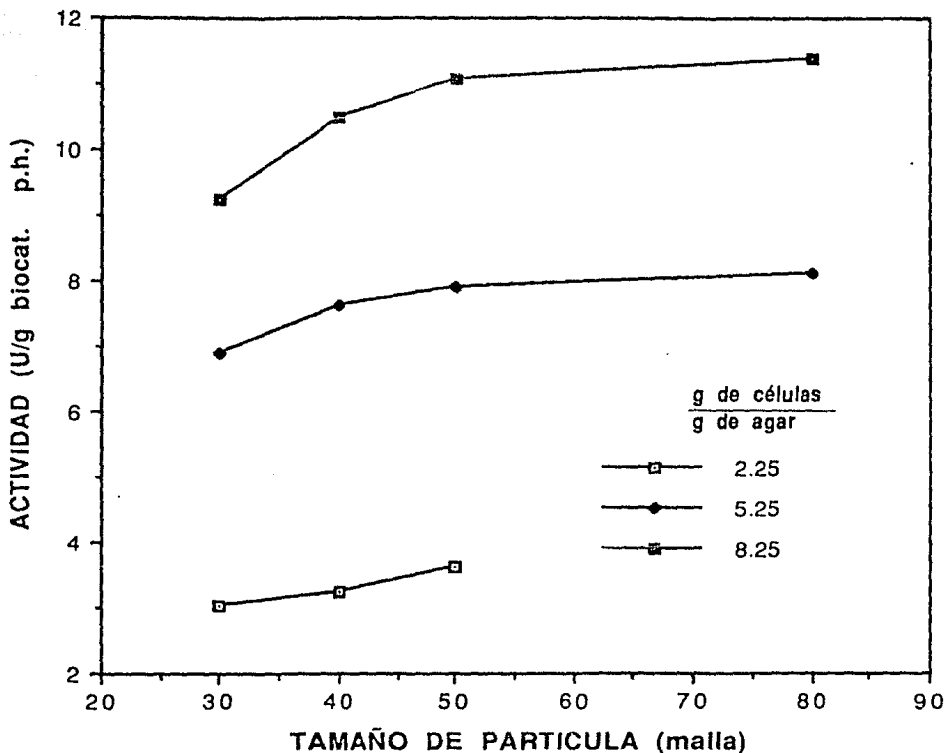


Figura 14. Actividad del biocatalizador en función del tamaño de partícula para diferentes relaciones células/agar (p/p).

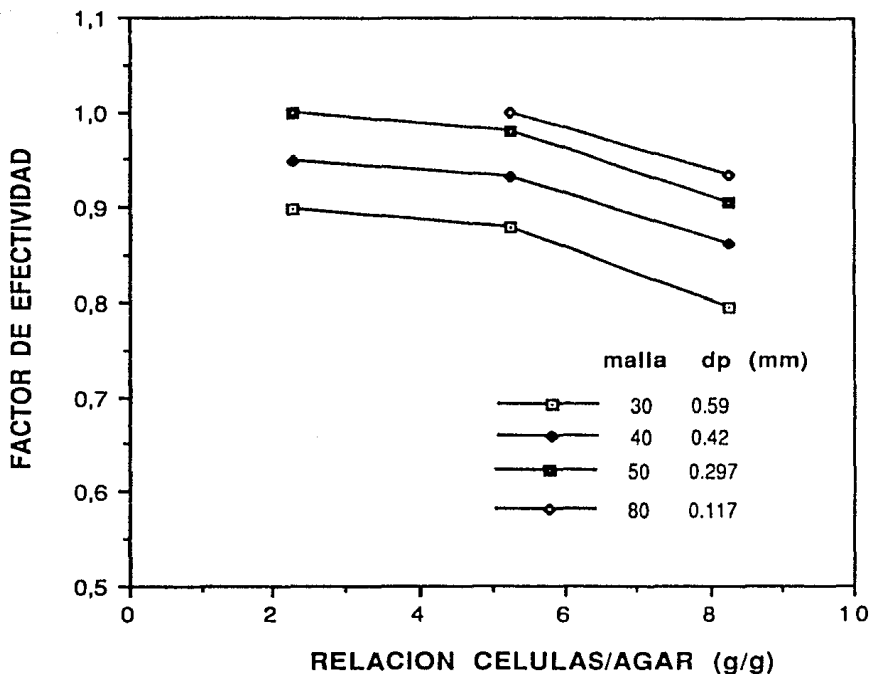


Figura 15. Factor de efectividad en función de la relación células/ágar (p/p) para diferentes tamaños de partícula.

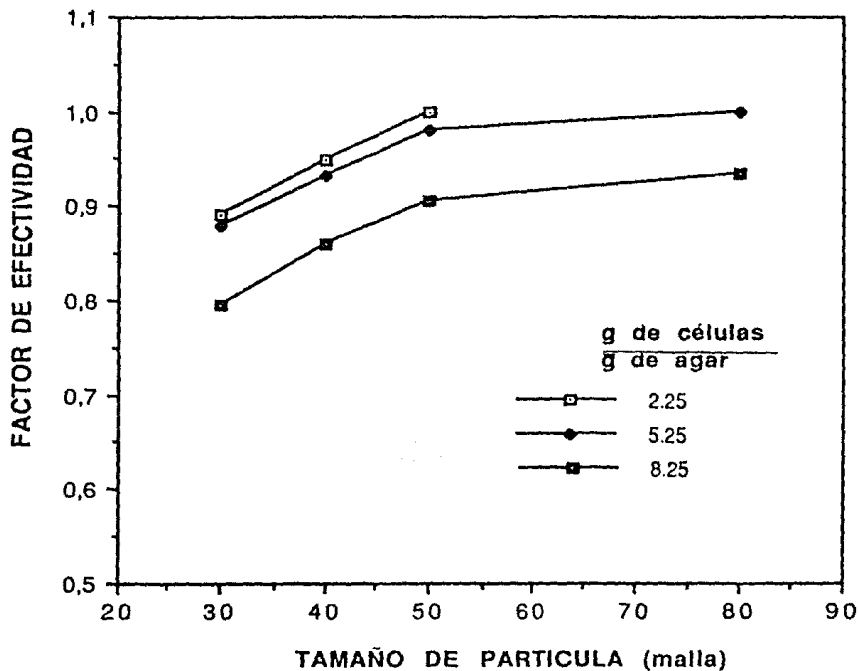


Figura 16. Factor de efectividad en función de la relación células/agar (p/p) para diferentes tamaños de partícula.

Selección de las condiciones de agitación

La selección del tipo de impulsor y velocidad de agitación y se llevó a cabo a nivel de 975 ml (225 ml de suspensión células-agar y 750 ml de aceite), las dimensiones y características del tanque se describen en la sección de materiales y métodos. Se probaron dos tipos de impulsores: el A-310 y el Rhuston, a diferentes velocidades de agitación. En el caso del impulsor A-310, se realizaron pruebas a 500, 390, 300 y 250 rpm. A 500 rpm se formaron partículas muy pequeñas, difíciles de recuperar. Los resultados a 390 y 300 rpm se muestran en la fig. 17 en la cual se grafica el % en peso de cada uno de los tamaños contra la velocidad de agitación. Se observa que a 390 rpm, el tamaño de partícula malla 50 se encuentra en mayor proporción (32%) respecto a los demás tamaños, al disminuir la velocidad de agitación a 300 rpm, dicha proporción se incrementa a 35 %, lo cual indica que para lograr incrementar la proporción del tamaño malla 50, se requeriría disminuir la velocidad de agitación. No obstante, cuando la inmovilización se llevó a cabo a 250 rpm, no se logra un buen mezclado por lo que gran parte la suspensión células-agar no se dispersa.

En la fig. 18 se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizó el impulsor Rushton. Se observa que a 500 rpm se obtiene la mayor proporción del tamaño malla 50 (44.5%). Al incrementar la velocidad de agitación a 600 rpm y disminuirla a 380 rpm, dicha proporción decrece. Por lo tanto se puede concluir 500 rpm es la velocidad de agitación requerida para obtener la mayor proporción de biocatalizador tamaño malla 50. El rendimiento de inmovilización fue de 90-95%, con la siguiente distribución de partícula malla 200: 4.5%, malla 80: 15%, malla 50: 44.5%, malla 40: 29.5% y malla 30: 6.2%

Al comparar los resultados para ambos impulsores, se observa que los mejores resultados se obtienen con el impulsor Rhuston. Sin embargo, la proporción de tamaño malla 50 aún así es relativamente baja, si se considera que mas del 50% del biocatalizador obtenido no se utilizaría. Analizando las proporciones de los tamaños de partícula en conjunto con sus factores de efectividad, se determino que al trabajar solamente con los tamaños de partícula malla 40, 50 y 80 el porcentaje de biocatalizador utilizable se incrementa a 89%, el factor de efectividad del sistema es 0.9. Ahora bien, si se emplean todos los tamaños, el factor de efectividad disminuye a 0.88.

Para decidir cual sería la opción mas adecuada, se realizó una estimación preliminar del costo del biocatalizador para los diferentes rendimientos (anexo III), con estos resultados se determinó el costo de producción del 6-APA en función del número de lotes, para ello se hicieron las siguientes consideraciones: a) se requiere una carga de 240 U para producir 1 gramo de 6-APA, b) se requieren 2 Kg de penicilina para producir 1 Kg de 6-APA, c) el costo de 1 Kg de penicilina es de 30 dólares y d) el costo de

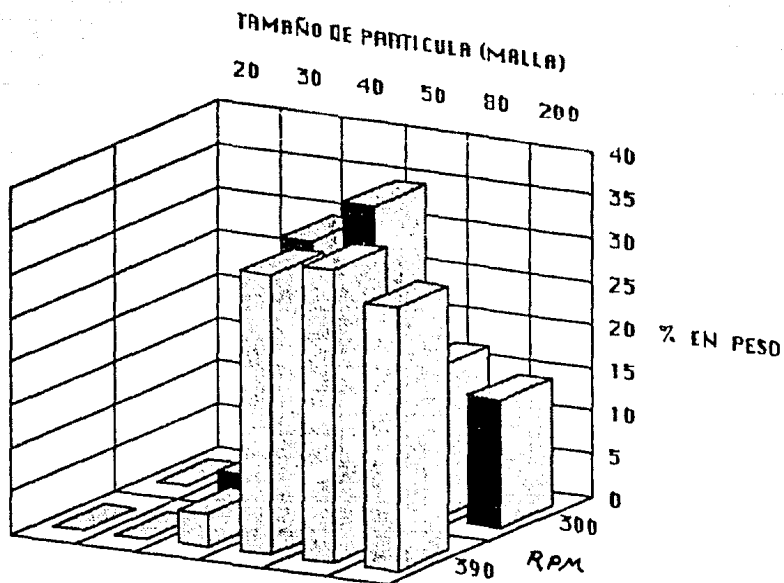
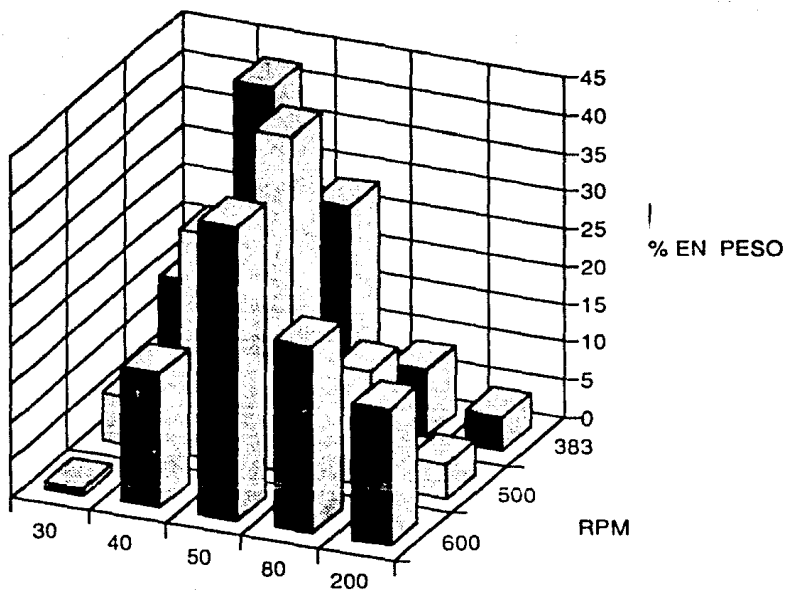


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula en función de la velocidad de agitación para el impulsor A-310. Temperatura de inmovilización 42 °C, relación células/agar (g/g) 8.25.



TAMAÑO DE PARTICULA (MALLA)

Figura 18. Distribución del tamaño de partícula en función de la velocidad de agitación para el impulsor Rushton, temperatura de inmovilización 42 °C.

proceso enzimático (sin incluir el costo de la enzima) es de 1 dólar/ Kg de 6-APA.

El costo del biocatalizador considerando que solo se emplea el tamaño malla 50, resultó ser de 567.69-600 (I) dólares, si se emplean los tamaños malla 80, 50 y 40 el costo disminuye a 284-300 (II) dólares y cuando se consideran todos los tamaños del biocatalizador el costo es de 253-267 dólares (III). En la fig. 19 se muestra el costo de producción del 6-APA en función del número de lotes para un biocatalizador con una actividad específica de 10 U/g, se observa que para los costos de 267 y 300 dólares (casos II y III) el costo de producción es significativamente menor que en el caso del biocatalizador de 600 dólares (caso I) y por otro lado el comportamiento de II y III es muy similar, por lo que una buena opción es emplear una mezcla de los tamaños 40, 50 y 80 (caso II), ya que además en conjunto presentan un factor de efectividad de 0.9.

Es importante notar que el número de lotes que se tendrían que llevar a cabo es muy alto, esto debido a la baja actividad del biocatalizador. En la fig. 20 se muestra el número de lotes que se tendrían que realizar en función de la actividad específica del biocatalizador, para obtener el precio de venta del 6-APA (80 dólares), considerando que el costo del biocatalizador es de 300 dólares. Se observa que a medida que se incrementa la actividad específica de biocatalizador el número de lotes disminuye notablemente.

En conclusión las condiciones de inmovilización establecidas son (fig. 21):

Soporte:	Agar
Relación células/agar	8.25(16.5% células/2% agar)
Temperatura de inmovilización	42°C
pH de inmovilización	6
Relación suspensión cél/agar en aceite	30%
Velocidad de agitación	500 rpm
Tipo de impulsor	Rushton
Tiempo de contacto	15 min
Condiciones de curtido:	las mencionadas en la sección de materiales y métodos.

Rendimiento total de la inmovilización	90-95%
Rendimiento considerando que se emplean los tamaños de biocatalizador malla 40, 50 y 80	80.1-84.5
Peso seco biocatalizador	13%

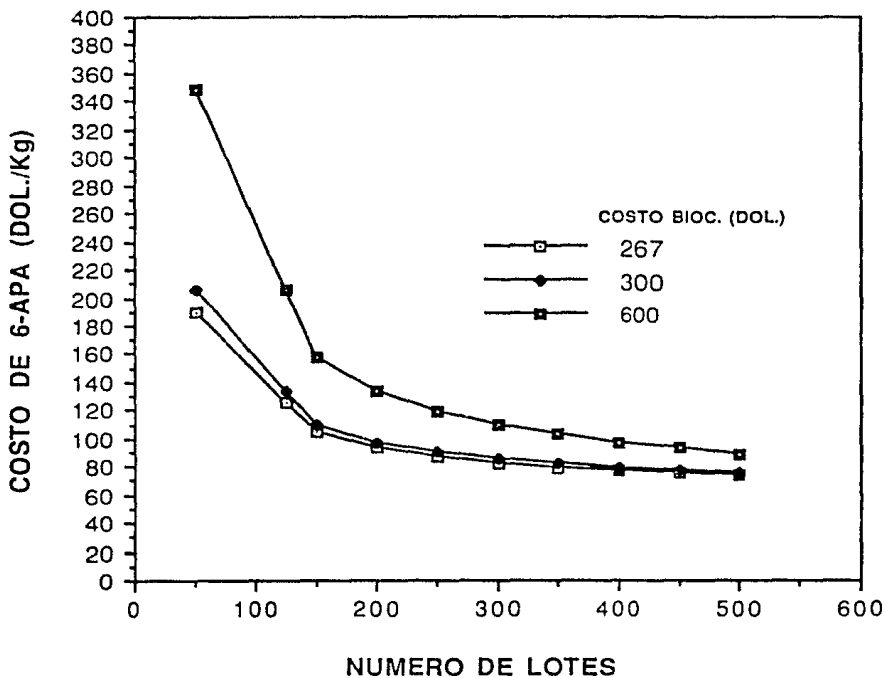


Figura 19 Efecto del número de lotes de reutilización del biocatalizador de penicilino amidasa en el costo de producción del 6-APA para diferentes costos del biocatalizador.

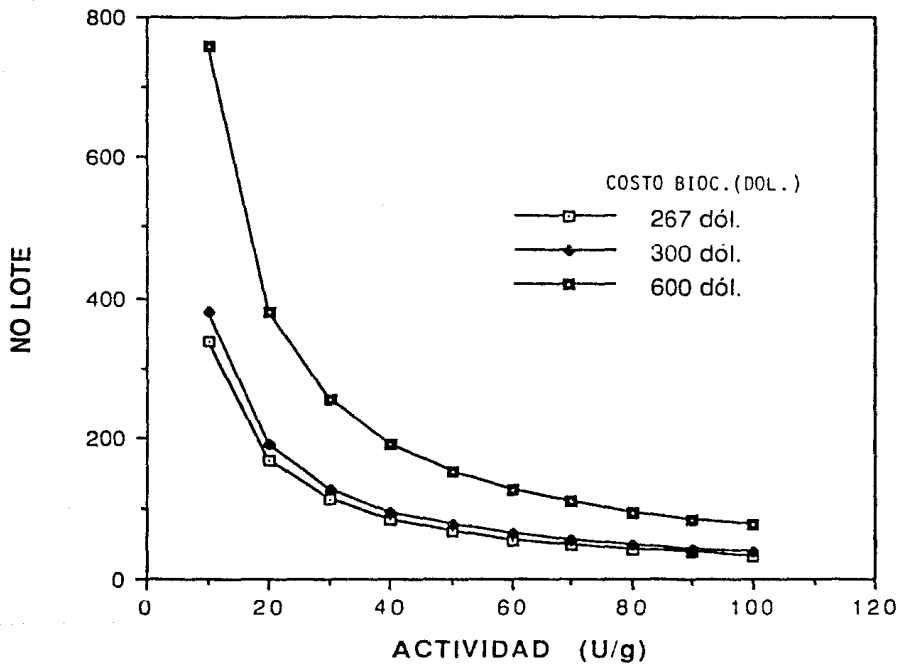


Figura 20. Efecto de la actividad del biocatalizador en el número de lotes de reutilización necesarios para obtener el precio de venta del 6-APA (80 Dól./Kg).

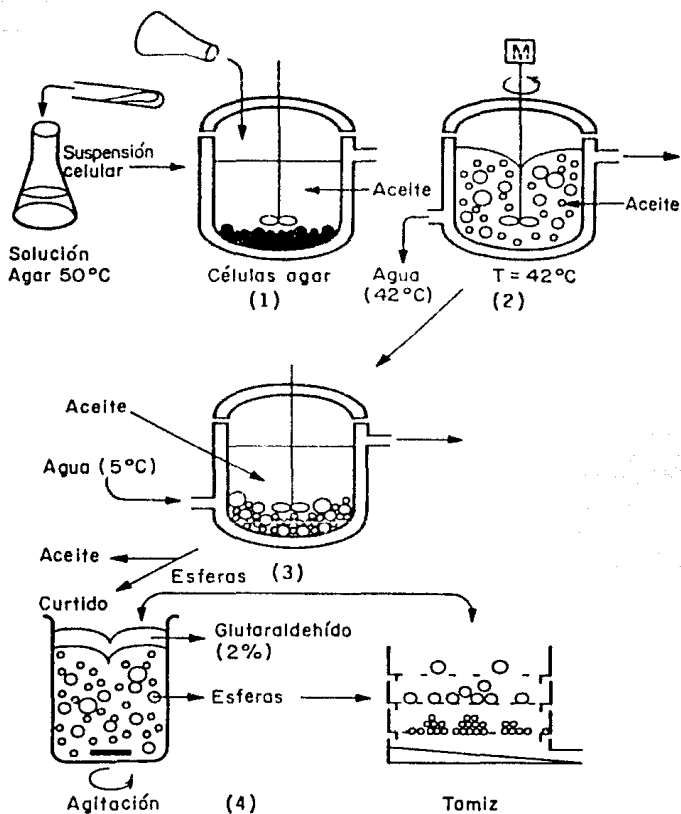


Figura 21. Metodología de inmovilización propuesta. 1. Adicionar la suspensión cél./agar a temperatura de 45-50 °C a la fase oleosa previamente calentada a 45 °C, esperar a que ambas fases tengan la misma temperatura. 2. Iniciar la agitación y prolongarla durante 15 min. 3. Enfriar hasta llegar a 10 °C, separar las esferas de la fase oleosa. 4. Curtir con glutaraldehído al 2%, finalmente lavar y tamizar.

CARACTERIZACION DEL BIOCATALIZADOR.

Comportamiento del factor de efectividad a diferentes concentraciones de sustrato.

En el diseño de reactores con células o enzimas inmovilizadas es importante considerar el efecto de la concentración de sustrato en el factor de efectividad. De hecho, en el diseño de reactores frecuentemente se considera constante. Sin embargo, como se aprecia en la fig. 22 existe variación con la concentración de sustrato. En este caso se observa que para el tamaño de partícula seleccionado, el factor de efectividad permanece constante mientras la concentración de sustrato se mantiene por arriba de 10 g/l de PGK. Esto quiere decir que en una reacción de hidrólisis con 100 g/l de PGK, al final de la reacción el control pasa de ser cinético a difusional.

Este mismo estudio se realizó para el biocatalizador manufacturado con gelatina, para dos tamaños de partícula: con y sin problemas difusionales. Estos resultados se discuten en el artículo *Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects*, publicado en la revista *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 13 1991. (anexo 1)

Caracterización físicoquímica del biocatalizador.

Efecto de la temperatura en la actividad de las células inmovilizadas.

En la fig. 23 se presentan los resultados correspondientes al comportamiento del biocatalizador con respecto a la temperatura. Se observa que la actividad catalítica se incrementa conforme aumenta la temperatura de reacción, hasta llegar a un óptimo que este caso se encuentra entre 55 y 60 °C a pH 7.8 y 7.5 respectivamente. Al sobrepasar esta temperatura se aprecia una acelerada pérdida de actividad enzimática. Comparando estos resultados con los obtenidos para células libres (recuadro) se aprecia que la temperatura óptima es mayor para el sistema inmovilizado, probablemente porque el proceso de inmovilización da protección a la enzima incrementado su estabilidad.

A partir de los datos anteriores se obtuvo una energía de activación de 9,475 cal/mol para la enzima en el biocatalizador con células, valor muy semejante al obtenido con células libres (9,406 cal/mol), lo cual indica que el biocatalizador de células inmovilizadas no presenta problemas difusionales. Los resultados aparecen en la fig. 24. Adicionalmente dichos valores se encuentran dentro de los intervalos reportados en la literatura (tabla 16).

Efecto del pH en la actividad del biocatalizador.

El perfil de pH para células inmovilizadas se presenta en la fig. 25 a 37 y 55 °C. Se seleccionó 37 °C pues la mayor parte de los procesos industriales se conducen a esta temperatura, mientras

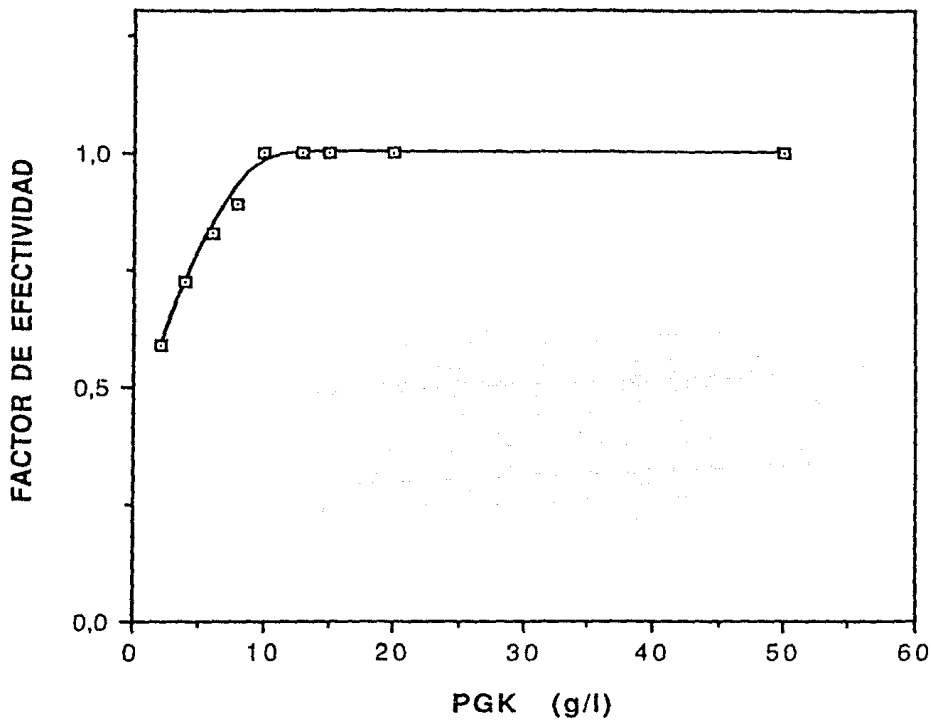


Figura 22. Efecto de la concentración inicial de PGK en el factor de efectividad, para el biocatalizador de PA malla 50.

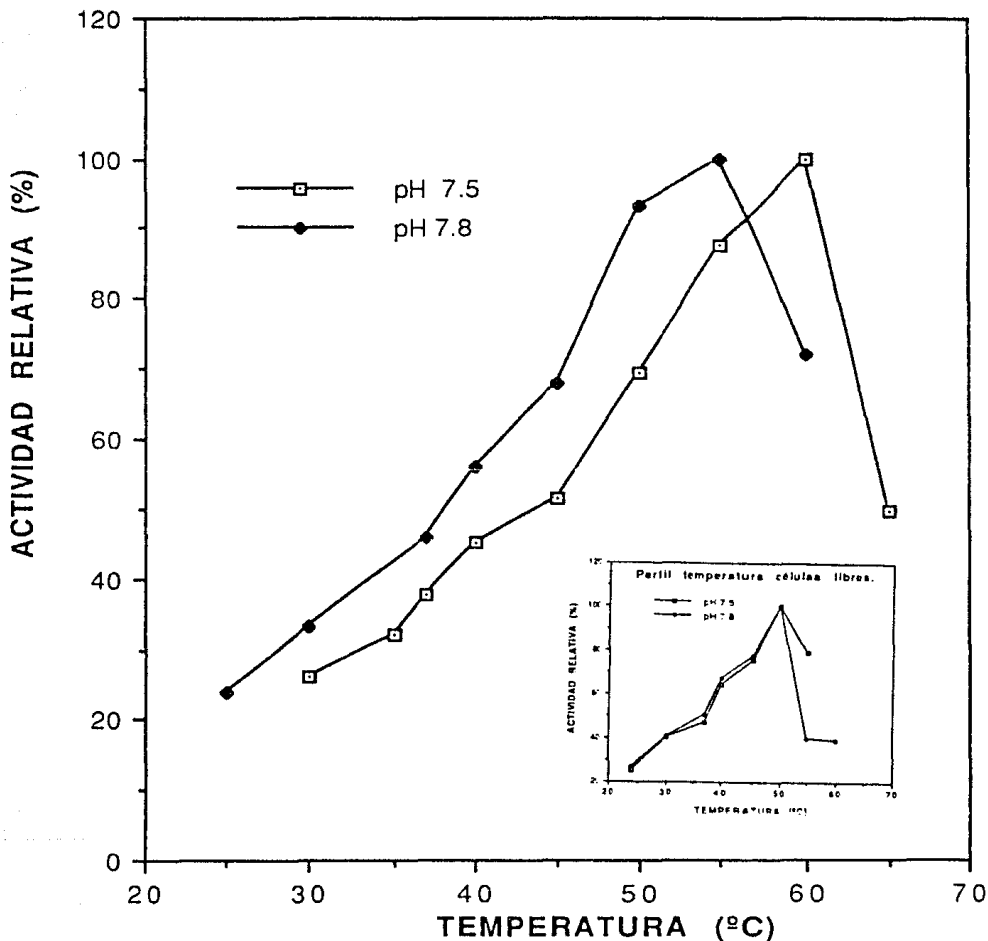


Figura 23. Efecto de la temperatura en la actividad del biocatalizador y células (recuadro) a valores de pH 37 y 55 °C. Se determinó actividad a los diferentes valores de temperatura en amortiguador de fosfatos.

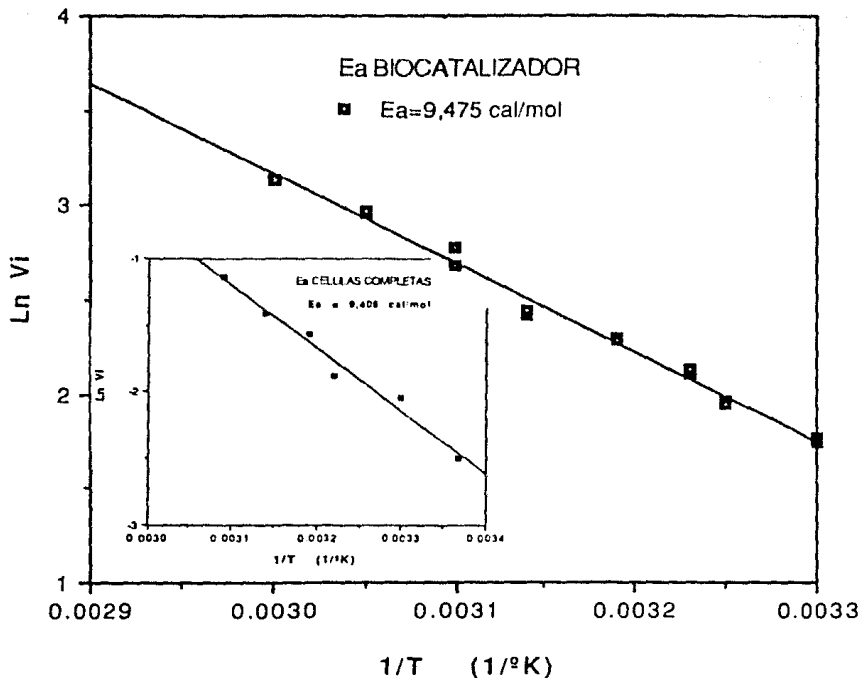


Figura 24. Energía de activación para la hidrólisis de bencil penicilina del sistema inmovilizado y libre (recuadro). Las determinaciones se realizaron por duplicado, en la grafica se muestra el promedio de las determinaciones.

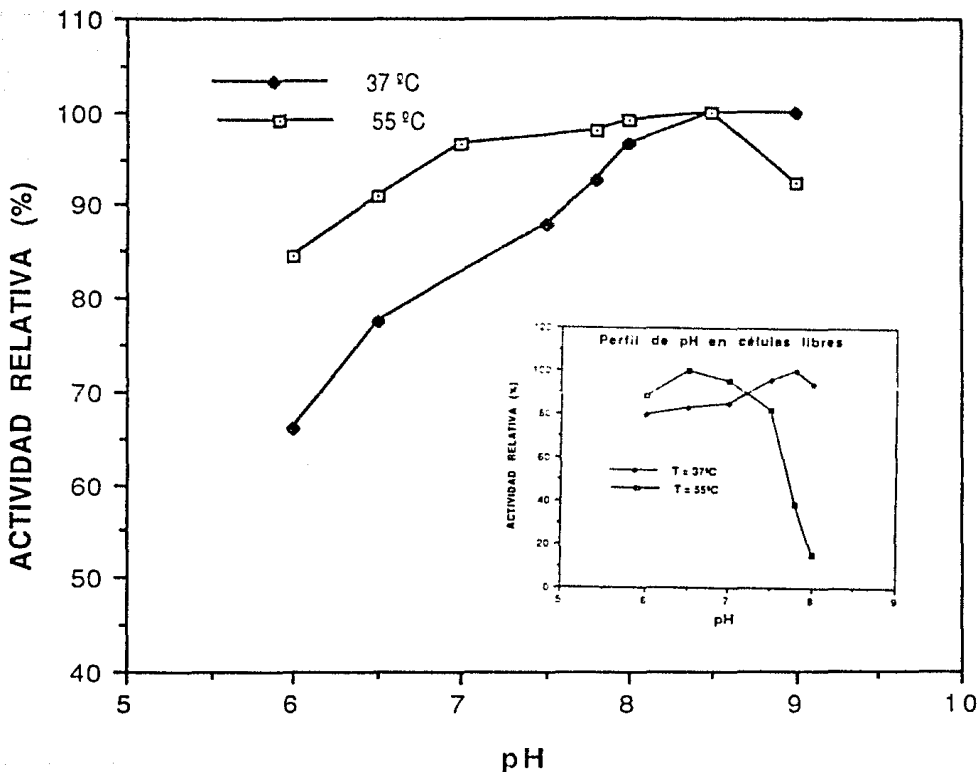


Figura 25 Efecto del pH en la actividad del biocatalizador y células (recuadro) a 37 y 55 °C. El biocatalizador y células se les determinó actividad a los diferentes valores de pH en amortiguador de fosfatos.

Tabla 16. Valores de pH, temperatura y E_a para penicilino acilasa.

Sistema	pH óptimo	T óptima	E_a	Referencia
<i>E. coli</i> NCI 8748A	8.5 - 8.0	---	8550	Balansingham et al., (1972)
<i>E. coli</i>	8.0 - 8.5	42-45	--	Bryjak et al., (1989)
Semacilasa PV acilasa	6.5	45	6348	Novo, (1987)
Enzima inmovi- lizada de <i>E.</i> <i>coli</i> ATCC 9637	7.5 - 8.0	49	10963	Ospina, (1992)

que 55 °C corresponde a la temperatura óptima. Se observa un máximo de actividad entre pH 7.8 - 9 a 37 °C, y 7 - 8.5 a 55 °C. Al comparar estos resultados con los del sistema de células intactas se observa que el pH óptimo del sistema inmovilizado se mueve hacia la parte alcalina tanto a temperatura de 37 como de 55 °C.

De estos resultados se puede concluir que las condiciones óptimas de actividad del biocatalizador son temperatura de 55-60 °C y pH de 7.8 a 9. En la literatura se reportan valores de pH óptimos entre 7.5 y 8.5, tanto para enzima en células, libres o inmovilizadas. A pesar de que la temperatura óptima es 55-60 °C, la mayoría de los biocatalizadores de PA se emplean a temperaturas menores de 40 °C. Esto es debido tanto a la estabilidad de la penicilina y el 6-APA, así como de la enzima. Por esta razón resulta importante de realizar estudios de estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH y temperaturas.

Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador

En la fig. 26 se muestran los resultados de estabilidad del biocatalizador a temperaturas de 37 y 55 °C (recuadro), pH 6, 7.5 y 7.8. Se aprecia que a 37 °C se presenta la estabilidad máxima, mientras que a 55 °C el biocatalizador sufre una desactivación acelerada, sobre todo a valores de pH 7.5 y 7.8. Es importante señalar que a pH de 6 se presenta la máxima estabilidad en ambos casos.

Al analizar la caída de la actividad a lo largo del tiempo a cada una de las condiciones, se observó que en una grafica el ln de la actividad contra tiempo se obtiene una línea recta (fig. 27), lo que indica que la desactivación sigue una cinética de primer orden, caracterizada por una constante de desactivación (que corresponde a la pendiente de la línea recta). Esta constante puede relacionarse con el tiempo de vida media del biocatalizador:

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

En la tabla 17, se resumen estos resultados, observándose que el tiempo de vida media a pH 6 y 37 °C es 750 veces mayor que el correspondiente a la temperatura de 55 °C.

Efecto del pH en la estabilidad de células inmovilizadas.

De los resultados discutidos en el punto anterior se observa que la estabilidad del biocatalizador depende en gran medida del pH. Esta dependencia es de fundamental importancia por la forma en que se desarrolla la reacción, ya que es necesario regular el pH por la generación de AFA.

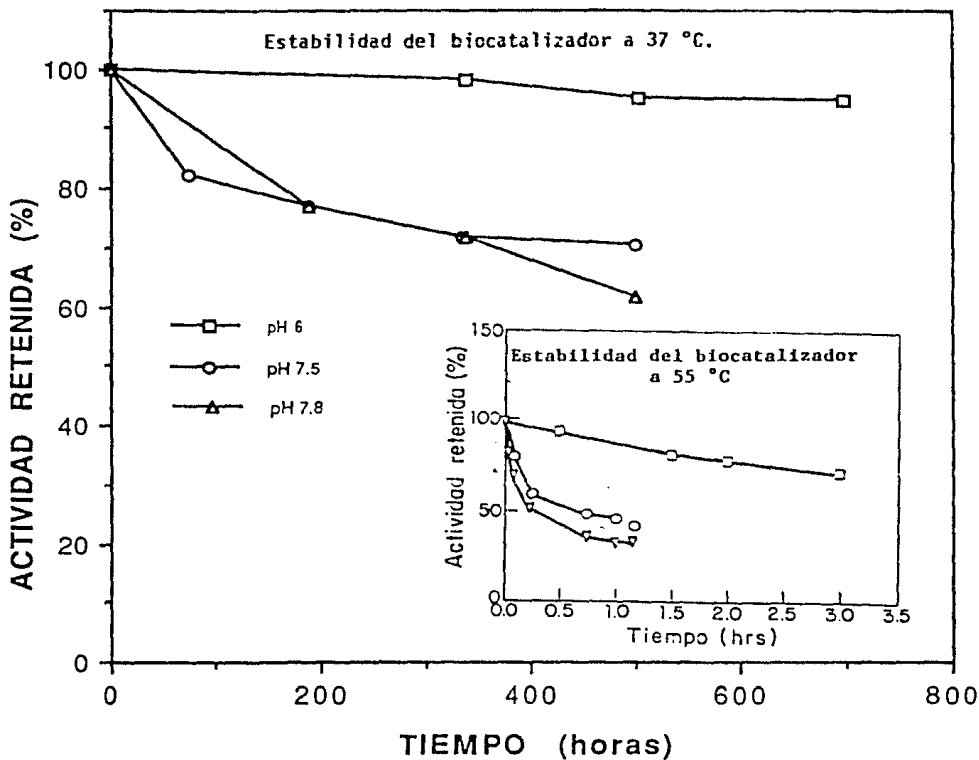


Figura 26 Efecto de la temperatura en la estabilidad del biocatalizador. El biocatalizador se incubó en amortiguador de fosfatos 0.1 M, en baño agitado y se determinó actividad a pH 7.8 y 37 °C.

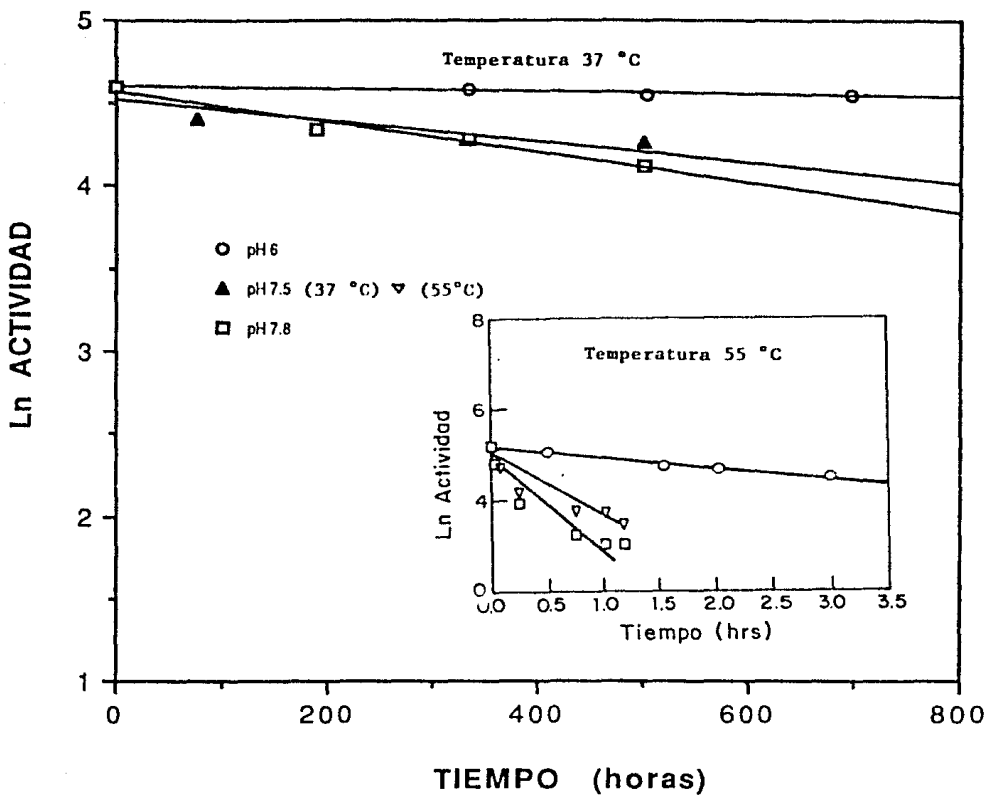


Figura 27. Representación grafica para determinación de la constante de desactivación de primer orden a 37 °C y 55°C (recuadro).

Tabla 17. Efecto de la temperatura en el tiempo de vida media del biocatalizador.

pH	$t_{1/2}$ (h)		$t_{1/2}(37\text{ }^{\circ}\text{C})$ $t_{1/2}(55\text{ }^{\circ}\text{C})$
	37 °C	55 °C	
6	4619.30	6.09	750.5
7.5	774.00	0.86	900.0
7.8	733.02	0.45	1628.8

Se efectuaron estudios de estabilidad a una temperatura de 37 °C a valores de pH de 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 7.8 y 8. los resultados se muestran en la fig. 28. Se observa que la máxima estabilidad se logra a pH 6, y que el efecto de la desactivación a valores de pH alcalino es muy marcado.

De acuerdo con estos resultados, nos encontramos que en base a la estabilidad del biocatalizador las condiciones óptimas para su utilización serían pH 6 y temperatura de 37 °C. Sin embargo, considerando los valores de pH y temperatura de actividad óptimos, las condiciones de operación serían pH 7.8-9 a 37 °C, y pH 7-8.5 a 55 °C. Como se puede apreciar las condiciones óptimas de estabilidad se contraponen con las condiciones óptimas de actividad. En la fig. 29 presenta el efecto integral de ambos parámetros, se puede observar que a pH 6.5 se pueden obtener buenos valores de actividad y estabilidad, aunque no los óptimos.

Estabilidad operacional del biocatalizador.

En los estudios de estabilidad al almacenamiento presentados, queda plenamente demostrado que el factor crítico es el pH. En condiciones de reacción es necesario regularlo, por lo que se generan gradientes de pH, de cuya magnitud depende el control del proceso. En un estudio de simulación por computadora realizado por Gómez et al., (1992), se demuestra que la estabilidad de la enzima en condiciones de proceso es dependiente del gradiente de pH que se genere. Así, entre mayor sea este gradiente mayor es la desactivación, de ahí la necesidad de realizar pruebas de estabilidad en condiciones de operación en producción.

Para este efecto se llevaron a cabo 40 hidrólisis sucesivas de 2 horas cada una, en las siguientes condiciones: pH 7.5-7.6 y 37 °C, 60 U/g de PGK, 6% de PGK. En cada reacción se midió la conversión y la actividad del biocatalizador cada 10 hidrólisis. Los resultados se muestran en la fig. 30. Se observa que la conversión se oscila alrededor de 90-95% y que la actividad del biocatalizador no vario sino hasta la hidrólisis 40, conservándose un 85% de la actividad inicial.

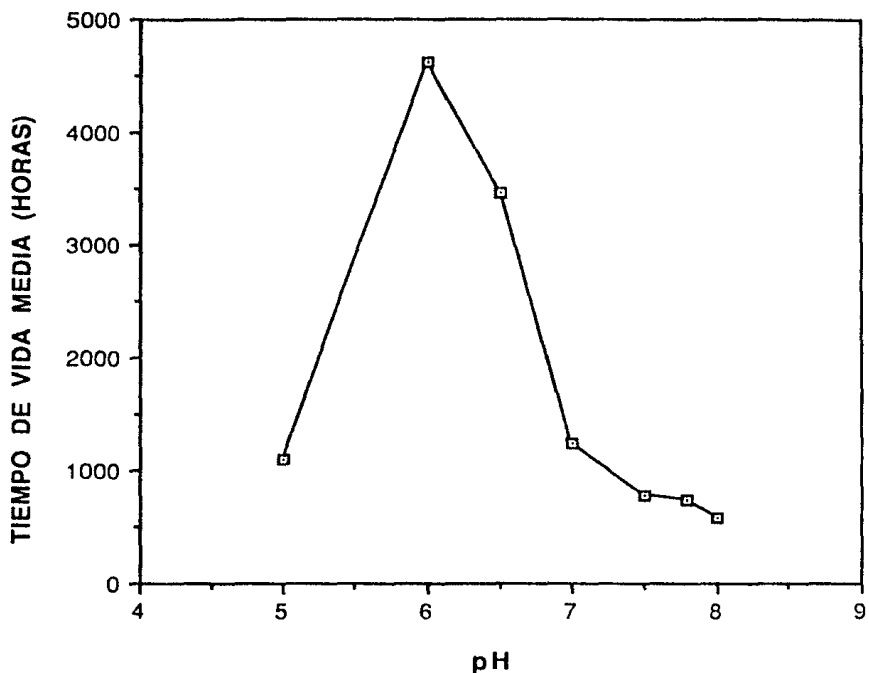


Figura 28. Efecto del pH en el tiempo de vida media del biocatalizador. El biocatalizador se incubó a 37 °C en baño agitado, en amortiguador de fosfatos 0.1 M y se determinó actividad a pH 7.8 y 37 °C.

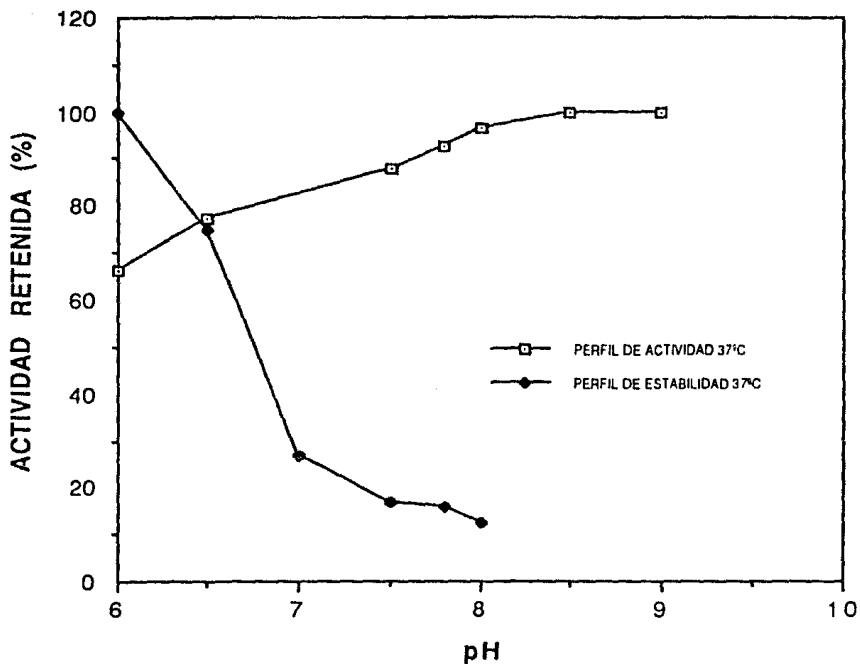


Figura 29. Efecto integral de la actividad y estabilidad del biocatalizador.

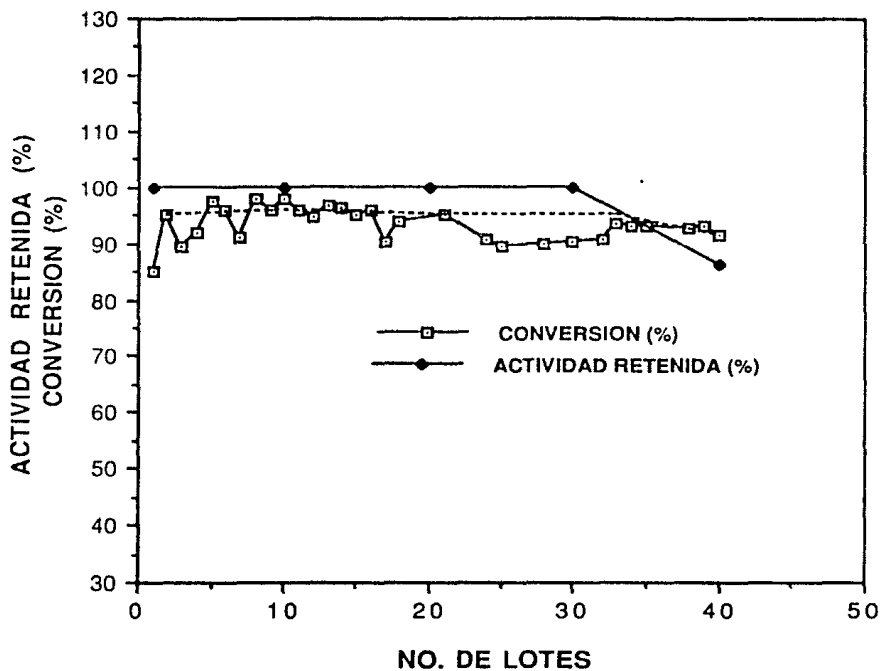


Figura 30. Estabilidad operacional del biocatalizador. Tiempo de reacción 2 hrs, 37 °C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, 6% de PGK.

-Caracterización cinética.

Durante el diseño del biocatalizador uno de los criterios mas importantes fue el de evitar problemas difusionales. Por esta razón la caracterización cinética se realizó en células intactas de *E. coli*.

Determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$

Los resultados del estudio cinético de la células de *E. coli*, se presentan en la fig. 31, en la que se muestra la representación de Lineweaver-Burk, obteniéndose un K_m de 12 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.7315 U/ml (6.7 U/g de células p.s.). Los valores reportados en la literatura para células intactas (tabla 6) son muy variados, sin embargo, los valores aquí obtenidos se encuentran dentro de los ordenes de magnitud reportados en la literatura.

Determinación de la constante de inhibición por exceso de sustrato (K_s).

Se encuentra reportado que la PA de *E. coli* es inhibida por altas concentraciones de bencilpenicilina. En el caso de la enzima contenida en células de *E. coli* ATCC 9637 también se observó este efecto (fig. 32). La constante de inhibición mM se determinó de la grafica reportada en la fig. 33, resultando ser de 459 mM valor por arriba del reportado para células libres y algunas enzimas inmovilizadas (tabla 6).

Determinación de la constante de inhibición por ácido fenilacético (K_{iAFA}).

En la fig. 34 se muestran los resultados de la determinación de la K_{iAFA} , siguiendo la metodología clásica de Lineweaver-Burk. En ambas graficas se puede ver claramente que se trata de un inhibidor competitivo, lo que concuerda con lo reportado en la literatura. El valor de las constante cinética K_{iAFA} es de 51.55 mM.

Determinación de la constante de inhibición por 6-APA (K_{i6-APA}).

En los experimentos para obtener la K_{i6-APA} , se presentaron algunos problemas, por la necesidad de determinar la formación de 6-APA en presencia de altas concentraciones del mismo.

Debido a que durante la reacción se producen los ácidos 6-APA y AFA el pH de la reacción baja, por lo que otra forma de medir producción de 6-APA es mediante el consumo de alcalí.

Para emplear esta metodología se utilizó la ecuación integrada para un reactor en lote con inhibición no competitiva midiendo la formación de 6-APA por consumo de NH_4OH :

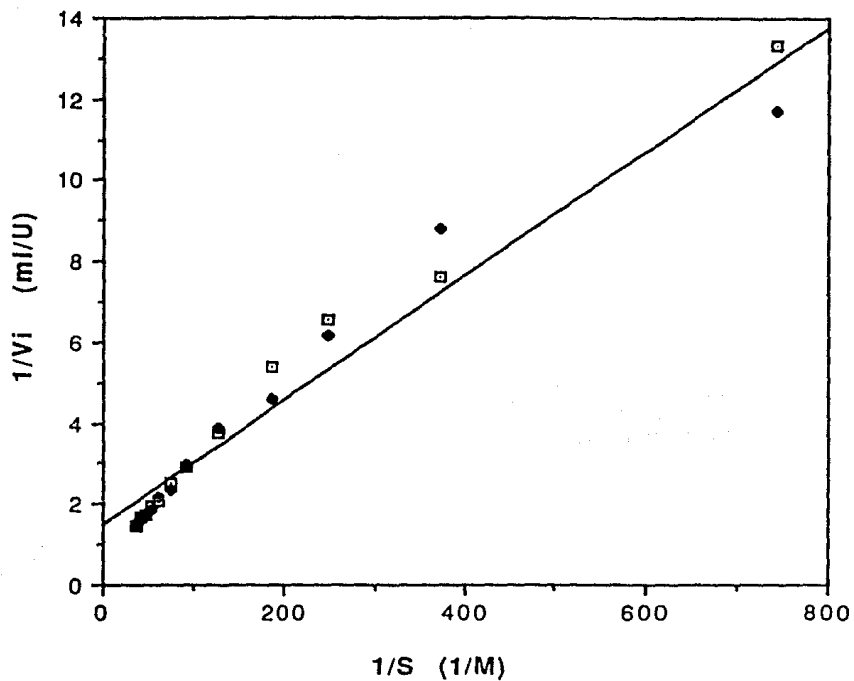


Figura 31. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de I_a Km.

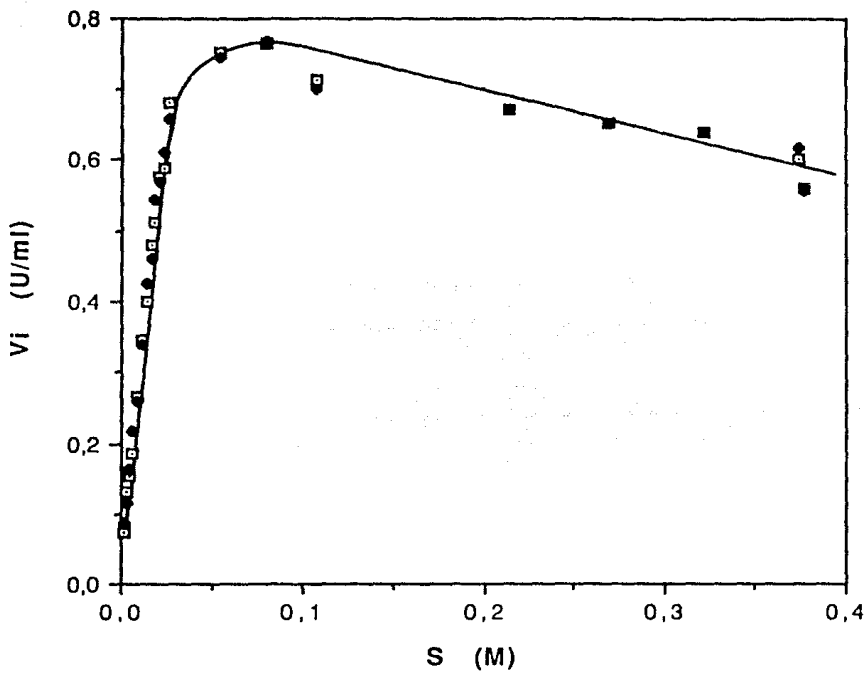


Figura 32. Efecto de la concentración de penicilina en la velocidad inicial de la penicilino amidasa.

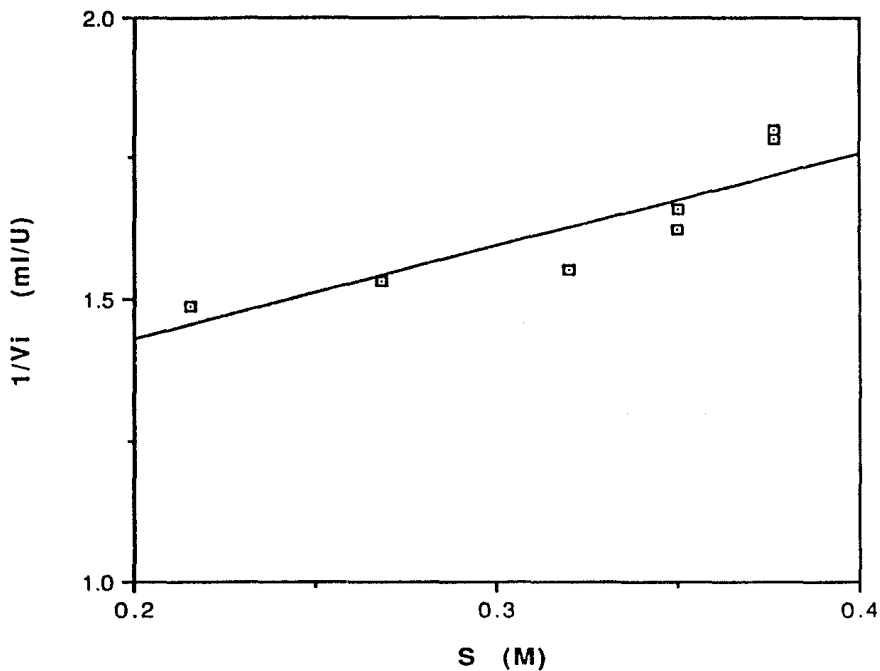


Figura 33. Representación grafica para la determinación de la constante de inhibición por exceso de sustrato.

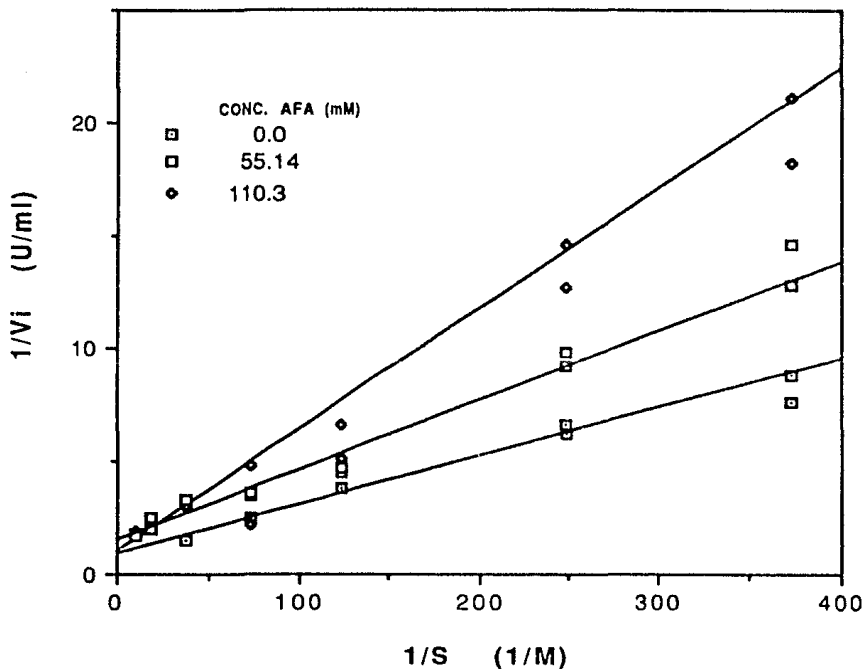


Figura 34. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la constante de inhibición por AFA.

$$K_m \ln \frac{S_0}{S} \left[1 + \frac{I}{K_i} \right] + S_0 X \left[1 + \frac{I}{K_i} \right] = V_{máx} t$$

6-APA 6-APA

El primer término de la ecuación anterior es despreciable, cuando la cinética se mantiene en orden cero. Al despejar X del segundo término de la ecuación se obtiene:

$$X = \frac{V_{máx} t}{\left[1 + \frac{I}{K_i} \right] S_0}$$

6-APA

Al graficar X contra tiempo en presencia de inhibidor (6-APA), se obtiene que la pendiente es:

$$m = \frac{V_{máx}}{\left[1 + \frac{I}{K_i} \right] S_0}$$

6-APA

de donde se puede obtener el valor de K_i .

De esta forma se obtuvo un valor de $K_{i6-APA} = 234.3$ mM (fig. 35), trabajando a una concentración de PGK de 100 g/l, pH 7.5, temperatura de 37 °C, relación enzima/PGK de 60 U/g, empleando concentraciones de 6-APA de 0, 55.46, 138.7 y 277.42 mM.

Aplicación del biocatalizador.

Hidrólisis de penicilina por el biocatalizador de células inmovilizadas.

Se realizaron hidrólisis de penicilina G en un reactor tanque agitado por lote a concentraciones de penicilina de 2 a 10% p/v, empleando células inmovilizadas a una concentración equivalente a 3.4 U/ml y a una carga constante de 60 U/g de PGK.

En trabajos previos se ha observado que existe absorción de los componentes de la reacción al biocatalizador por lo que las cinéticas de reacción se siguieron midiendo 6-APA por consumo de hidróxido de amonio.

Al analizar los resultados de las cinéticas de hidrólisis cuando se emplea 3.4 U/ml de enzima (fig. 36), se observa que a concentraciones de 8 y 10% (p/v) de PGK las hidrólisis no alcanzan el 100% de conversión y que a medida que se aumenta la concentración de penicilina el tiempo de reacción se incrementa (de 60 minutos cuando se emplea 2% de penicilina a 240 minutos con 10% de penicilina).

Cuando se utilizó una carga constante de penicilina de 60 U/g de PGK (fig. 37) se observa que a la concentración de 4%, la

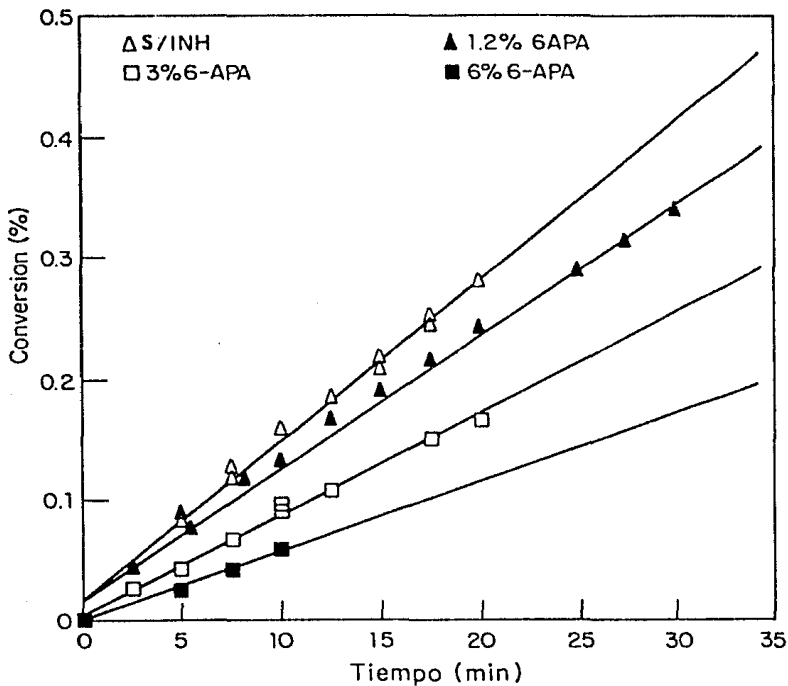


Figura 35. Representación grafica para la determinación de la constante de inhibición por exceso de 6-APA.

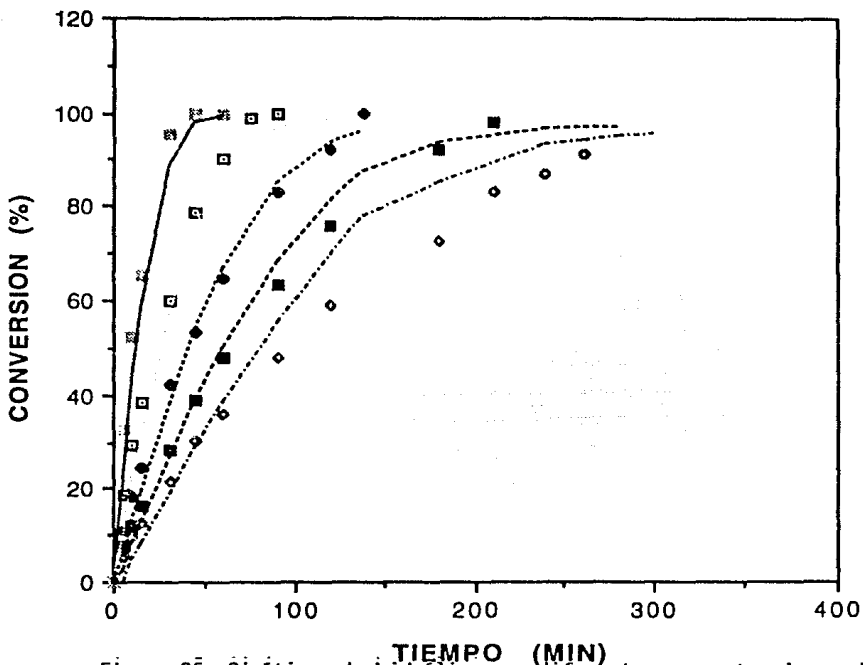


Figura 36. Cinéticas de hidrólisis para diferentes concentraciones de penicilina, utilizando células inmovilizadas como biocatalizador, se empleó una concentración de enzima de 3.4 U/ml. Se muestran los datos experimentales (puntos) y los que predice el modelo de triple inhibición modificado y corregido por equilibrio (líneas).

— Mod 2% PGK 4% PGK - - - 6% PGK - · - · 8% PGK - - - - 10% PGK
 × Exp 2% PGK □ 4% PGK ◆ 6% PGK ■ 8% PGK ◇ 10% PGK

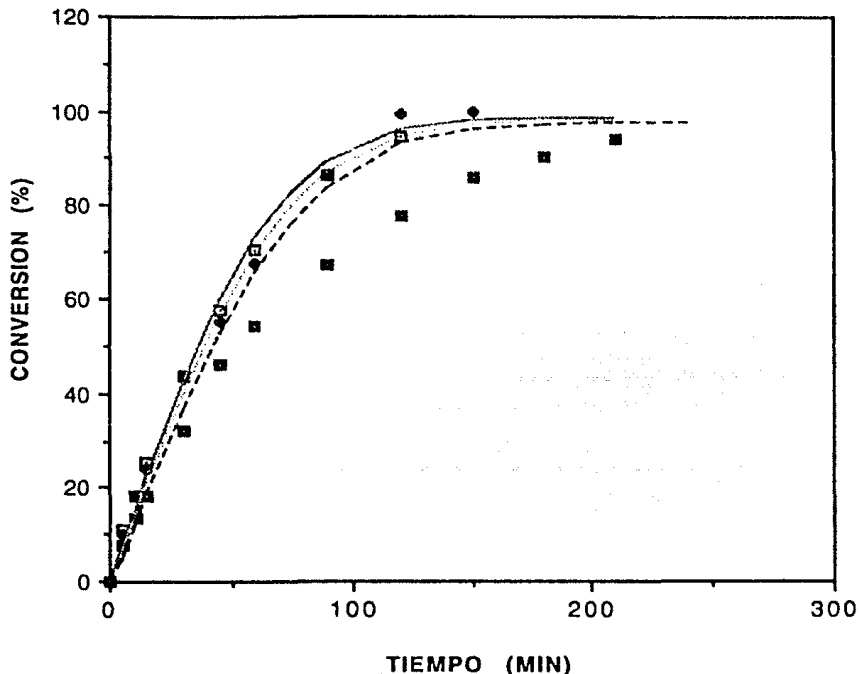


Figura 37. Cinéticas de hidrólisis para diferentes concentraciones de penicilina, utilizando células inmovilizadas como biocatalizador, se empleó una carga constante de enzima de 60 U/g de penicilina. Se muestran los datos experimentales (puntos) y los que predice el modelo de triple inhibición modificado y corregido por equilibrio (líneas).

□ 4% PGK ◆ 6% PGK ■ 8% PGK — 4% PGK - - - 6% PGK ···· 8% PGK

conversión se estabiliza en un tiempo mayor (110 vs 45 min) y que no se alcanzan conversiones de 100%. Para 6% y 8% de penicilina el comportamiento es muy semejante en ambos casos. La hidrólisis con 10% de penicilina requiere alrededor de 30 g de biocatalizador y esta cantidad ocupa mas de la cuarta parte del reactor, dificultando su operación. La única forma de lograrlo empleando un biocatalizador con mayor actividad específica. Desde el punto de vista del diseño del biocatalizador ya estan agotadas las posibilidades por lo que la otra alternativa es contar con una cepa hiperproductora de la enzima.

Los reportes referentes a hidrólisis de penicilina con biocatalizadores de células son escasos. A pesar de ello, el comportamiento antes descrito, coincide con lo reportado en la literatura, en lo que concierne al tiempo de reacción y porcentajes de conversión. Sato et al., (1976) con un biocatalizador de células de *E. coli* inmovilizadas en poliacrilamida, obtiene 85 a 90% de conversión en 180 minutos de reacción, empleando una concentración de enzima de 0.11 U/ml y 15 mM (5 g/l) de penicilina; en un proceso desarrollado en China, con un biocatalizador de células inmovilizadas en gelatina o agar (Klyosov, 1989) se obtiene un rendimiento de 80% con 0.05M (18.6 g/l) de penicilina. Klein, (1984), reporta que para lograr una conversión de 98% (con 7.5% de penicilina) y 92% (con 10% de penicilina) se requiere un tiempo de alrededor de 230 minutos y que para alcanzar una conversión de 95% en 90 minutos, la cantidad de enzima necesaria esta en función de la cantidad y concentración de penicilina que se quiera hidrolizar.

De los resultados antes discutidos, se puede concluir que el biocatalizador obtenido lleva a cabo la hidrólisis de penicilina G (2 a 10%), con tiempos de reacción que van de 60 a 230 minutos, no obstante, solo se pueden obtener conversiones de 100% con concentraciones de penicilina de 2 y 4%. Por otro lado se pone en evidencia la necesidad de contar con un biocatalizador con mayor actividad específica.

Ospina, (1991), observa un comportamiento cinético con un biocatalizador de enzima parcialmente pura inmovilizada por enlace covalente, muy semejante al que presentan las cinéticas de reacción obtenidas en este trabajo. Encontró que el modelo de triple inhibición modificado fue el que mas se ajustó a los resultados experimentales. Como en sus experimentos observó igualmente que las hidrólisis no alcanzaban el 100% de conversión, incluye una corrección por equilibrio. Para ello determinó la constante de equilibrio, la cual resultó ser 6295 mM a pH 7.5, 37 °C y 10 % de penicilina.

Al aplicar este modelo en las hidrólisis con el biocatalizador de células aquí obtenido, en ambos casos el modelo cinético describe adecuadamente los datos experimentales hasta concentraciones de penicilina del 8%. Para 10% los datos

experimentales estan por abajo de la prediccion teorica, lo que hace pensar que el termino de inhibicion por exceso de sustrato debe ser mas importante o bien que la Ks se ve afectada por la presencia de los productos de reaccion. Por otro lado, considerando que las inhibiciones estan incluidas en el modelo, otra causa podria ser el efecto de la reversibilidad de la reaccion.

Análisis económico del biocatalizador diseñado.

Para que un biocatalizador de penicilino amidasa pueda ser empleado a nivel industrial, es necesario que cumpla con ciertas características técnicas y económicas. En particular la actividad, el precio y estabilidad operacional del mismo juegan un papel importante por el impacto directo que tienen en el costo del 6-APA. La principal desventaja del biocatalizador obtenido en este trabajo es su baja actividad especifica, por lo que se busca incrementar la actividad de las células por técnicas de Ingeniería Genética. Hasta la fecha se han logrado producir células con actividad especifica de 200 U/g de células secas, clonando el gen en vehículos multicopia bajo el operón del promotor de lactosa. Dicha actividad en las condiciones definidas generaría un biocatalizador con 29.7 U/g de biocatalizador. Sin embargo, es posible establecer la actividad necesaria para contar con un biocatalizador competitivo en el mercado. Si se tiene en cuenta que el valor de la materia prima para producir 6-APA es cercano a su precio de venta, es posible calcular el número de ciclos mínimo que se debe emplear un biocatalizador con diferentes actividades especificas. Para dicho calculo se hicieron las siguientes suposiciones: a) se requiere una carga de 240 U para producir 1 g de 6-APA, b) el precio de la penicilina es de 30 dólares/Kg, c) se requieren 2 Kg de penicilina para producir 1 Kg de 6-APA, d) el costo de proceso es de 1 dólar por Kg de 6-APA, e) el costo del biocatalizador es de 300 dólares. La estimación del costo del biocatalizador se hizo considerando que el costo de las materias primas para producir el biocatalizador es la tercera parte de su costo de producción (anexo III). Se calculo el costo de producción del 6-APA empleando la siguiente expresión:

$$\frac{\$}{\text{Kg } 6\text{-APA}} = \left[\frac{\$30 \text{ US}}{\text{Kg PGK}} \cdot \frac{2 \text{ Kg PGK}}{\text{Kg } 6\text{-APA}} \right] + \left[\frac{\$1 \text{ US}}{\text{Kg } 6\text{-APA}} \right]$$

materia prima proceso

$$\left[\frac{\$300 \text{ US}}{\text{Kg de bloc.}} \cdot \frac{240,000 \text{ U}}{\text{Kg } 6\text{-APA/ lote}} \cdot \frac{1}{(\text{AE bloc.}) \text{ NL}} \right]$$

biocatalizador

donde AE = actividad específica del biocatalizador y
NL = número de lotes.

En la fig. 38 se grafica el costo de producción del 6-APA en función del número de lotes a diferentes actividades del biocatalizador. Se observa que a actividades específicas del biocatalizador tan bajas como 10 U/g, si el biocatalizador fuera utilizado 50 ciclos, el costo de 1 Kg de 6-APA sería mucho mayor a su precio de venta, mientras que si la actividad específica fuera de 100 U/g el costo sería de 75 dólares. Se observa que actividades mayores de 40 U/g después de 150 ciclos, prácticamente no se observa un efecto significativo en el costo de producción de 6-APA: tal es el caso de un biocatalizador producido con células mejoradas por Ingeniería Genética (de actividad específica superior a 270 U/g de células secas).

Es importante mencionar que la estimación del costo de materias primas del biocatalizador se realizó considerando el costo de producción de la cepa silvestre, el cual es muy bajo. Comúnmente las cepas mejoradas genéticamente requieren para su producción compuestos que son costosos (antibióticos, nutrientes especiales). Por lo que el costo del biocatalizador seguramente será mayor. En la fig. 39 se muestra el número de lotes de reutilización requeridos para obtener el precio de venta del 6-APA (80 dól./Kg), en función de la actividad específica del biocatalizador, para diferentes costos relativos de producción de las células (considerando a la unidad como el costo de producción de la cepa silvestre).

Se observa que al aumentar el costo de las células el número de lotes se incrementa, sobre todo si las actividades del biocatalizador son tan bajas como 10-20 U/g. Sin embargo, a actividades del biocatalizador superiores a 40 U/g el efecto del costo de las células es despreciable.

Extracción de PA por choque osmótico.

En lo que se refiere a al biocatalizador de enzima inmovilizada se probó, optimizó y escaló el método de extracción de PA por choque osmótico con sacarosa. Se determinó que es una buena alternativa para sustituir la ruptura mecánica, ya que además de ser menos drástica disminuye los pasos de purificación. El método se integró a un proceso de purificación para hacer una comparación con los procesos de purificación reportados en la literatura. Del trabajo realizado en esta parte se escribió un artículo el cual ya ha sido aceptado para su publicación en la revista *Process Biochemistry* (anexo II).

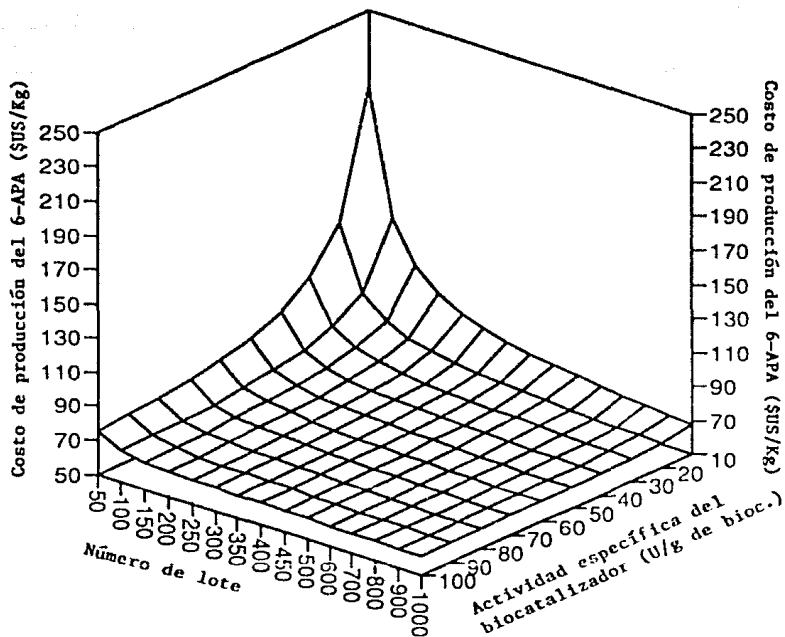


Figura 38. Efecto del número de lotes de reutilización del biocatalizador de PA en el costo de producción del 6-APA a diferentes actividades específicas del biocatalizador. Se considero el biocatalizador de 300 dólares/Kg.

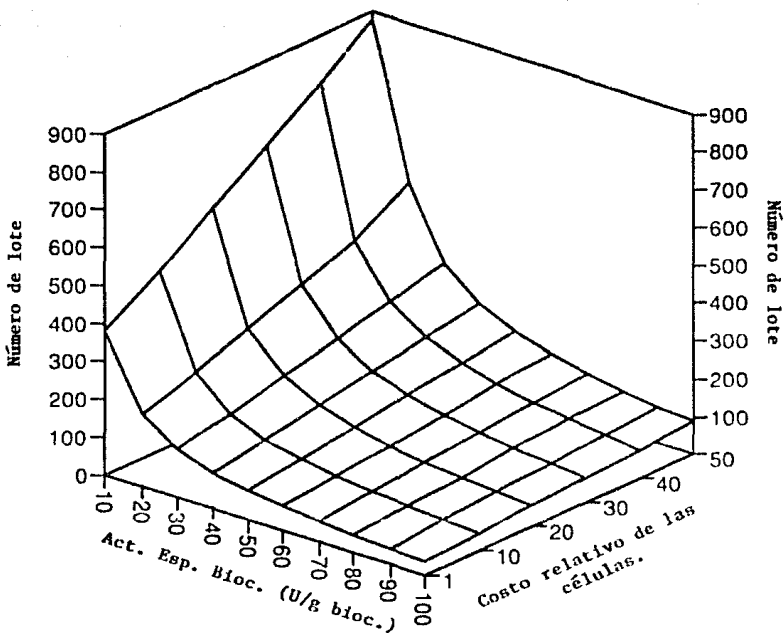


Figura 39. Número de lotes requeridos para obtener el precio de venta del 6-APA (80 dól./Kg), en función de la actividad específica del biocatalizador, a diferentes costos relativos de producción de las células (considerando a la unidad como el costo de producción de la cepa silvestre).

VI. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se realizó el mejoramiento de la tecnología para la producción del biocatalizador de PA en dos aspectos: llevando a cabo el diseño, caracterización y aplicación de un biocatalizador de penicilino amidasa, empleando células completas de *E. coli* ATCC 9637. Por otro lado se mejoró parcialmente el proceso de producción con la enzima inmovilizada al disminuir los pasos de purificación, empleando el choque osmótico como una alternativa a la ruptura mecánica de la célula.

a) Diseño del biocatalizador:

Se establecieron las condiciones para producir el biocatalizador con células completas, llevando el proceso hasta un nivel de 0.975 litros. Se trata de un sistema de producción de catalizadores por dispersión líquido-líquido, optimizado por nuestro grupo de trabajo. Dentro de los parámetros críticos que se establecieron se incluye el material, la carga celular, la temperatura y pH del proceso así como las condiciones de agitación.

Es interesante señalar que para la cepa *E. coli* ATCC 9637, no pudo emplearse gelatina como soporte, pues la actividad proteolítica de la cepa desestabiliza el catalizador.

Se determinó que desde el punto de vista técnico y económico, la mezcla de los tamaños malla 80, 50, y 40 es una buena opción para ser utilizada.

La principal limitante consistió en la baja actividad del biocatalizador (7-12 U/g).

b) Caracterización del biocatalizador:

La enzima presenta una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ácido fenil acético, no competitiva por 6-APA y competitiva por exceso de sustrato, con los siguientes valores de las constantes cinéticas:

$$\begin{aligned}K_m &= 12 \text{ mM} \\V_{m\acute{a}x} &= 6.7 \text{ U/g} \\K_{i\text{APA}} &= 51.55 \text{ mM} \\K_{i6\text{-APA}} &= 243.3 \text{ mM} \\K_s &= 459 \text{ mM}.\end{aligned}$$

Se encontraron las siguientes características fisicoquímicas:

Temperatura de máxima actividad	55-60 °C
pH de máxima actividad	7.5-9.0
Energía de activación	9,475 cal/mol.
Temperatura de máxima estabilidad	37 °C
pH de máxima estabilidad	6

Se encontró que en condiciones de operación, controlando la reacción a pH 7.6-7.6 a 37 °C en reactor tanque agitado, después de 40 lotes se retuvo 85% de su actividad inicial.

c) Aplicación del biocatalizador:

Se observó que el modelo de triple inhibición modificado con corrección por equilibrio describe adecuadamente la reacción de hidrólisis de la penicilina.

Se demostró la viabilidad técnica del biocatalizador, sin embargo, para tener viabilidad económica se requiere de un incremento en la actividad específica del biocatalizador, la cual solo se puede lograr contando con una cepa con actividad específica mayor a 270 U/g de células secas, para rendir un biocatalizador de 40 U/g.

d) Purificación de la enzima:

Considerando que el proyecto 6-APA involucra también un catalizador con la enzima inmovilizada se exploró la técnica de choque osmótico para la extracción de la enzima. Se trata de un proceso simple y fácil de escalar. Por ser una técnica específica, permite reducir las etapas de purificación en una o dos etapas. No solo sustituye a la extracción mecánica sino que además purifica a la enzima en un factor de 5 y los rendimientos de extracción pueden ser tan altos como 100%. Esta etapa fue integrada a un proceso global de purificación que fue comparado satisfactoriamente con los hasta ahora reportados en la literatura.

VII. RECOMENDACIONES.

A. Ingeniería Genética.

El proyecto de un catalizador de PA con células completas solo tiene perspectivas si se genera una cepa sobreproductora de la enzima, por lo que la actividad futura deberá contemplar esta etapa para lograr obtener un biocatalizador con una actividad de al menos 40 U/g p.h, para lo cual se deberá contar con una cepa actividad específica superior a 270 U/g.

B. Uso del biocatalizador.

Realizar estudios mas profundos del sistema de hidrólisis, probando el sistema de columna con recirculación.

C. Producción del biocatalizador.

Aplicar la metodología de inmovilización ya establecida para determinar el comportamiento del nuevo biocatalizador (biocatalizador de células hiperproductoras de la enzima).

Realizar estudios de escalamiento del sistema de inmovilización, para comprobar la reproducibilidad de los resultados a mayor escala.

D. Reacción de hidrólisis.

De los principales problemas que presenta la reacción de hidrólisis de la penicilino amidasa por la enzima PA, son las inhibiciones tanto por sus productos de reacción como por exceso de sustrato, en este sentido sería importante realizar estudios para eliminar estas inhibiciones. Una estrategia interesante sería estudiar la reacción de hidrólisis en un sistema de dos fases.

Otra estrategia sería capturar *in situ* los productos de reacción con agentes quelantes. En este sentido las ciclodextrinas parecen una buena alternativa.

VIII. REFERENCIAS.

- Alvaro, G., Fernández, R., Blanco, R. M., and Guisán, J. (1990) Immobilization- stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 26: 181-195.
- Ambedkar, S., Deshpande, B., Sudhakaran, V. and Shewale J. (1991). *Beijerinckia indica* var. *penicillanicum* penicillin V: enhanced enzyme production by catabolite repression-resistant mutant and effect of solvents on enzyme activity. *Journal of Industrial Microbiology*. 7: 209-214.
- Audet, P., and Lacroix, C. (1989). Two-phase dispersion for the production of biopolymer gel beads: Effect of various parameters on bead size and their distribution. *Process Biochemistry* 217-226.
- Balbas, P. and Bolívar, F. (1990). Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* 185: 14-37.
- 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.
- Barber, M. and Ass (1987). *Chemica. Medicinal chemical monographs. Monograph # 2. 6-APA, 7-ADCA and other penicillin transformation products.* PJB Publications. England.
- Batchelor et al (1959). Synthesis of penicillins: 6-amino penicilanic acid in penicillin fermentations. *Nature*, 183: 257-258.
- Bautista, D., (1983). Diseño, construcción y aplicación de un electrodo para detección de penicilinas. Tesis. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla.
- Boehringer Manneheim GmbH (1985). "Specifications for penicillin G acylase , carried fixed enzyme" Brochure No. 520, 608.
- Braun, J. Le Chanu, P. and Le Goffic, F. (1989). The immobilization of penicillin G acylase on chitosan. *Biotechnol. and Bioeng.* 33: 242-246.
- Bruns 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.
- Bryjak, J., Trochimczuk, A. and Noworyta A. (1989). Immobilization of penicillin acylase on acrylic carriers. *Bioprocess. Eng.* 4: 159-162.
- Burteau, N., Burton, S. and Chrichton R.R. (1989). Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. *FEBS Letters* 258, 2: 185-189.

Casas, L. (1981). Producción de ácido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de penicilina G. Tesis de Maestría. IIB. UNAM México.

Castillo, E., Ramírez, D., Casas, L., and López-M., C. (1992). Design and Characterization of Immobilized cell catalysts with intracellular β -galactosidase in a two phase system. In press

Carleysmith, S.W. and Lilly, M.D. (1979). Deacylation of benzylpenicillin by immobilized penicillin acylase in a continuous four-stage stirred-tank reactor. *Biotech. Bioeng.* 21:1057-1073.

Choi, W., Lee, S., and Ryu, D. (1981). Synthesis by partially purified and immobilized enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 361-371.

Claridge, C.A., Gourevitch, A. and Lein, J. (1960). Bacterial penicillin amidase. *Nature.* 187, 237-238.

Cole, M. (1969) Hydrolysis of penicillins and related compound by the cell-bound penicillin acylase of *E. coli*. *Biochem J.* 115: 733-739.

Cole, M., Savidge, T. and Vanderhaghe. (1975) Penicillin Acylase Antibiotic Inactivation and modification. In: Hash J.H. (ed) *Meth. Enzymol.* 47: 698-705.

Daumy, G.O. et al. (1985). Experimental evolution of penicillin acylases from *E. coli* and *Proteus rettigeri*. *J. Bacteriol.* 163: 925-932.

Daumy, G.O., Danley, D., McColl, A. (1985). Role proteins subunits in *Proteus rettigeri* penicillin G acylase. *J. Bact.* 163: 1279-1281.

Demain, A.L. (1975). Why mode of action studies? *Chem Technol.* 5: 287-289.

Dennen, D.W. Degradation kinetics of 6-aminopenicillanic acid. *J. Pharm. Sci.* 56(10): 1273-1276.

Erarsland, A., Terzi, I., Guray, A. and Bermek, E. (1991). Purification and kinetics of penicillin G acylase from a mutant strain of *E. coli* ATCC 11105. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 51: 27-40.

Fernández, R., Rosell, C., and Guisán, J. (1991) Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in presence of organic cosolvent *Enzyme Microb. Technol.* 13: 898-905.

Flyn, E. H. (editor) *En Cephalosporin and penicillin.* Chemistry and Biology. Academic Press N.Y. (1972)

Giacobbe, F., Iassonna, 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.

Gómez, A., Ospina, S., Quere, A., Quintero, R. and Lopez-M. A. (1992) Modelling and simulation of a pH-dependent bioprocess-enzymatic conversion of Pen G to 6-APA. *Bioprocess Computations in Biotechnology*. 2 (In press).

Greco, G., Veronese, F., Largajolli, R. and Gianfreda, L. (1983) Purified penicillin acylase performance in a stabilized ultrafiltration membrane reactor. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 333-338.

Guisan, J. M., Alvaro, G. and Fernandez, L. (1990). Immobilization Stabilization of penicillin g acylase: An Integrated Approach. *Enzyme Engineering* 10: 552-558. (Annals of the New York Academic of Sciences Vol 613)

Haagensen, P. et al. (1983). The kinetics of penicillin V deacylation on an immobilized enzyme. *Biotechnol. and Bioeng.* 25:1873-1895.

Hamilton-Miller, J.M.T. (1966). Penicillin acylase. *Bacteriol. Rev.* 30: 761-771.

Huang, H.T., Seto, T. and Shull, G. (1960) Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillins. *J. Am. Chem. Soc.* 82: 3790.

Hulst, A.C., Tramper, J., Vant't Riet, K., and Westerbeek, J.M.M. (1985). A new technique for the production of immobilized biocatalyst in large quantities. *Biotechnol. Bioeng.* 27. 870.

Kaufmann, W. and Bauer, K. (1960). Enzymatische spaltung und resynthese von penicillin. *Naturwissenschaften.* 47: 474-475.

Klein, J. and Wagner, F. (1980) Immobilization of whole microbial cells for the production of 6-aminopenicillanic acid. In *Enzyme Eng* 5: 335-345. Plenum Press.

Klein, J., Wagner, F., Washausen, P., Eng, H., Martin, C., Braunschweig (1981a). Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin G by immobilized cells of *E. coli* ATCC 11105, send information.

Klein, J. and Wagner, F. (1981b). Immobilization of whole microbial cells for production of 6-aminopenicillanic acid, send information.

Klein, J., Heckenberg, U., Kressdorf, B., Muller, R., Verlop, D. and Wagner, F. (1984a), send information.

Klein, J., Vorlop, K.D. and Wagner, F. (1984b). The implication of reaction kinetics and mass transfer on the design of biocatalytic process with immobilized cells. *Enz. Eng.* 43(7):437-449.

Klyosov, A. (1989). Enzyme engineering at the industrial level.

Present and future prospects. United Nations Industrial Development Organization

Kutzbach, C. and Rauenbusch, E. (1974). Preparation and general properties of crystallin penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Hope Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354: 45.

Lagerlof, E. et al (1976). Production of 6-aminopenicillanic acid with immobilized *Escherichia coli* acylase. In *Meth. Enzymol.* 44.

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.

López, L., (1982). Síntesis enzimática de ampicilina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Lowry, O.H., Rosebrough, J.N., Farr, L.A. and Randall, J.R. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biological Chemistry* . 193: 265-272.

Mahajan, P.B. (1984). Review. Penicillin acylase. An update. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 9: 537-555.

Mahajan, P.B. (1984). Penicillin acylases. An update. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 9:537-554.

Marconi, W. et al. (1973). The hydrolysis of Penicillin G to 6-aminopenicillanic acid by entrapped penicillin acylase. *The Journal of Antibiotics.* 228-232.

Marikawa, Y., Karube, I., Suzuki, S. (1980). Enhancement of penicillin acylase activity by cultivating immobilized *Kluyvera citrophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10: 23-30.

Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F. (1979). Cloning of the penicillin acylase gene of *E. coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. En: Timmis K.N. y Puhler A. (eds): *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance.* Elsevier, Amsterdam pp. 459-470.

Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F. (1980). Cloning of penicillin G acylase gene of *E. coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. *Enzyme Eng.* 5: 61.

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.

Merino, E. (1991) Comunicación personal.

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.

Mutulovic, U., Rasch, and Wagner, F. (1986) New equipment for scaled up production of small spherical biocatalysts. *Biotechnology Letters* 8 (7):485-490.

Novo Industri A/S. Information Brochure (1982). No 05804.

Novo (1987) Production of 6-APA from penicillin-V in a stirred batch system using semacylaseTM from NOVO Industrie A/S. IB No. 236d-6B. Novo Enzyme Information.

Ogbonna, J., Matsumura, M., Yamagata, T., Sakuma, H and Kataoka, H. (1989). Production of micro-gel by a rotating disk atomizer. *Journal of fermentation and Bioengineering* 68 (1):40-48.

Ospina, S. (1991) Caracterización y aplicación de un biocatalizador de penicilino amidasa. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM. México.

Ospina, S., López-Munguía, A., González, R. and Quintero, R. (1992). Characterization and use of penicillin amidase catalyst. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 53 (En prensa).

Padilla, C (1985). Desarrollo de un método de inmovilización por atrapamiento de células completas de *E. coli* ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa, empleando como soporte agar. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.

Park, J.M. and Choi C. (1982). The production of 6-aminopenicillanic acid by multistage tubular reactor packed with immobilized penicillin amidase. *Biotechnol. and Bioeng.* 25: 1623-1637.

Queener, S. and Swartz, R. (1976). Penicillin: Biosynthetic and semisynthetic. *Economic Microbiol* 3:35.

Quintero, R. R, (1992). (comunicación personal).

Rehg, T., Doger, C. and Chan, P.C. (1986). Application of an atomizer in producing small alginate beads for cell immobilization *Biotechnol. Lett.* 8: 111.

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.

Rhom Pharma GmbH. Eupergit PCA (1983). Information Brochure.

Sandoval, H., (1980). Cinética enzimática de la hidrólisis de penicilina G para la formación de ácido 6-aminopenicilánico por la penicilino amidasa de células completas de *E. coli*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

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.

Savidge, T.A. (1984). Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. en: Vandame, E.J. (Ed). *Biotech. of Ind. Antib.* Marcel Dekker. New York. 172-224.

Savidge, T.A. and Cole, M (1975). Penicillin acylase (bacterial). In: *Meth. in Enz.* 43, J. Hash (Ed). Academic, New York, 705-721.

Segel, I. "Biochemical Calculations" pág. 208-319. Ed. Jhon Wiley & Sons, N.Y. (1976).

Self, D., Kay, G. and Lilly, M. (1969). The conversion of benzyl penicillin to 6-aminopenicillanic acid using an insoluble derivative of penicillin acamidase. *Biotechnol. and Bioeng.* 11: 337-348.

Shewale, J.G., et al. (1987). Evaluation of 6-amino penicillanic acid by p-dimethyl aminobenzaldehyde. *Biotech. Tech.* 1(1): 69-72.

Shewale, J.G. and Sivaraman, H. (1989). Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. *Proc. Biochem.* 146-154.

Shimizu, M. et al. (1975). Purification and properties of penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*. *Agr. Biol. Chem.* 39(8): 1655-1661.

Singh, D., Goel, R., and Johri, B. (1988a) Deacylation of penicillins by the immobilized mycelia of the thermophile *Malbranchea*. *J. Gen Microbiol.*, 34: 333-339.

Singh, D., Goel, R., and Johri, B. (1988b) Production of 6-aminopenicillanic acid through double entrapped *Eschericia coli* NCIM 2563. *Current Science* 57 (22): 1229-1231.

Soberón, X. (1991) Comunicación personal.

Su, H., Bajpai, R. and Preckshot, W. (1989). Characterization of alginate beads formed by a two fluid annular atomizer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20/21:561-569.

Valle, F., Balbás, P., Merino, E. and Bolivar., F. (1991). The role penicillin amidases in nature and in industry. *Trends in Biochemical Sciences* 16: 36-40.

Vandamme, E.J. and Voets, J.P. (1974). Microbial penicillin acylase *Advances in Applied Microbiology* 17: 311-369.

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.

Vojtisek, V. and Slezak, J. (1975a). Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli*. II. Synthesis of the enzyme, kinetics and specificity of its induction and the effect of O₂. *Folia Microbiol.* 20: 289-297.

Vojtisek, V. and Slezak, J. (1975b). Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli*. III. Catabolite repression, diauxie, effect of CAMP and nature of the enzyme induction. *Folia Microbiol.* 20: 298-306.

Vojtisek, V., and Jirku, V. (1983). Immobilized cells *Folia Microbiol.* 28: 309-340.

Vorlop, K. and Klein, J. In Enzyme technology 3, Rotenburger Ferment. Symp., (R. M. Lafferty, ed), Springer Verlag, Heidelberg, pp 219-235.

Wang, W. Ji, X. and Yuan, Z. (1982). Immobilization of microbial cells using gelatin and glutaraldehyde. In: *Enz. Eng.* 6. Plenum Press. N.Y. 215-216.

Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, M.D. (1972). 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.

Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects

E. Castillo, M. Rodríguez, L. Casas, R. Quintero and A. López-Munguía

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México

Experimental results obtained during the design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin are presented. Strong diffusional limitations are found and explained with the usual parameters and models, introducing an empirical correlation between substrate concentration and cell efficiency factor. The effect of particle size, enzyme load, and specific activity in the system is discussed in terms of cooperation between bioengineers and geneticists.

Keywords: Immobilized cells, mass transfer effects; lactase, penicillin acylase

Introduction

In the broadest sense, cell immobilization can be defined as the physical confinement or localization of microorganisms in a fixed support that permits their continuous reuse.¹ Immobilized cells include dead cells with a desired enzymatic activity, or growing and viable cells for a complex biochemical process, in which coenzymes, cofactors, etc. are also involved.

Immobilization of microorganisms for the application of a single enzymatic activity is an alternative to enzyme immobilization that has been the subject of several technological developments in recent years. One of the main advantages of this type of process is that extraction and purification of the intracellular enzyme is avoided, resulting in a reduced catalyst production cost.²⁻⁵ In general, the use of immobilized cells overcomes some of the disadvantages shown by immobilized enzymes, such as high manufacturing costs, complicated manufacturing, lower operational stability, etc. The choice between the use of immobilized enzymes or immobilized cells is similar in many respects to the more familiar choice between the use of purified or crude soluble enzyme as biocatalysts.⁶

At the end of the 1970s and the early 1980s, a great number of immobilized cells methods were developed,

such as gel entrapment, cellular aggregates, chemical attachment to a polymeric matrix, etc.^{7,8} One of the first publications dealing with immobilization of whole cells for the use of a single enzyme is due to Leuschner in 1964.⁹ Currently a wide variety of immobilization methods of microbial cells has reached the industrial scale, as shown in *Table 1*.

In this table, the catalysts are produced by different methods. There are products based on ionic binding, such as the immobilization of fungal spores; methods based on cell aggregates, where the group of Vojtisek¹ has contributed with industrial applications in socialist countries; and methods based on gel entrapment. This last category is the most frequent, due to the simplicity of the catalyst preparation; such is the case for the processes developed by Tanabe Seiyaku Co.,¹⁰ based on cells entrapped on carrageenan for malic acid, aspartic acid, alanine, and phenylalanine production, and by Genex Corporation for 1-phenylalanine, aspartic acid, 1-serine, and 1-tryptophan with cells immobilized on vermiculite.¹¹

Once an immobilized cell system has been selected for a given enzymatic process, two factors are of particular importance. These two factors represent and demonstrate the interrelation between Genetic Engineering and Biochemical Engineering. On the one hand, what is the highest specific activity that can be obtained from a given cell host by genetic improvement? On the other hand, how much of this specific activity is really expressed if the catalyst design is mass transfer limited? This particular limitation is the most common in immobilized cell systems, when the cell entrapment method is used.

Address reprint requests to Dr. López-Munguía at the Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271, México
Received 2 February 1990; revised 16 April 1990

Table 1 Examples of industrial enzymatic processes with immobilized whole cells

Microorganisms	Enzyme	Product	Company
<i>E. coli</i>	Aspartase	L-Aspartic acid	Tanabe Seiyaku Genex Corp.
<i>E. coli</i>	Penicillin acylase	6-Aminopenicilanic acid	Tanabe Seiyaku Novo Industri Toyo Yozoe
<i>Actinoplanis missouriensis</i>	Glucose isomerase	Fructose syrups	Gist Brocades
<i>Bacillus coagulans</i>	Glucose isomerase	Fructose syrups	Novo Industri
<i>E. coli</i>	Tryptophanase	Tryptophan	Genex Corp.
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	Fumarase	Malic acid	Tanabe Seiyaku
<i>Erwinia rhapsontica</i>	Isomaltulose synthase	Isomaltulose	Miles Lab
<i>Serratia plymuthica</i>	Isomaltulose synthase	Isomaltulose	South German Sugar
<i>Mortierella vinacea</i>	β -Galactosidase	Raffinose	Hokkaido Sugar
<i>Pseudomonas dacunhae</i>	Aspartate decarboxylase	Alanine	Tanabe Seiyaku
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Serine hydroxymethyl transferase	Serine	Genex Corp.
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Phenylalanine aminotransferase	Phenylalanine	Genex Corp.
<i>Rhodococcus sp.</i>	Nitrilase	Acrylamide	Nitto Chem Ind

For a given cell immobilization method, mass transfer limitations define the maximum specific activity, beyond which any strain genetic improvement will render the process less efficient, considering that it will increase the rate of a nonlimiting step. This information is important when designing biocatalysts and provides a clear demonstration of why both geneticists and biochemical engineers should be involved in this and other activities of biotechnology. The objective of this paper is to provide examples of the already mentioned situation found in the design of two catalysts prepared by cell entrapment on gelatin: β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* and penicillin acylase from *Escherichia coli*.

Mass transfer effects

In a recent review,¹ mass transfer effects in immobilized cell systems are discussed. In this and many other articles, external and internal diffusion resistances are treated in terms of effectiveness factors.¹²⁻¹⁴ Although not always verified, external mass transfer in immobilized cells and enzymes is often considered negligible, due to the possibility of handling hydrodynamic conditions and reactor design to minimize its effects.

However, internal diffusional limitations are difficult to eliminate in immobilized cell systems, especially when the catalyst production process has already been defined. This factor is, no doubt, a major limitation in developing new catalysts with immobilized cells for enzymatic reactions by the common gel entrapment techniques. Two alternatives are always proposed in the literature to avoid them: decrease particle size and/or decrease enzyme load. Nowadays a rule of thumb in immobilized cell or enzyme catalysts is the selection of the smallest particle size as a compromise between internal diffusion limitations and reasonable pressure drops in packed bed reactors.

The easiest alternative, from the design point of

view, is to decrease artificially the reaction rate, so that it becomes the controlling step. This is done by reducing the enzyme or cell load during the catalyst preparation. This, of course, results in a rational use of the enzyme, but may result in a catalyst with low specific activity. Catalyst design is thus of particular importance, since due to the new technologies, geneticists are developing high specific activity strains, while bioengineers recommend the reduction of the enzyme load to avoid diffusional limitations. It is important to mention that a high specific activity is often the final criterion for selection between an enzyme or a cell catalyst.

In order to account for internal diffusion, the effectiveness factor is always the first parameter to be defined:

$$\eta = \frac{v_{obs}}{v^*} \quad (1)$$

which measures the relation between the observed reaction rate (v_{obs}) in the presence of diffusional resistances and the kinetic rate (v^*) that would be observed if all diffusional limitations were eliminated.

To predict this parameter, the mass balance equation inside the particle is obtained. For any type of geometry:

$$\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{n}{r} \frac{dS}{dr} - \frac{kE_p S}{K_m + S} - \frac{1}{D_p} = 0 \quad (2)$$

where

- $n = 0$ for a slab
- $n = 1$ for a cylinder
- $n = 2$ for a sphere

This equation, which describes the substrate concentration profile (S) as a function of the particle radius

(r), has been solved numerically by many authors using different kinetic models. With the concentration profile, the predicted observed velocity can be easily obtained by integration of the local rates. For Michaelis-Menten kinetics, the solution is presented as a plot of the effectiveness factor vs the Thiele modulus (Φ), a dimensionless number that involves the kinetic parameters of the enzyme (kE_p and K_m), the particle radius (R), and the effective diffusivity of the substrate (D_e). Equation (2) can be written for spherical beads as follows:

$$\frac{d^2\beta}{dz^2} = -\frac{\Phi^2\beta}{1-\beta} - \frac{2}{z} \frac{d\beta}{dz} \quad (3)$$

where:

$$\Phi = \frac{R}{2} \sqrt{\frac{kE_p}{D_e K_m}}$$

$$\beta = S/K_m$$

$$z = r/R$$

In this plot, the effectiveness factor is also a function of the surface concentration (S_0), as the initial dimensionless boundary condition is: $\beta_0 = S_0/K_m$ at $z = 1$. The surface concentration is assumed to be equal to the bulk concentration when no film resistance is present.

Once the effectiveness factor has been defined, the design equation for a batch reactor for instance would be:

$$v_{\text{obs}} = -\frac{ds}{dt} = \eta \frac{kE_p S}{K_m + S} \quad (4)$$

The relationship between the effectiveness factor and the substrate concentration has been the subject of theoretical treatment, but it is seldom considered in experimental results, and equation (4) is integrated with the effectiveness factor as a constant. In theoretical studies, equations (3) and (4) are sometimes solved simultaneously, but very few publications deal with this dependence experimentally. Radovich¹ points out that if internal mass transfer limitations occur, the actual rate expression is multiplied by an experimentally determined or predicted effectiveness factor and included in the reactor equation. Experimental determinations often involve the reduction of the catalyst particle size up to a point where reaction rate per unit mass no longer increases.¹⁵⁻¹⁷ It is often ignored that these measurements are carried out in saturated conditions, when substrate concentration is high and therefore far from Michaelis-Menten or first-order kinetics.

Lee and Tsao¹⁸ proposed the estimation of the effectiveness factor at the logarithm of the mean substrate concentration. More recently, Manjon *et al.*¹⁹ developed a single equation for the packed bed reactor for reversible Michaelis-Menten kinetics, in which substrate conversion and the effectiveness factor are a function of a dimensionless length. Since the explicit dependence between the effectiveness factor and the reactor length is unknown, the equation is solved numerically.

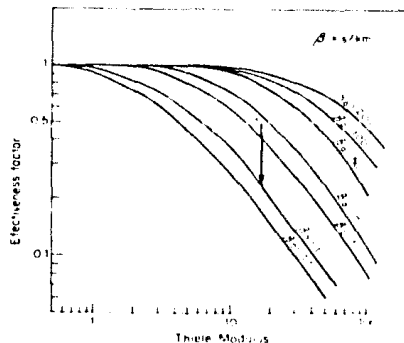


Figure 1 Effectiveness factor as a function of the Thiele modulus, for Michaelis-Menten kinetics in a spherical catalyst. The bold arrow illustrates a reaction with $\Phi = 10$, and $S_0 = 10$ g/l point a

In *Figure 1*, equation (3) is solved numerically and the concentration profile integrated to illustrate the effect of decreasing substrate concentration on the effectiveness factor. The evolution of a batch reaction is shown in the figure for a Thiele modulus of 10 starting at $\beta_0 = 10$ (bold arrow), being clear that as the reaction proceeds, serious diffusional limitation occurs. It follows that the relationship between effectiveness factor and substrate concentration is important for the design of immobilized cell reactors. It has been stated that if the Thiele modulus is higher than 0.3-3, significant diffusional limitations can be expected.¹ However, it is difficult to find in the literature a calculated value for enzyme catalysts prepared with immobilized cells. The largest source of error comes from the effective diffusivity, which is difficult to measure or estimate. The relationship given by Satterfield²⁰ is commonly used with arbitrary values for the porosity (τ) and tortuosity factor (τ): $D_e = D\tau/\tau$ where D is the molecular diffusivity.

In this article, the effective diffusivity is estimated from experimental data obtained with a catalyst with diffusional limitations. An empirical correlation between the effectiveness factor and the substrate concentration is obtained in order to allow a simple numerical integration of the batch and plug flow reactor equations and a direct design equation for the CSTR. Some aspects of the catalyst design are also discussed.

Materials and methods

Cells of *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109 with β -galactosidase activity were grown and permeabilized as has already been described.²¹ Cells of *E. coli* with penicillin acylase activity were kindly provided by the Mexican company GENIN S.A. de C.V.

Both microorganisms were immobilized by entrapment in gelatin. In both cases, the maximum amount of cells that could be added to a 3% (w/v) gelatin solution, without modifications of the particle properties, was used (200 gl⁻¹). After homogenization of the mixture, beads of different size were produced in a pneumatic system.²² From the same mixture, fibers were produced instead of beads by direct extrusion in cold water. In both cases, the catalyst is treated with 1.25% glutaraldehyde solution for 45 min. After several washes, the catalyst is stored under refrigeration (4°C) in phosphate buffer 0.1 M, pH 6.6 for *K. fragilis* and pH 7.8 for *E. coli*. Approximately 25% of the initial activity is lost during the process.

Lactase activity was measured following the release of glucose from a 5% lactose solution in phosphate buffer 0.1 M with the glucose test reagent as has been described.²³ One unit is defined as the amount of enzyme required to hydrolyse 1 μmol of lactose in 1 min. The cells produced contained 1.666 Ug⁻¹ cell and followed Michaelis–Menten kinetics with a $K_m = 5.33$ gl⁻¹ galactose being a competitive inhibitor.²⁴

Penicillin acylase activity was measured with 2% potassium penicillin-G (PGK) solution in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.8 at 37°C. The 6-aminopenicillanic acid (6-APA) produced is measured by the *p*-dimethylaminobenzaldehyde method.²⁵ One unit is defined as the amount of enzyme producing 1 μmol of 6-APA per minute. The cells with approximately 50% protein content presented an enzymatic activity of 200 Ug⁻¹ cell.

Reactions to measure initial rates in biocatalysts were carried out in 20 ml with 400 mg of immobilized cells with samples taken during the first 10 min. For batch reactions the volume was increased to 50 or 100 ml.

In both catalysts, the activity is reported in terms of a unit weight of dry cells (Ug⁻¹ cell), protein in the cells (Ug⁻¹ prot), or dry catalyst (Ug⁻¹ cat).

The effectiveness factor was experimentally determined by comparing the activity of a given gelatin catalyst with the activity of the same catalyst after mechanical disintegration.

All equations were solved numerically with the aid of simulation language ISIM[®] developed by Salford University Industrial Center Ltd, Salford, England. This language utilizes four different integration methods to solve differential equations.

Results and discussion

Effective diffusivity

The biocatalyst prepared with the *K. fragilis* cells in the form of fibers gave a beta-galactosidase activity of 510 Ug⁻¹ cat, while the disintegrated catalyst resulted in an increased activity of 1,050 Ug⁻¹ cat; both measurements were carried out at 50 gl⁻¹ of lactose. This gives clear evidence of diffusional limitations with an effectiveness factor of 0.486. Since the cells had already been characterized, all the parameters needed to solve equation (3) were available, with the exception of the Thiele modulus. The equation was solved in

Table 2 Lactose diffusivities in various systems

System	Diffusivity (cm ² seg ⁻¹)	Ref.
<i>K. fragilis</i> in gelatin (5%, 37°C)	4.21 · 10 ⁻⁷	this work 28
Gelatin (5%, 5°C)	1.44 · 10 ⁻⁶	
<i>E. coli</i> in carrageenan and locust bean gum (5%, 32°C)	3.53 · 10 ⁻⁶	27
Carrageenan and locust bean gum (5%, 32°C)	1.285 · 10 ⁻⁷	27
Water (25°C)	4.9 · 10 ⁻⁷	30

order to find the value of the modulus that would decrease the initial rate of the ground catalyst 0.486 times. This value turned out to be 18, and therefore from the Thiele modulus, all other parameters being known, the effective diffusivity could be indirectly evaluated. In Table 2, this value is compared to other experimental results reported in the literature for lactose in various media. It can be observed that the value here obtained (4.21 · 10⁻⁷ cm² seg⁻¹) is very similar to the one obtained in carrageenan, giving indirect evidence of a similar diffusional process. However, the effective diffusivity is two orders of magnitude smaller when compared to the reported value in the same system without cells, a stronger effect than the one reported by Furi and Yamashita²⁶ for *E. coli* cells on carrageenan and Britz et al.²⁷ for *E. coli* on carrageenan and locust bean gum. The value reported by Friedman and Kraemer²⁸ for lactose diffusivity on gelatin is very similar to the molecular diffusivity of lactose in water, but this measurement was made on a gelatin solution and not in a gelatin gel.

In conclusion, in this case it is not possible to obtain the effective diffusivity by applying the usual correction factors to the molecular diffusivity, even with a void fraction value as low as 0.1 and a tortuosity factor as high as 10. When cells are not entrapped, the behavior seems to be different. Boersma *et al.*,²⁹ following a similar procedure for reversible Michaelis–Menten kinetics of flocculated *Arthrobacter* cells with intracellular glucose isomerase, found a difference of only 7.3 between the effective and the molecular diffusivity. In any case, this indirect but simple experimental measurement of initial rates and effectiveness factors could be useful to obtain approximations of the effective diffusivities.

Effect of substrate concentration

Another important consideration, often neglected in the design of enzymatic reactors, is the effect of substrate concentration on the effectiveness factor during the reaction. This was shown by the vertical arrow in Figure 1 for a given Thiele modulus equal to 18 in a reaction with 50 gl⁻¹ of lactose.

In Figure 2, the experimental effectiveness factors determined at different initial substrate concentrations are reported for the lactase catalyst. This figure is a nonlogarithmic modification of Figure 1, presenting the profiles as a function of B for selected values of the Thiele modulus, including the value of 18 calculated for the *K. fragilis* catalyst. However, since it is not possible to obtain a direct function between these two parameters, an empirical polynomial correlation was obtained:

$$\eta = a + bS + cS^2 + dS^3 \quad (5)$$

where:

$$a = 0.1552$$

$$b = 1.4327 \times 10^{-2}$$

$$c = -2.5951 \times 10^{-4}$$

$$d = 2.25 \times 10^{-6}$$

With this correlation, equation (4) can be simplified for the design of a batch reactor to give:

$$kE(t) = K_m \left[\frac{dS}{a + bS^2 + cS^3 + dS^4} + \int \frac{dS}{a + bS + cS^2 + dS^3} \right] \quad (6)$$

In the particular case of the continuous stirred tank reactor, the design equation is:

$$\theta = \frac{(K_m + S)(S_0 - S)}{a + bS + cS^2 + dS^3} \quad (7)$$

Since the reaction in the CSTR proceeds at the exit substrate concentration (S), the effectiveness factor is the lowest (Figure 2). This type of reactor is not recommended for immobilized cell catalyst with internal diffusional limitations.

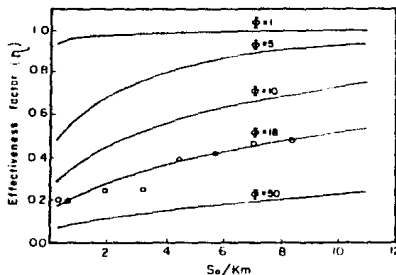


Figure 2 Experimental effectiveness factors obtained at different initial substrate concentrations for the immobilized *K. fragilis* catalyst, a modified presentation of Figure 1

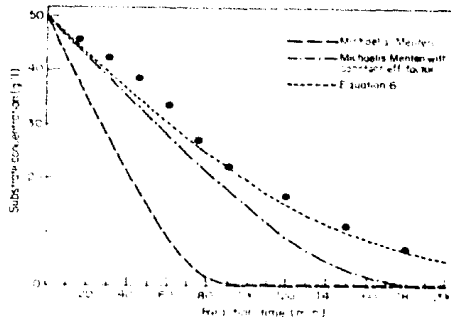


Figure 3 Evolution of a batch reaction limited by internal diffusion with an immobilized cell β -galactosidase catalyst as described by different models

In Figure 3, the experimental results obtained in a batch reactor are presented and compared to the predicted values for three cases: the catalyst with no diffusional limitations present, integrated equation (4) with a constant effectiveness factor (0.489), and equation (6), taking into account the decrease in the effectiveness factor as substrate is consumed. It is clear that the best results were obtained in the last case. It is interesting to point out that in initial rate experiments with free cells, galactose behaved as a competitive inhibitor with $K_i = 30$ mM. When this experiment was performed with the catalyst in kinetic control conditions, the inhibition constant increased to 200 mM. However, the competitive inhibition model could not adequately describe the experimental results shown in Figure 3, for any of the three cases.

Optimization in the design of the catalysts

Considering the limitations observed with the catalyst prepared in the form of fibers, the effect of a different type and shape was studied. With an experimental system based on the design of Su *et al.*,²² we were able to produce 0.35- to 3-nm diameter gelatin beads. This was only possible when in the original design, water was substituted by cold corn oil to receive the extruded beads. In Figure 4, the effect of particle size obtained for *E. coli* and *K. fragilis* cell catalysts is presented, when the effectiveness factors are evaluated at 50 g l⁻¹ of lactose and 20 g l⁻¹ of penicillin, respectively. This figure directly illustrates the often-mentioned effect of particle size on internal diffusion limitations.

Once a given size is selected, the already discussed effect of substrate concentration should be considered. For the two immobilized cell catalysts, we selected two particle sizes, inside and outside the diffusional limited region, and later we determined the effect of substrate concentration on the effectiveness factor. These results

are presented in Figure 5, where it becomes evident that the limitations can occur later in the reaction (batch reactor) or near the exit of a plug flow reactor. In both cases, when the substrate concentration decreases to a limit, there is a switch from kinetic to diffusional control. In the literature, it is often found that during the design of an enzyme or cell catalyst, the process is declared free from internal diffusional limitations after finding a particle size where the initial rate no longer increases or the activation energy of the enzyme in the catalyst becomes equal to that of the free enzyme. In both cases, the effect of substrate concentration is systematically ignored, and, as shown in Figure 5, this could be a source of error.

Finally, during the development of a process for the production of an immobilized cell catalyst, a classical or genetical strain improvement project is included, in

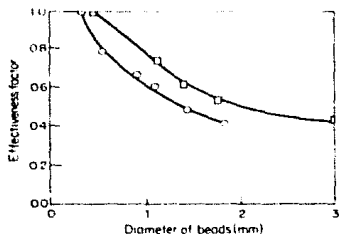


Figure 4 Effectiveness factor as a function of particle size for a penicillin acylase (●) and β -galactosidase (□) immobilized cell catalysts

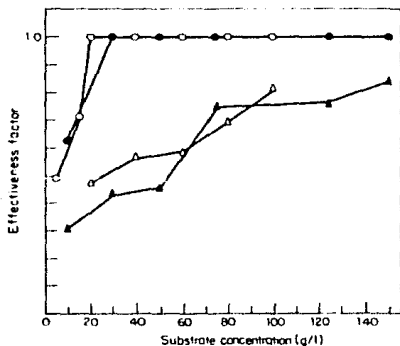


Figure 5 Effect of substrate concentration on effectiveness factor for two particle sizes of immobilized cell catalysts. *E. coli*: (○) 0.35 mm, (△) 1.44 mm; *K. fragilis*: (●) 0.35 mm, (▲) 1.44 mm

Table 3 Effect of strain genetic improvement on the effectiveness factor in an immobilized cell catalyst limited by internal diffusion

	Effectiveness factor		
	S_0 50 gl ⁻¹	S_0 10 gl ⁻¹	S_0 1 gl ⁻¹
1.1 V_{max}	0.620	0.370	0.230
Actual activity (V_{max}) ^a	0.500	0.278	0.170
2 V_{max}	0.390	0.205	0.122
3 V_{max}	0.328	0.172	0.100
5 V_{max}	0.257	0.134	0.080
10 V_{max}	0.197	0.093	0.055

^a Actual value is 1,666 Ug⁻¹ cell

order to obtain the maximum specific activity. If the catalyst is controlled by internal diffusion, the increase in the specific activity of the strain will only make the catalyst more inefficient, as a higher percent of the enzymatic activity inside the catalyst will be useless. This is shown in Table 3, for the *K. fragilis* cells with an actual activity of 1,666 Ug⁻¹ cell. A fivefold increase in specific activity of the cells would cause a decrease in the effectiveness factor from 0.5 to 0.257, as measured at 50 gl⁻¹. The specific activity of the catalyst would, however, increase from 550 to 1,485 Ug⁻¹ cat, so the enzyme production cost will be an important criterion to define the catalyst production process.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Alfredo Martinez and Mario Caro for pilot plant support.

References

- 1 Radovich, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* 1985, 7, 2-10
- 2 Champlyvier, B., Marchal, F. and Rouschet, P. *G. Enzyme Microb. Technol.* 1989, 11, 422-430
- 3 Vontšek, V. and Jukic, V. *Folia Microbiol.* 1983, 28, 309-340
- 4 Kolari, M. *Process Biochem.* 1980, 10, 11, 2-8
- 5 Duand, G. and Navarro, J. M. *Process Biochem.* 1978, 9, 14-23
- 6 Cheetham, P. S. J. in *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Vol. 4 (Wiseman, Alan, ed.) Ellis Harwood Limited, England, 1980, pp. 189-238
- 7 Vontšek, V. and Vanek, Z. in *Overproduction of Microbial Metabolites: Strain Improvement and Process Control Strategies* (Vanek, Z. and Hostalek, Z., eds.) Butterworths, Boston, 1986, pp. 183-212
- 8 Chibata, E., Tosa, E. and Fukata, A. *Trends Biotechnol.* 1983, 1, 9-11
- 9 Kolari, M. J., Chen, B. J., Emery, A. H. and Lam, H. C. in *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Process* (Olson, A. C. and Cooney, C. L., eds.) Plenum Press, New York, 1974, pp. 71-83
- 10 Tosa, E. *Abstract and Proceedings of the Bio Fair Tokyo* 1986, pp. 94-99
- 11 Hamilton, B. K., Hsiao, H. Y., Swann, W. E., Anderson, D. M. and Deleite, J. J. *Trends Biotechnol.* 1985, 3, 64-68
- 12 Halmwachs, W. *Process Biochem.* 1979, 6, 25-27
- 13 Engasser, J. M. and Horvath, C. in *Applied Biochemistry and*

- Bioprocessing*, Vol. 1 (Wingard, L., Katchalski, F. and Goldstein, L., eds.) Academic Press, New York, 1976, pp. 127-220
- 14 Webster, I. A. and Shuler, M. L. *Biotechnol. Bioeng.* 1979, **21**, 1725-1748
 - 15 Lee, Y. Y., Fratke, A. R., Wan, K. and Tsao, G. T. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, **18**, 389-413
 - 16 Rovito, B. J. and Kittel, J. R. *Biotechnol. Bioeng.* 1973, **15**, 143-161
 - 17 Lopez-Munguia, C. A. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 1981, **25**, 522-528
 - 18 Lee, Y. Y. and Tsao, G. T. *J. Food Sci.* 1974, **39**, 667-672
 - 19 Manjon, A., Ibarra, J. E., Gomez, J. E., Gomez, E., Bustida, J. and Badajo, A. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, **30**, 491-497
 - 20 Satterfield, C. N. and Sherwood, T. K. *The Role of Diffusion in Catalysis* Addison-Wesley, Reading, MA, 1963, pp. 20-26
 - 21 Castillo, R. E. and Casas, I. E. in *Physiology of Immobilized Cells*, an International Symposium (J. A. M. de Bont, J. Visser, B. Mattiasson and J. Tramper, eds.) Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, 1990, pp. 213-218
 - 22 Su, H., Bajpai, R. and Preckshot, W. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1989, **20/21**, 561-569
 - 23 Wendorf, W. L. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, 1969
 - 24 Casas, I. E. Research report, Regional Program of Biotechnologies for Latin America and the Caribbean, PNUD/UNU/ID December, 1989
 - 25 Casas, I. E. Master in Science Thesis, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico, 1981
 - 26 Furu, M. and Yamashita, K. *J. Ferment. Technol.* 1985, **63**, 167-173
 - 27 Brito, E., Donnan, J., Dominguez, E. and Casas, I. E. *J. Ferment. Bioproc.* 1990, **69**, 135-137
 - 28 Friedman, I. and Kraemer, E. *J. Am. Chem. Soc.* 1930, **52**, 205
 - 29 Boersma, J. G., Vellema, K., De Wit, H. G. J. and Joosten, G. J. H. *Biotechnol. Bioeng.* 1979, **21**, 1711-1724
 - 30 Perry, R. H. and Chilton, C. H. *Chemical Engineers' Handbook*, 5th ed. McGraw-Hill Kogakusha Ltd., Tokyo, 1973

Penicillin Acylase Extraction by Osmotic Shock

M. Rodríguez, L. Güereca, F. Valle, R. Quintero & A. López-Munguía

Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3; Cuernavaca, Mor. 062271, México

(Received 14 October 1991; accepted 10 December 1991)

Penicillin acylase was extracted from E. Coli by osmotic shock. The process was optimized by factorial design, scaled up and integrated to a purification process in order to compare it with purification processes reported in the literature. A specific parameter PPEF (Purification Processes Evaluation Factor) was defined for this purpose.

INTRODUCTION

Penicillin acylase (PA) or penicillin aminohydrolase (EC 3.5.1.11) is used to produce 6-aminopenicillanic acid (6-APA), an important intermediate in the production of semi-synthetic penicillins. After glucose isomerase, PA is the second most important enzyme at an industrial level as an immobilized biocatalyst. Many companies are involved in the production of immobilized forms of PA: including Rhom Pharma and Bayer (Germany), Snam Progetti and Sclavo (Italy, Astra) (Switzerland), Beecham (UK), Pfizer (USA), Genin (Mexico), Gist Brocades (Holland). They share an annual market for the biocatalyst of \$6 million dollars¹ for the production of 4500 t of 6-APA.² In almost all the existing commercial products, the biocatalyst is manufactured with PA extracted and purified from *Escherichia coli*. The purification step plays an essential role in the process allowing the immobilization of highly purified forms of PA, yielding biocatalysts of high specific activity and constituting between 30 and 40% of the biocatalyst production costs. In general, the higher the number of purification steps required to obtain a purified enzyme product, the lower the yields and the higher the cost

of the purified enzyme. Thus, there exists a compromise between the need to produce catalysts of good quality with high specific activity and the number of purification steps required which result in lower yields and higher cost of the purified enzyme.

A number of purification processes for PA from *E. coli* have been proposed in the literature (Table 1). In most of these the bacteria are disrupted to extract the enzyme by sonication and homogenization. After extraction, salt precipitation and various types of chromatography are often used for further purification of the enzyme. The main purification processes reported for PA are listed in Table 2. It can be seen that in all of these processes enzyme extraction is employed. Although homogenization is the only method suitable for large scale purification, it is only used in about 37% of the cases. It is also important to point out that 79% of all the examined purification procedures include a chromatographic step, DEAE-cellulose being the most common.

PA from *E. coli* is found in the periplasmic space, where the protein concentration is 10-20% of the total cellular protein.³ A selective extraction of the periplasmic proteins would therefore result in an extract of high specific activity to initiate the purification procedure, reducing the number of

Corresponding author: Dr A. López-Munguía. Telephone: (52) 73 172799; fax: (52) 73 172388.

Table 1. Purification Processes for Penicillin Acylase

Reference	12	15	17	16	4	5
Step 1	Homogenization	Homogenization	Homogenization	Sonication	Freezing-thawing	Acetone drying
2	pH precipitation	Nucleic acid elimination	pH precipitation	Nucleic acid elimination	DEAE-cellulose chromatography	Sepharose 4B chromatography
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	Tanin precipitation	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	DEAE-cellulose chromatography
4	SE-Sephadex chromatography	PEG precipitation	Acetone homogenization	DEAE-cellulose chromatography	Hydroxylapatite chromatography	
5	DEAE-Sephadex chromatography	DEAE-cellulose chromatography	CM-cellulose chromatography	Hydroxylapatite chromatography		
6	Crystallization					

Table 2. Analysis of the Frequency of Purification Steps in 22 Processes for PA Purification in the Literature^{1-4, 9, 11, 13-21}

Process	Made	Made
Extraction	100.0%	Homogenization 37.5% Sonication 25.0% Acetone drying 12.5% Other 25.0%
Nucleic acid elimination (step up)	58.3%	Streptomycin sulphate 50.0% Protamine sulphate 14.3% Other 35.7%
		Precipitation
Chromatography	79.2%	DEAE-cellulose 42.1% CM-cellulose 21.0% Other 36.9%

purification steps and avoiding the cumbersome elimination of cell debris and nucleic acid.

Few reports dealing with non-mechanical extraction methods can be found in the literature. Greco *et al.*⁴ reported freezing-thawing of the cells as an alternative, but no mention was made of the extraction yield and four purification steps which were required to obtain the pure enzyme with 30% yield. Such a method is probably too expensive for production purposes. Mahajan⁹ extracted the enzyme from a 5% w/v cell suspension by drying with acetone and suspending in water at pH 7-7.2 for 2 h. Lowe *et al.*⁶ extracted PA from *Pseudomonas* at pilot plant scale by a pH change treatment. The cells were suspended and maintained in K₂HPO₄ (0.005 M, pH 10.5) for 30 min at 20 °C. The pH was then adjusted to 7.5 and Triton X-100 added to a final concentration of 0.5% (w/v) and the supernatant containing the enzyme was recovered after filtration. Although such an alternative is technically feasible, the extraction yield is only 47% since PA is extremely sensible to deactivation at alkaline pHs.⁷

Although reports on osmotic shock for enzyme extraction can be traced back to 1967 and in spite of the various advantages of the process to extract periplasmic proteins⁸ this method has neither been used in large scale processes nor systematically studied. Osmotic shock has only been applied to purify PA in laboratory studies.⁹ *E. coli* cells were exposed to high sucrose concentrations to increase the intracellular osmotic pressure, and after centrifugation the cells were resuspended in water to create an osmotic pressure gradient that induces the release of periplasmic material. The liberated periplasmic proteins were finally recovered after centrifugal separation of the undamaged cells.

From the various selective extraction procedures, osmotic pressure treatment is technically viable as it may be applied at different scales, there are no costly chemicals involved and the equipment required is the same as used for production purposes: the fermenter can be used as an extraction vessel and the centrifuge to recover the cells may be the same one employed to process the fermentation broth.

In the present work we studied the use of osmotic shock as a step in the production of partially purified PA to be used in the manufacture of biocatalysts for 6-APA production. The influence of different parameters on enzymatic recovery were analysed and the optimized treatment used at pilot plant scale. A comparison was also made with other procedures in terms of extraction yield, purification factor and number of steps required for the process.

MATERIALS AND METHODS

Enzyme activity

E. coli ATCC 9637 with PA activity were kindly provided by GENIN, S.A. de C.V. Enzyme activity was measured with 2% penicillin G (Orfaquim,

Table 3. Parameters and Results of Osmotic Shock Extraction Process Optimization by the Box-Wilson Method¹⁰

	X_1 cell concentration (g prot/litre)	X_2 sucrose concentration (% w/v)	X_3 EDTA concentration (% w/v)
Upper level	27	25	1.74
Base	18	20	1.37
Lower level	9	15	1.00
Variation units	9	5	0.37
Regression coefficient	-8.41	5.43	3.55
Regression coefficient x variation units	-75.7	27.15	1.31
New variation units	-2	0.7	0.034

Table 4. Results of the Second Part of Process Optimization Experiments

Exp. No	Cell conc. (g prot/litre)	Sucrose conc. (% w/v)	EDTA conc. (% w/v)	$\Delta\pi$ (atm)	Yield (%)	PF*
Base*	18	20.0	1.37	14.16	65.60	5.11
11	16	20.7	1.40	14.66	78.68	5.14
12	14	21.4	1.44	15.27	80.22	5.03
13	12	22.1	1.47	15.76	85.61	4.88
14	10	22.8	1.50	16.25	85.21	4.66
15	8	23.5	1.54	16.76	86.49	4.27

* PF, purification factor.

* Original condition.

S.A.) in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.8 at 37°C. The initial production rate of 6-APA was followed by the *p*-dimethylaminobenzaldehyde method.¹⁰ One activity unit (U) is defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol of 6-APA per min. *E. coli* contain 50% (w/w) protein and have an enzymatic activity of around 100 U g⁻¹ cell (dry weight). Protein was measured by the Lowry method.¹¹

Enzyme extraction

The general procedure for enzyme extraction consisted of suspending the washed cell paste in potassium phosphate buffer (pH 7.0, 0.033 M) to a concentration of 90 g protein/litre. EDTA and sucrose were added as concentrated solutions of 9.37 and 50% w/v, respectively. After 10 min of mechanical stirring the treated cells were recovered by centrifugation (12000g, 15 min, 4°C) in a Beckman centrifuge (Beckman Instruments Inc.) and immediately resuspended in distilled water to the original volume and stirred for 10 min. The suspension was centrifuged as before to recover the supernatant containing the enzyme. The optimal

conditions for enzyme extraction were determined experimentally in 25 ml volume samples. The optimized method was scaled-up to 1 litre of cell suspension obtained from a 10 litre fermentation broth. In this case, the cell suspension was stirred at 665 rev/min using a marine impeller in a 2 litre vessel with two baffles and an aspect ratio of 1:28. The centrifugation steps were carried out in a mini-sharpley centrifuge C-I-1 (Penwalt, México, D.F.) at 13850g with a Σ factor of 285.1 m².

Enzyme purification

The extracted enzyme was further purified by ammonium sulphate precipitation as reported by Kutzbach & Rauenbusch.¹² The 40-65% fraction was dissolved in potassium phosphate buffer (pH 5.8, 0.015 M) and dialysed against the same buffer. The enzyme was then applied to a CM-Sepharose column previously equilibrated with the same buffer. The column was washed with the starting buffer and the enzyme desorbed with potassium phosphate buffer (pH 7.8, 0.050 M). Up to 60 mg of protein per ml gel could be loaded under these conditions. For comparison the extracted enzyme was also applied directly to the ion exchange column.

Electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis was prepared and run according to the method of Laemmli¹³ using 0.75 mm thick slabs 10% T, 2.7% C; T denotes the total weight of monomer (acrylamide plus N,N-methylene bis-acrylamide) per 100 ml of solution, C denotes the weight of N,N-methylene bis-acrylamide expressed as percentage of the total weight of monomer. The gel was stained with Coomassie Blue R-250.

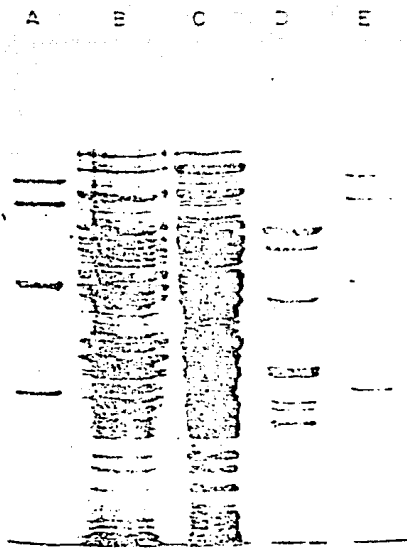


Fig. 1. SDS-PAGE (10% T, 2.7% C). (A, E) Molecular weight marker proteins (80, 68, 43, and 29 kD); (B) total cell protein; (C) soluble proteins released by sonification; (D) cell protein released by osmotic shock. T denotes the total weight of monomer (acrylamide plus N,N -methylene bis-acrylamide) per 100 ml of solution, C denotes the weight of N,N -methylene bis-acrylamide expressed as percentage of the total weight monomer.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the extraction method

In order to define the best extraction conditions a statistical optimization procedure was applied.¹⁴ Three parameters were selected for the study: cell, sucrose and EDTA concentration. The response variable of the experiment was the yield of extracted enzyme. The design of the experiment is described in Table 3 which also includes a statistical analysis of the results. From these data the following equation can be obtained:

$$Y = 64.19 - 4.2X_1 + 2.76X_2 + 1.77X_3 + 0.288X_1X_2 + 1.57X_1X_3 + 0.695X_2X_3 + 0.7175X_1X_2X_3$$

where X_1 is the concentration of cells (g/litre), X_2 is the concentration of sucrose (% w/v), X_3 is the concentration of EDTA (% w/v), Y is the PA extraction yield (%).

According to the regression coefficients (Table 3),

the extraction yield was strongly affected by sucrose and cell concentration. According to the signs of the regression coefficients, the extraction yield was directly proportional to sucrose concentration and indirectly proportional to cell concentration. EDTA concentration had a negligible effect although EDTA is required to complex the calcium ions bound to the membrane favouring the diffusion of periplasmic proteins. In Table 3 the new values for the second part of the optimization procedure are indicated. When these were applied, extraction yields of 78.8–86.5% were obtained (Table 4), considerably better than the 65.6% yield obtained in the initial conditions. These high yields were associated with low cell concentration in the osmotic shock procedure (8 and 10 g/litre) and in turn this results in higher operation volumes of extract and more diluted enzyme product. The conditions reported for experiment 11 (Table 4) were therefore selected and in this experiment a yield of 78.7% was obtained with 5.14 fold purification factor, accomplishing by this extraction procedure the equivalent to one or two of the common preliminary purification steps. The osmotic extraction also avoided the need for the elimination of nucleic acids. In the experiments carried out to select the extraction conditions (Table 4), the observed decrease in the purification factor may be due to an increased release of proteins other than those from the periplasm because of the increased osmotic pressure difference ($\Delta\pi$) at the higher sucrose concentrations used.

These results were also dependent on the *E. coli* strain. When the same experiments were performed with a mutant isolated from the original strain but with twice the original specific activity, the extraction yield in the conditions defined earlier was 90%. Yields as high as 98% were obtained in the case of experiments 14 and 15 (Table 4) with this new strain. It is not known if the extraction yield was dependent on the cell specific enzyme activity or if the difference in these results was due to the variability of cell wall structure.

It is difficult to compare the results of recovery and purification factors of the enzyme obtained by this selective procedure, as most of the purification schemes reported in the literature refer their results to the clarified extract as the starting material.

In our experience, the purification procedure reported by Kutzbach *et al.*¹³ resulted in 90% recovery of enzymatic activity after homogenization in a glass bead mill (Bead-Beater, Biospec Products) and 70% recovery after acidic precipitation and cell

Penicillin acylase extraction by osmotic shock

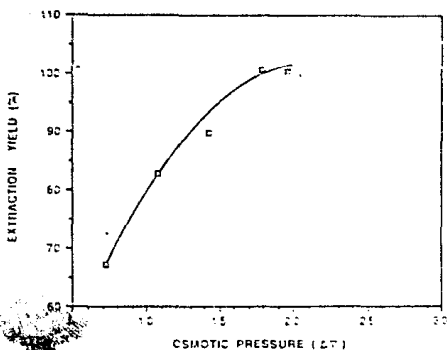


Fig. 2. Penicillin acylase extraction yield as a function of osmotic pressure gradient ($\Delta\pi$).

debris centrifugation (referred to intact cells). A purification factor of 5.14 was obtained (Table 4) with osmotic shock and this is better than that reported after homogenization, acidic precipitation, 40–60% ammonium sulphate fractionation and pooled fraction SE-Sephadex,¹⁸ or cell debris separation, nucleic acid precipitation and ammonium sulphate fractionation.¹⁹

In Fig. 1 the electrophoresis pattern of the proteins extracted by osmotic shock (0.7 U/mg protein) are compared with the cells disrupted by sonication (0.14 U/mg protein) and the protein in the clarified extract (0.21 U/mg protein). All cases started from 0.14 U/mg protein in the intact cells. The osmotic pressure gradient was determined from the sucrose concentration as follows:

$$\Delta\pi = \pi_{\text{out}} - \pi_{\text{in}} = -\frac{RT}{1000} [C_{\text{out}} - C_{\text{in}}]$$

where π is the osmotic pressure gradient inside and outside the cell,

Table 5. Purification Scheme of PA Using Ion Exchange Chromatography

	Vol. (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/g)	PF*	Yield (%)
Cell suspension	25.0	59.20	400.00	0.148	1.00	100.00
Osmotic shock supernatant	25.0	44.76	67.20	0.666	4.50	75.40
Pooled frct. CM-Sephadex	7.9	45.83	5.43	7.700	51.78	70.67

* PF, purification factor.

R is the gas constant = 82 m/atm/g mol K
 T is the temperature in K, and
 C is the molar sucrose concentration.

It was found that PA extraction yield was a function of $\Delta\pi$ according to saturation kinetics (Fig. 2). However, when these results were plotted as the logarithm of the extraction yield against the corresponding osmotic pressure gradients a first-order kinetic behaviour was observed for low osmotic pressure gradients.

An important consideration about this extraction procedure is that after exposure to sucrose, cells should be suspended in water instead of buffer in order to submit the cells to an effective osmotic shock. When buffer was used the yield was as low as 60% compared to water. As a scale-up approach, the extraction procedure was applied to 1 litre of cellular suspension containing 22 g/litre of biomass and using the conditions of experiment 11 (Table 4). An extraction yield of 71.5% was obtained, which is close to the results obtained in the 25 ml experiment. No particular difficulties were found at this scale using a centrifuge with a flow rate of 8.4 litre/h, resulting in a scaling up relation, Σ/Q , of 34 m²/litre/h.

Enzyme purification

In order to test the impact of PA extraction by osmotic shock in a complete purification process, the most common operations found in PA purification procedures (according to Table 2), ammonium sulphate precipitation and ion exchange chromatography were carried out. An overall yield of 70.7% and a purification of 51.8 fold was obtained when the osmotic extract was directly applied to the chromatography column (Table 5), while the overall yield decreased to 51.4% and the purification increased to 68.5 fold if the ammonium sulphate fractionation step was included before ion exchange chromatography (Table 6). These results

Table 6. Purification Scheme of PA Using Ammonium Sulphate Precipitation and Ion Exchange Chromatography.

	Vol. (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/g)	PF*	Yield
Cell suspension	25.0	55.60	374.4	0.1487	1.00	100.09
Osmotic shock supernatant	25.0	43.92	60.0	0.7320	4.90	78.88
40-60% ammon. sulphate precip.	9.0	35.76	13.91	2.5700	17.28	64.24
Pooled fract. CM-Sepharose	9.8	26.61	2.81	10.1800	68.46	51.39

* PF, purification factor.

Table 7. Relative Comparison of Purification Process Reported for PA

Microorganism	Purification factor	Purification yield _f (%)	Number of purification steps	PPEF*	Reference
<i>E. coli</i> NCIB 8743 A	68.3	25.00	5	341.50	15
<i>E. coli</i> SV	79.4	30.00	5	476.40	4
<i>K. citrophila</i>	123.0	61.00	5	1500.60	16
<i>E. coli</i> ATCC 11105	99.0	25.00	6	412.50	12
<i>E. coli</i>	14.0	52.00	4	182.60	17
<i>E. coli</i> NCIM 2400	49.0	37.0	2	906.00	5
<i>E. coli</i> ATCC 9637	200.0	0.45	5	18.00	18
<i>E. coli</i> ATCC 9637	68.5	51.36	3	1172.71	This work
<i>E. coli</i> ATCC 9637	51.8	70.67	2	1829.64	This work

* PPEF: See definition in text.

demonstrate that only one or two purification steps are needed to reach the high specific activity required for the production of the PA catalyst. The number of purification steps may be reduced due to the selective extraction of periplasmic proteins.

As mentioned earlier, the purification processes described in the literature are difficult to compare. In this case the objective was to obtain a highly purified form of PA with the maximum yield at the minimum cost, in order to prepare a PA catalyst. One simplified way to compare the processes, assuming that all the purification steps are equivalent in cost ($\alpha_i = 1$), is to define a Purification Process Evaluation Factor (PPEF) as:

$$PPEF = \frac{PF \times PY}{\sum_{i=1}^N \alpha_i}$$

where α_i is a cost factor associated with each of the purification steps,
 N the number of purification steps,
 PF the final purification factor,
 PY the final purification yield.

The higher the PPEF, the better the purification process. The purification processes including the values of the PPEF were reviewed in Table 7. The advantages of the osmotic shock procedure in PA purification processes are indicated by a high value of the PPEF.

The osmotic shock technique is therefore a valuable method for the extraction of PA from *E. coli* cells due to its simplicity and its feasibility for scaling up. The usual purification processes can be reduced to one or two steps since this technique not only substitutes for mechanical extraction but also results in a 5-fold purification factor. An extraction

yield of almost 100% can be obtained from diluted cells and there is a first order relationship between extraction yield and osmotic pressure gradient.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their gratitude to Alfredo Martínez and Mario Caro for pilot plant support, Fernando Gonzalez for technical assistance and T. Ramirez for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Burk, K., Mauz, O., Noetzel, S. & Sauber, K., New synthetic carriers for enzyme coupling. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 1157 (1988) 105.
- Poulsen, P.B., Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes. *Biotechnol. Gen. Engng. Rev.*, 1 (1986) 121.
- Ferro-Luzzi, G., Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.*, 160 (1984) 1181.
- Greco, G., Veronice, F., Largajolli & Giangreca, L., Purified penicillin acylase performance in a stabilized ultrafiltration membrane reaction. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18 (1983) 333.
- Mahajan, P.B., Penicillin acylases. An update. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 9 (1984) 537.
- Lowe, D.E., Romanick, G. & Eleander, R.P., Penicillin acylases: A review of existing enzymes and isolation of a new bacterial penicillin V acylase. *Dev. Ind. Microbiol.* 22 (1981) 163.
- Ospina, S., Lopez-Munguia, A., Gonzalez, R. & Quintero, R., Characterization and use of a Penicillin Acylase biocatalyst. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (in press).
- Melling, J. & Phillips, B., Large-scale extraction and purification of enzymes. In *Handbook of Enzyme Biotechnology*, ed. A. Wiseman. Halsted Press, New York, p. 58.
- Barbero, J.L., Buesa, J.M., Gonzalez de Buitrago, G., Mendez, E., Pitez Aranda, A. & Garcia, J.L., Complete nucleotide sequence of penicillin acylase gene from *Kluyvera citrophila*. *Gene*, 49 (1986) 69.
- Casas, T.L., Produccion de acido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de penicilina G. Ms S thesis, IIBM, UNAM, Mexico, 1981.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.N., Farr, L.A. & Randall, J.R., Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- Kutzbach, C. & Rauenbusch, E., Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli*. *Hope Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353 (1974) 45.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T 4. *Nature*, 227 (1970) 680.
- Box, G.E.P. & Wilson, K.B., On experimental attainment of optimum conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.*, 13 (1951) 1.
- Balasingham, K., Waburton, D., Dunill, P. & Lilly, M.D., The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 276 (1972) 250.
- Shimizu, M., Okachi, R., Kamura, K. & Nara, T., Purification and properties of penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*. *Agr. Biol. Chem.*, 39 (8) (1975) 1655.
- Lagerlof, E., Narthorst-Westfield, L., Ekstrom, B. & Stoberg, B., Production of 6-aminopenicillanic acid immobilized from *Escherichia coli* acylase. *Methods Enzymol.*, 44 (1976) 759.
- Self, D.A., Kay, G., Lilly, M.D. & Dunill, P., The conversion of benzyl penicillin to 6-aminopenicillanic acid using an insoluble derivative of penicillin amidase. *Biotechnol. Bioengng.*, 2 (1969) 337.
- España, M.G., Inmovilización de la enzima penicilino amidasa en fibras de acetato de celulosa. Bachelor's thesis, UNAM, Mexico, 1981.
- Lowe, D.E., Romanick, G. & Eleander, R.P., Enzymatic hydrolysis of penicillin V to 6-aminopenicillanic acid by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.*, 8 (1986) 151.
- Mahajan, P. & Prabhakar, B., Novel approaches to the purification of penicillin acylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 9 (1984) 421.
- Meevoortien, V. & Saunders, R., Cloning and expression of penicillin acylase genes from overproducing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (1987) 372.
- Savidge, T.A., Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. In *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, ed. E.J. Vandame. Marcel Dekker, New York, 1984, p. 172.
- Savidge, T.A. & Cole, M., Penicillin acylase (bacterial). *Methods Enzymol.*, 43 (1975) 705.
- Daumy, G., Daley, D. & McColl, A., Role of protein subunits in *Proteus retigeri* penicillin G acylase. *J. Bact.*, 163 (1985) 1279.

ANEXO III

ESTIMACION PRELIMINAR DEL COSTO DEL BIOCATALIZADOR.

PRECIOS MATERIAS PRIMAS (DOLARES)

FERMENTACION (400 U/l, 4g c�el/l)	0.013/100 U
ACEITE	1.0/l
AGAR	154.1/kg
GLUTARALDEHIDO (25% l)	211.4/l

CANTIDADES REQUERIDAS POR KG DE BIOCATALIZADOR

	Cantidad	Dólares
CELULAS	165 g	2.145
ACEITE	3.3 l	3.3
AGAR	0.2 Kg	30.82
GLUTARALDEHIDO	0.2 l	42.28
OTROS		1.45

TOTAL	80.00
-------	-------

RENDIMIENTO DE LA INMOVILIZACION	90-95%
COSTO DEL BIOCATALIZADOR (I)	189.23-199.75
COSTO DEL BIOCATALIZADOR (II)	94.6-99.8
COSTO DEL BIOCATALIZADOR (III)	84.2-88.8

(I) si se emplean solamente el tamaño de biocatalizador malla 50 que corresponde a 44.5%.

(II) si se emplean los tamaños de biocatalizador malla 40, 50 y 80 que corresponden al 89%.

(III) si se emplean todos los tamaños del biocatalizador

Considerando que el costo de las materias primas representa la tercera parte del costo del biocatalizador (Quintero, 1992), los costos del biocatalizador serian:

para (I)	567.7-599.2
(II)	283.8-299.4
(III)	252.6-266.4

Integración de las ecuaciones de los modelos cinéticos de la penicilino amidasa.
 ISIM INTERACTIVE SIMULATOR

\$ list

```

1 : REACCION INTERMITIENTE. DIVERSOS MODELOS CINETICOS
2 : PARA LA ENZIMA PENICILINO AMIDASA.
3 CONSTANT VF=0, KF=0, CF=0, FO=0, CS=0, CP=0, SEQ=0
4 CONSTANT CINT=5, T=0, TFIN=500
5 PRINT "ESPECIFQUE 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), FO (SO DE PENICILINA, mM) "
8 PRINT "SEQ (CONC. 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 GAPA=", CP
15 PRINT "Ks PGK=", CS
16 PRINT "SO PGK=", FO
17 PRINT "SEQ PGK=", SEQ
18 :
19 SIM
20 GO TO 1
21 :
22 INITIAL
23 T=0; F=FO; FI=FO; YI=FO; YX=FO; YZ=FO
24 DYNAMIC
25 :
26 : MICHAELIS MENTEN
27 F' = -(VF*F) / (KF+F)
28 XF = (FO-F) / FO
29 :
30 : INHIBICION COMPETITIVA
31 FI' = -(VF*FI) / (FI + (KF*(1+(FO-FI)/CF)))
32 XI = (FO-FI) / FO
33 :
34 : INHIBICION COMPETITIVA Y SUSTRATO
35 YI' = -(VF*YI) / (YI + (KF*(1+(FO-YI)/CF)) + (YI*YI/CS))
36 XS = (FO-YI) / FO
37 :
38 : INHIBICION COMPETITIVA, NO COMPETITIVA Y SUSTRATO
39 P=FO-YX
40 I=FO-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 = (FO-YZ) / FO
48 : MODELO I.....ENZ. MICROB. TECHNOL. 1982, 4, 35.
49 YX' = -(VF*YX) / ((YX*S1) + (KF*S2) + (YX*YX/CS))
50 XT = (FO-YX) / FO
51 :
52 : TRES INHIBICIONES, CORRECCION POR EQUILIBRIO
53 XE = (FO*XT-SEQ) / FO
54 X3 = (FO*X2-SEQ) / FO
55 :
56 OUTPUT T, XT, XE, X2, X3

```

57 PREPARE T,XT,XE,X2,X3

\$ VAL FO	=	214.00
\$ VAL KF	=	12.000
\$ VAL CF	=	51.550
\$ VAL VF	=	3.4000
\$ VAL P	=	0.00000
\$ VAL CS	=	459.00
\$ VAL CP	=	234.30
\$ VAL SEQ	=	5.6000
\$ VAL CINT	=	20.000
\$ VAL TFIN	=	300.00