

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

2



PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO
POR HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA
PENICILINA G.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PRESENTA:

Lidia T. Casas Torres

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

M. EN C. EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA



2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

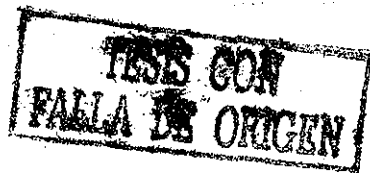
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

A mi esposo Arturo

Por su capacidad de comprensión
y entendimiento hacia todas las
cosas que me agradan y ayudan a
mi superación.

A mi hija Ximena

Por la dicha de poder compartir
con ella una de tantas metas de
mi vida.



A mis padres Graciela y
Fernando

Por la formación adquirida a
través de su ejemplo.

Al Dr. Rodolfo Quintero por el apoyo y la asesoría en la realización del trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Fernando Bastarrachea por la dirección académica en el área de Microbiología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al M. en C. Fernando García por su asesoramiento en el trabajo del laboratorio.

INTRODUCCION

Desde la aparición de la penicilina en 1929 con el descubrimiento hecho por Fleming se abre una nueva era en el desarrollo de los Antibióticos. Sin embargo muchos problemas de toxicidad, absorción en el organismo, espectro antibacteriano y producción se tuvieron que resolver antes de que la penicilina fuera un antibiótico de uso clínico. Esto dió lugar a un conocimiento mayor en cada uno de estos campos y así a un gran avance tecnológico. Para los años de 1950 ya se había resuelto el problema de producción, las cepas utilizadas una vez mutadas produjeron mayor cantidad de penicilina, se adecuaron las condiciones de crecimiento y nutrición del microorganismo, los químicos orgánicos prepararon varias sales de penicilina que fueron más estables y más solubles en medios acuos (benzatínica y procaínica) que redujeron problemas en el sitio de inyección, hubo una mayor-uniformidad en la distribución dentro del organismo, niveles más altos y prolongados en sueros así como una incidencia menor en reacciones de alergia. Se produjeron penicilinas nuevas al usar otros precursores en el medio de cultivo (la fenoximetil penicilina o penicilina O y butiltiometil penicilina o penicilina S). Desafortunadamente sólo los derivados monosustituídos del ácido se aceptaban como precursores y ninguna de las penicilinas resultantes por este procedimiento diferían en sus propiedades antibacteriales de las penicilinas naturales.

Cuando la estructura de las penicilinas fué finalmente establecida como un ácido monocarboxílico con una unión amida fusionada con un anillo β -lactámico-tiazolidina, se iniciaron los intentos de cambiar



propiedades biológicas a través de modificaciones químicas, siendo estos esfuerzos fallidos por la limitación de introducir nuevos grupos en la cadena lateral, en el grupo fenilo o la esterificación del carboxilo en la tiazolidina o formación de amidas. Así después de 20 años del descubrimiento de Fleming no se tenía un antibiótico que tuviera mejor estabilidad al ácido, y espectro más amplio que la penicilina G.

El hallazgo en 1953, de que la cefalosporina N era una penicilina cuya cadena lateral se deriva del ácido ~~D~~-aminoadípico, y que ésta presenta una actividad de solo 0.01 contra Staphylococcus aureus pero apreciablemente más activa contra bacterias gram negativas, dió la pauta para pensar en que el cambio en la cadena lateral en la penicilina incrementa su actividad contra bacterias gram negativas.

Desarrollo de Penicilinas Semisintéticas, Importancia del Acido 6-amino--penicilánico

Estimulados por el hallazgo de que la modificación en las cadenas laterales influyen fundamentalmente en el espectro antibacteriano y estabilidad al ácido, los químicos y microbiólogos intensificaron sus esfuerzos teniéndose como resultado la creación de las denominadas penicilinas semisintéticas.

En 1957, Sheehan y Henery-Logan realizaron la síntesis de la penicilina V (fenoximetil penicilina), otro suceso importante fue la ciclización del ácido penicilóico a través del uso de la N' N' dicloetilcarbodiimida, y 2 años después estos autores reportaron la síntesis del ácido 6-aminopenicilánico, pero la complejidad del método y su bajo rendimiento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

no. la hacía accesible a la industria. En 1959 Batchelor y colaboradores informaron el aislamiento del núcleo de la penicilina de un medio de fermentación de *Penicillium chrysogenum* al cual no se le había añadido precursor, hallazgos que ya habían sido mencionado por Kato, Sakaguchi y Murao.

Batchelor y colaboradores verificaron la estructura del "núcleo-penicílico" y lo llamaron el ácido 6-amino-penicilánico (6-APA) que con el ácido fenil acético daba la bencilpenicilina y con el ácido p-Hidroxifenil acético la fenoximetil penicilina.

El 6-APA es un anillo β -lactámico-tiazolidina (Figura 1).

Su fórmula general es $C_8H_{12}O_2S$, punto de fusión de 208-109°C, es destruido por la β -lactamasa (de filtrado de *B. cereus*) pero a mucho menor velocidad que la bencilpenicilina, como las penicilinas se descomponen rápidamente en álcalis fuertes pero es relativamente estable a ácidos, es un ácido fuerte; su punto isoelectrico es de 4.3, el grupo ácido tiene un pK_a de 2.3 y el grupo amino de 5.1. En general el 6-APA muestra mucho menor actividad que la penicilina contra bacterias gram positivas (Tabla 1).

Una vez comprobado que el 6-APA era el farmacóforo de la penicilina, y que su función amida sirve para modular la clase e intensidad de la actividad microbiana, se empezaron a hacer intentos para su producción, por *Penicillium chrysogenum* en un medio rico y costoso, ya que este era el usado para producir penicilina sin añadirle precursor, por lo que no era adecuado para uso industrial, otras cepas que producen 6-APA pero

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 1. ACIDO 6-AMINOPENICILANICO

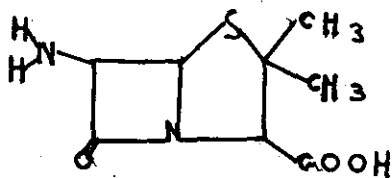


TABLA 1. CONCENTRACIONES MINIMAS (mcg/ml.) PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS

Bacterias	Acido 6-amino penicilánico	Bencilpenicilina
<u>S. aureus</u> (Oxford)	62.5	0.02
<u>S. pyogenes</u> BRL 1083	250	7250
<u>S. viridians</u> BRL 1479	50	0.02
<u>S. pyogenes</u> hemolítico BRL 1231	125	0.05
<u>Diplococcus pneumoniae</u> BRL (1218)	62.5	0.005
<u>Corynebacterium hofmanni</u> BRL (1218)	1.25	0.01
<u>Escherichia coli</u>	50	50
<u>Proteus vulgaris</u>	7250	7250
<u>Salmonella typhi</u>	50	50
<u>Shingella shigaeae</u>	50	50

que presentan el mismo problema que el Penicillium, son las utilizadas en la producción de cefalosporinas como Cephalosporium samasynemmatum y Emericellopsis minima y algunos dermatófitos como Epidermaphyton interdigitale y Trichophyton gypseum.

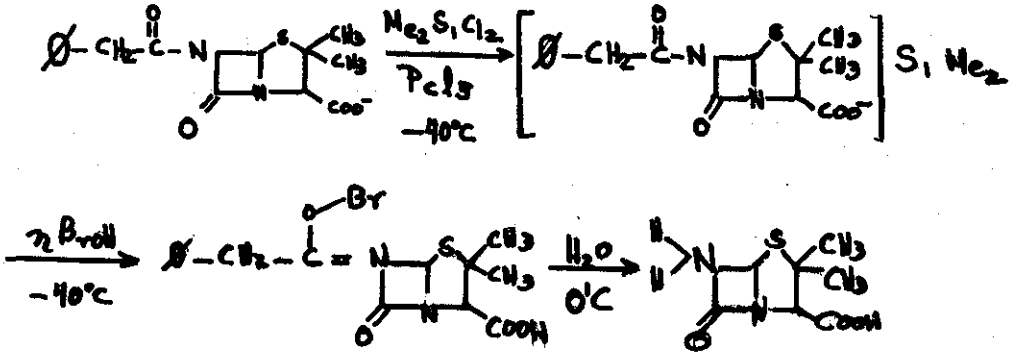
En 1967 se descubrió una ruta química práctica que fué y ha sido lo que se utilizó para la producción del 6-APA (Figura 2). Esta ruta consiste en la formación de silil ésteres para proteger el grupo carboxilo, la reacción se inicia a 4°C, disolviendo la penicilina en cloruro de metileno, se le agrega el dimetil-cloro-silano permitiendo que la temperatura se eleve hasta 20°C.

La sililación se lleva a cabo durante 30 minutos transcurridos éstos se empieza a descender la temperatura hasta -60°C. Una vez que se alcanza la temperatura deseada se agrega pentacloruro, permitiéndose posteriormente el ascenso de la temperatura hasta (-35°C) y se agrega la dimetil-anilina, dejándose durante 10 minutos para que la reacción de cloración se lleve a cabo.

Se agrega metanol a -90°C, asciende la temperatura a -60°C y se mantiene así por 1 1/2 hrs.

Posteriormente al imido-cloro, se le adiciona agua (ésta sin ningún tratamiento, a una temperatura de 3°C) obteniéndose el 6-APA a un pH ácido. La temperatura de la mezcla de reacción es entonces de -17°C, el tiempo de hidrólisis de 13 minutos (es importante respetar el tiempo de hidrólisis ya que de lo contrario el 6-APA se puede degradar).

FIGURA 2. REACCION DE LA HIDROLISIS QUIMICA DE BENCIL-PENICILINA PARA PRODUCIR 6-APA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis el pH se incrementa poco a poco con NH_4OH hasta un valor de 1.6.

Se hace separación de fases: la fase acuosa que es la que contiene el 6-APA se lleva a un pH = 4.2 con hidróxido de amonio en un tiempo de 10 minutos, a temperatura constante de 0°C. El metanol reacciona con el ácido fenil acético formándose el fenil-acetato de metilo.

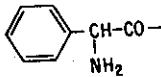
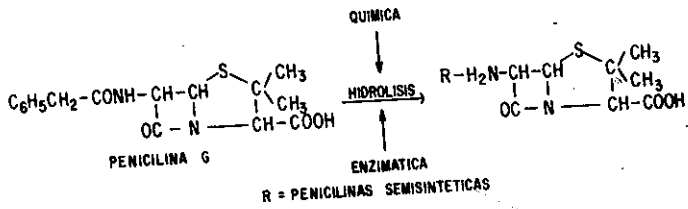
La cristalización del 6-APA se lleva a cabo durante toda la noche. Posteriormente se centrifuga y se seca en un horno atmosférico.

El último paso para formar las penicilinas semisintéticas, una vez obtenido el ácido 6-aminopenicilánico es hacer reaccionar éste con cloruros del ácido de diferentes compuestos (Figura 3), que reaccionan con el grupo amino del 6-APA constituyéndose así la cadena lateral del antibiótico unida al anillo β -lactámico.

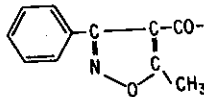
Importancia de la Ingeniería Enzimática con la Penicilina Amidasa en la Producción de Penicilinas Semisintéticas

En los años de 1960, al mismo tiempo que laboratorios Bristol informaban obtener altos rendimientos en la producción del 6-APA por vía química, otros laboratorios como Beechan Chas Pfizer, Co. Inc., Farbenfabriken Bayer AG y aún el mismo Bristol, publicaban el tratamiento de penicilinas puras con una amidasa, hallazgo ya informado, por Sakaguchi y Murao, haciéndose más factible, la producción del 6-APA. Por esta misma época aparecen varias publicaciones que muestran una gran potencia del uso de enzimas en proceso industriales. Esto se hacía immobilizando las enzimas

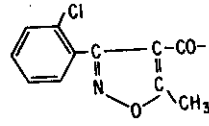
FIGURA 3. SINTESIS DE PENICILINAS SEMISINTETICAS



AMPICILINA



OXACILINA



CLOXACILINA

puras o semipuras en diferentes soportes de origen orgánico e inorgánico. Como ejemplo podemos citar los trabajos de McLoren y Zittle con sus estudios en adsorción de enzimas en soportes inorgánicos, y Katchalski y Mitz en la inmovilización de enzimas por enlace covalente a matrices inorgánicas.

Este tratamiento en las enzimas resuelven varios problemas que tenían para su uso como catalizadores, como es el de estabilidad ya que de esta forma es posible la utilización, de las enzimas en presencia de solventes orgánicos y en rango de temperaturas de -20°C hasta -60°C . Por otro lado el catalizador puede utilizarse en repetidas ocasiones sin temor a perder la enzima al parar la reacción para separarla de productos y subtratos, por estar ésta inmovilizada.

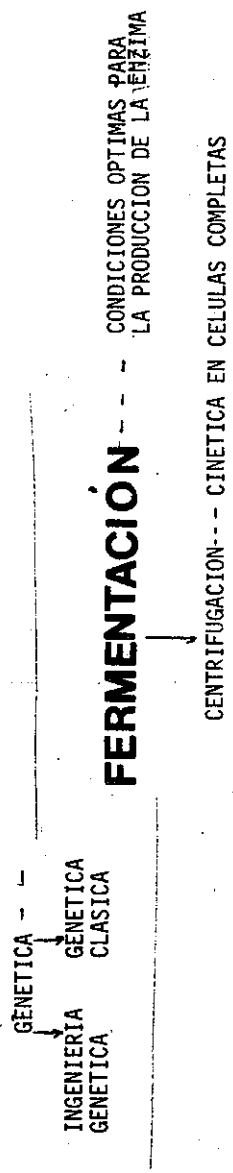
La tecnología enzimática también es un procedimiento adecuado en procesos industriales, ya que la producción de enzimas a través de microorganismos es barata, no está restringida a alguna localización o estación del año y su tiempo de producción es corto.

Una variación posterior en la tecnología enzimática fué la inmovilización de los microorganismos que producían estas enzimas, evitándose así la extracción y purificación enzimática del proceso, además de poder utilizar multisistemas enzimáticos presentados en ellos.

Así en 1973, se puso en marcha la producción continua de ácido aspártico con células microbianas inmovilizadas.

Si analizamos el proceso global para el desarrollo de un producto, cualquiera, mediante el uso de esta tecnología tendremos un diagrama como el presentado en la Figura 4, en donde se infiere la colaboración

ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DEL PROCESO



RUPTURA CELULAR INMOVILIZACIÓN CELULAR

PURIFICACIÓN

INMOVILIZACION → BIOCATALIZADOR

REACTOR → PROCESO DE SEPARACION

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 4.

interdisciplinaria para llegar al objetivo deseado.

En la fuente del microorganismo tenemos la interacción con la microbiología en la optimización de las condiciones ambientales en un medio de cultivo, para la producción de la enzima o enzimas deseadas, así como con la genética para el mejoramiento de cepas productoras de enzimas.

En el área de inmovilización tenemos la interacción de química y bioquímica, que estudian las propiedades de la reacción enzimática - como son, estabilidad de sustrato, producto y enzima en las condiciones óptimas de pH, temperatura y osmolaridad en las cuales la reacción se realiza, así como la cinética enzimática que la rige. Estos estudios son -- hechos tanto en el sistema de enzimas solubles, como para el sistema inmo- vilizado, ya que en este último habrá un cambio con respecto al primero, debido a las modificaciones esteroquímicas que sufre la enzima al inmovi- lizarse, como al cambio en el ambiente (microambiente) por el soporte o - matriz en el cual se encuentra, esto dependerá de las características del soporte así como del método de inmovilización utilizado.

Enzimas o células inmovilizadas se definen como "Enzimas o -- células microbianas" localizadas en una región definida, reteniendo sus - actividades catalíticas, las cuales pueden usarse repetidamente.

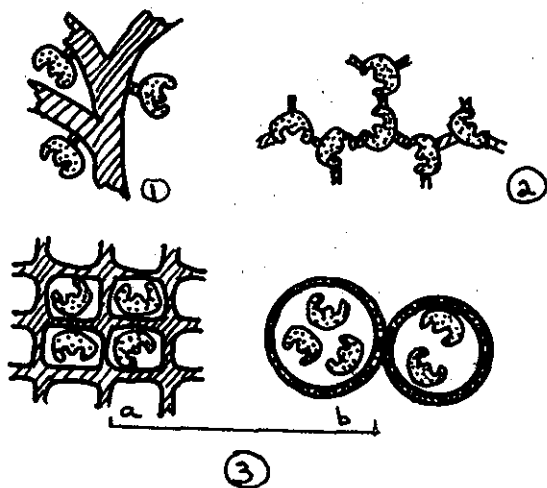
Los métodos de inmovilización se encuentran esquematizados en la Figura 5 y Tabla 2.

El método de inmovilización por atrapamiento se basa en con- finar enzimas o células en una matriz polimérica (atrapamiento en cristal

TABLA 2. METODOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS O CELULAS

Método		Fundamento
1. Unión al soporte	Adsorción física Unión iónica Unión covalente	Adsorción física de una proteína enzimática, o células microbianas en la superficie de un soporte insoluble en agua Unión de enzimas en soportes insolubles por unión covalente por los grupos, amino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo, imidazol y fenol.
2. Entrecruzamiento		Formación de redes entrecruzadas de los grupos aminos libres de los soportes y los grupos aminos de la enzima, por reactivos bifuncionales o multifuncionales
3. Atrapamiento	Tipo Cristal Tipo encapsulamiento	Confinar enzimas o células en una matriz polimérica o englobada en una membrana semipermeable

FIGURA 5. METODOS DE INMOVILIZACION



1. Método por unión al soporte
2. Método por entrecruzamiento
3. Método por atrapamiento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

o englobada en una membrana semipermeable (tipo encapsulación). Al inmovilizar por este método las enzimas o células no reaccionan con el soporte, solo quedan atrapadas en ellos.

El método de inmovilización por atrapamiento, tipo cristal es el más usado para inmovilizar células, y las matrices que se han utilizado son: colágena, gelatina, agar, triacetato de celulosa, alginato, poliacrilamida y poliestireno.

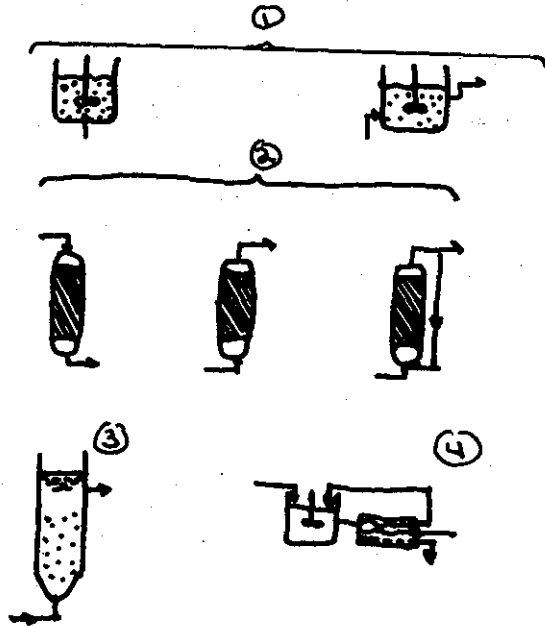
En este método una vez inmovilizadas las células, se da un -- tratamiento con un agente o mezcla de agentes polifuncionales, para darle mayor rigidez al catalizador, estos agentes pueden ser glutaraldehído, -- ácido tánico, dietilen amina, hexaetilen amina.

Una vez optimizadas las condiciones de inmovilización se prosigue al diseño y utilización de reactores enzimáticos, para lo cual son necesarios, conocimientos de ingeniería y todo el estudio previo de la -- reacción enzimática en el sistema inmovilizado. Existen diferentes tipos de reactores que se han clasificado por su forma de operación y caracte-- rísticas de flujo (Figura 6 y Tabla 3).

Para elegir o diseñar el tipo de reactor a utilizar es conveniente considerar, la reología de la reacción, la estabilidad del soporte a la agitación, la cinética enzimática, si hay inhibición por producto, -- es recomendable utilizar la columna empacada continua.

La columna empacada continua es el tipo de reactor más ampliamente utilizado en el uso de enzimas o células inmovilizadas, en este ca-

FIGURA 6. REACTORES ENZIMATICOS



1. Tanques agitados
2. Columnas empacadas
3. Columna fluidizada
4. Tanque agitado con ultrafiltración

→ Suministro del flujo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 3. REACTORES ENZIMATICOS

Forma de operación	Características del flujo	Tipo de reactor
Sistema intermitente	Mezclado perfecto	Reactor tanque agitado
Sistema continuo	Flujo pistón	Columna empacada Columna fluidizada Tubo enzima Enzima capa fina Fibra porosa
	Mezclado perfecto	Un solo reactor -- tanque agitado con tínulo (CSTR) o <u>múltiplos</u> tiples CSTR

so es necesario considerar la hidrodinámica del sistema que afecta la velocidad de reacción. Por otro lado existen tres formas de suministrar el flujo del substrato a la columna, esto es de arriba hacia abajo, de abajo hacia arriba o en forma reciclada, en algunos casos el flujo hacia abajo causa compresión en la columna, en general para aplicación industrial en estas columnas se prefiere el flujo de abajo hacia arriba.

Otros factores importantes para la aplicación industrial del proceso son: costo de los soportes o reactivos para la inmovilización, actividad enzimática del sistema inmovilizado, estabilidad operacional, la capacidad de regenerar el catalizador después de largos períodos de operación y contaminación microbiana del sistema.

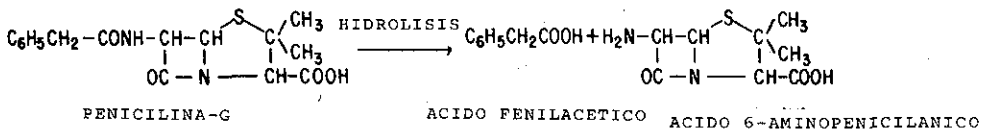
Por último en el proceso tendremos la separación y purificación del producto deseado, parte muy importante, en el que interviene un grupo de químicos y que muchas veces puede ser el factor limitante del proceso.

Para la producción de las penicilinas semisintéticas se utiliza la penicilina amidasa que realiza la hidrólisis de la penicilina y produce el ácido 6-aminopenicilánico (Figura 7).

La enzima es llamada usualmente penicilino acilasa, pero la comisión de enzimas la denominó penicilino amidasa E.C. 3.5.1.11.

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza encontrándose en forma intracelular y extracelular en tejidos animales, plantas, hongos, levaduras y bacterias, y en la mayoría de los casos esta producción se encuentra regulada, no siendo un sistema constitutivo.

FIGURA 7. REACCION DE HIDROLISIS DE LA PENICILINA-G POR LA PENICILINO
AMIDASA



La enzima no es específica para penicilinas, sino también hidrolisa ciertas cefalosporinas (N y C), aminoácidos, amidas y ésteres, su especificidad reside en la estructura del grupo acilo y esto la hace diferenciarse de otras enzimas (como las peptidasas).

Dependiendo de su origen la enzima es más afín para la penicilina-G o penicilina F.

En general la reacción no requiere de cofactores y no existe inhibición por metales pesados o agentes quelantes, el rango de temperatura de operación oscila entre 35°C y 35°C, a pH de 7-8.

De la cinética que rige la reacción podemos decir que existe inhibición competitiva por el fenil acético, inhibición no competitiva por el ácido 6-amino-penicilánico e inhibición por la penicilina-G, la reacción de hidrólisis puede ser reversible si se cambia el pH de la reacción a 5 unidades.

Si analizamos las condiciones de producción del ácido 6-amino-penicilánico por las vías química enzimática observaremos (Tabla 4) que en el proceso químico las materias primas son caras, muchas de ellas importadas además de tóxicas y condiciones extremas de temperatura (-60°C), necesitándose para ello solventes cuya recuperación no es costeable.

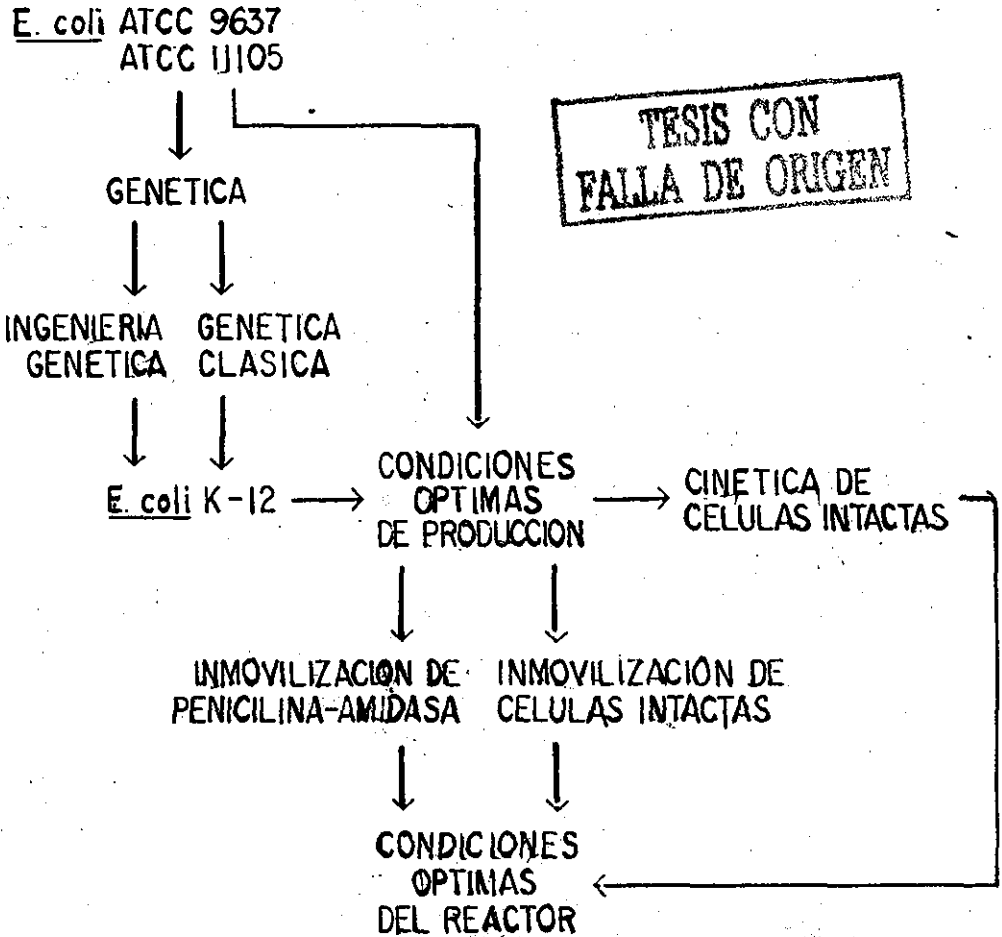
Así pues, el desarrollo de los antibióticos semisintéticos se ha visto mejorado con la introducción de esta nueva metodología por lo que consideramos importante la exploración del campo, para poder crear una tecnología adecuada y accesible en nuestro medio.

TABLA 4. MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DEL ACIDO 6-AMINO PENICILANICO

Ruta química	Ruta Enzimática
Dimetil anilina	Enzima
Dimetil diclorosilano	Buffer de fosfato
Pentacloruro de fósforo	Hidróxido de sodio
Amoníaco	Acido cíohídrico
Cloruro de metileno	Metanol
Butanol	
Acetona	
Metanol	

En el presente trabajo se muestra el proceso realizado para la producción del ácido 6-aminopenicilánico por la hidrólisis enzimática de la penicilina-G con la penicilina amidasa contenida en células de E. coli inmovilizadas (Figura 8).

FIGURA 8. DIAGRAMA DEL PROCESO PARA LA PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINO-PENICILANICO



ANTECEDENTES

Producción de la Penicilino Amidasa

Al igual que otros metabolitos la penicilino amidasa necesita condiciones específicas para su producción, en este inciso analizaremos - las fuentes de producción de la enzima, requerimiento de inductor, fuentes de nitrógeno y carbono, temperatura, pH y concentración de oxígeno di-
suelto que se ha utilizado en trabajos previos.

Fuentes de la Enzima

La penicilino amidasa se encuentra ampliamente distribuída en la naturaleza, desde enterobacterias actinomicetos, hongos y tejidos vege-
tales (Tablas 2.1, 2.2 y 2.3), su localización es indistinta de su origen, pudiendo encontrarse intracelular o extracelularmente, mientras que su --
afinidad por el sustrato será mayor hacia bencilpenicilina, si la enzima es producida por enterobacterias, y hacia fenoximetilpenicilina si es pro-
ducida por hongos. En las Tablas (2.1 y 2.2) se muestran los microorga--
nismos que producen la enzima, la afinidad que presentan y su localización en la célula.

Fuentes de Nitrógeno y otros Requerimientos

Como podemos observar en la Tabla (2.3), se han crecido los di-
ferentes microorganismos que producen la enzima, en medios de composición variable, y para la mejor producción de enzima se utilizan como fuente de nitrógeno mezclas de aminoácidos en forma de hidrolizado de proteína ó --

mezclas de péptidos en forma de peptonas ó proteínas con un peso molecular elevado. También encontramos que estos substratos pueden ser utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno a la vez. Para un mayor rendimiento celular se añaden iones inorgánicos como SO_4^{--} , Mg^{++} , K^+ y Cl^+ así como -- pequeñas cantidades de vitaminas y mezcla de factores de crecimiento como extracto de levadura.

Fuentes de Carbono

En cuanto a la utilización de fuentes de carbono podemos decir que la glucosa es un substrato adecuado para crecer cepas de Bacillus sp, micrococcus sp, Achromobacter sp, Bovista sp, Streptomyces en las cuales no se ha informado de ningún tipo de represión por carbohidratos. En la cepa de Proteus rittgeri, no se ha informado del efecto de glucosa en el medio de cultivo, por lo que tal vez en estas cepas exista algún tipo de regulación catabólica aunque no se han informado estudios al respecto.

En el caso de la producción de la penicilino amidasa por E. coli se ha encontrado que existe represión catabólica condiferentes fuentes de carbono, Ssentirmai (11) informa que la penicilino amidasa producida por E. coli ATCC 9637 se ve reprimida por carbohidratos y polialcoholes (glucosa, fructosa y glicerol), en el caso del uso de glicerol la represión depende de la concentración. Klein y Wagner (26) también encuentran represión en el caso de la amidasa producida por E. coli ATCC-11105 crecida en lactosa, glucosa ó fructosa, sin embargo en la mutante híbrida E. coli 5K (pHM12) se incrementa la producción de la enzima al crecer el organismo en estas fuentes de carbono.

Vojtisek, Slezak (24) encuentran represión por glucosa y acetato en la producción de la amidasa producida en E. coli, y demuestran que la represión está regulada por el AMP^c, ellos proponen que la derepresión de la síntesis de la amidasa por el AMP^c en un medio con glucosa y fenilacético se debe a la derepresión de otras enzimas responsables de la degradación del ácido fenilacético. A su vez recomiendan el lactato como fuente neutral de carbono.

Gang y Shaikh (30) también encuentran que la regulación en presencia de glucosa se encuentra medida por los niveles de AMP^c; por sus hallazgos proponen que la regulación es a nivel de transcripción.

Vojtisek y Vladimir (21), aislan una mutante de E. coli insensible a represión por glucosa y glicerol, al crecer el microorganismo en fenoxiacetamida en diferentes pasos con presencia y ausencia de 0.0025% de NH₄⁺ además de aumentar la producción de la enzima 10 veces.

Efecto del Acido Fenilacético en la Producción de la Penicilino Amidasa

Se encontró que la habilidad para producir la enzima se incrementa si se introduce dióxido de carbono junto con el aire durante la fase de crecimiento (18), sin embargo la substancia identificada como inductor en el sistema regulatorio para la producción de la enzima es el ácido fenilacético, éste estimula la producción de la enzima de 8 a 10 veces (11), en concentraciones que varían de un 0.1% a 0.3% p/v, el uso de concentraciones mayores reprimen la producción de la enzima en E. coli (11,18), y Micrococcus luteus (31). Otro efecto del ácido fenilacético en el medio de cultivo es que retarda, disminuye ó inhibe el crecimiento celular (4,15,8) en --

E. coli, Bacillus megaterium y Kluyvera citrophila, por lo que se ha propuesto añadirlo en diferentes etapas del crecimiento; ésto ha resultado adecuado para Bacillus megaterium, (15) y Micrococcus luteus (31) en donde se añade después de 12 hrs. de crecimiento cuando los microorganismos se encuentran en la fase exponencial. Szentirmai informa que para producir penicilino amidasa, en E. coli hay que agregar el ácido fenil acético en las primeras 0 - 5 hrs. de crecimiento para lograr una óptima producción de la enzima y que éste estímulo disminuye cuando el ácido se añade después de 10 y 15 hrs. de crecimiento; sin embargo, estos procedimientos no hacen que se aumente el rendimiento celular, encontrándose 0.2 mg/ml en peso seco de células de E. coli crecida en medio glutámico (Ver apéndice).

Temperatura

En general podemos decir que la temperatura óptima de producción de la enzima en todos los microorganismos productores de la enzima oscila entre 25 y 30°C, no siendo siempre esta temperatura, la óptima para el crecimiento del microorganismo. En el caso específico de E. coli su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y en la cual se produce menor cantidad de enzima. Klein y Wagner (26) informan que en E. coli ATCC 11105 un cambio de temperatura de 27°C a 24°C a las 5 hrs. de crecimiento incrementa la actividad enzimática en 15 unidades, este cambio se lleva a cabo un poco antes de que el microorganismo entre a la fase estacionaria de su crecimiento ya que de hacerlo en la fase estacionaria, o en la fase exponencial temprana no se produce ningún incremento en la producción de enzima.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto del pH en la Producción de la Penicilino Amidasa

En general podemos decir que los experimentos realizados en la producción de la penicilino amidasa, se han hecho relacionando la máxima - productividad con el pH inicial de medio, encontrándose en el caso de --- Micrococcus luteus (31) que la máxima productividad se encuentra cuando el medio de cultivo tiene un pH inicial (después de esterilizar) de 7. -- También se encuentra que cuando el Micrococcus se cultiva fuera de un rango de pH de 6 - 9 unidades no hay producción de enzima ni crecimiento celular.

En la Tabla 3 podemos observar que el pH inicial en general es de 7.0 no importando la naturaleza del medio, ni el microorganismo con el cual se esté trabajando. Tal parece que un factor importante a considerar es el de no detener la fermentación en la producción de la penicilino amidasa antes de que el pH haya llegado a 8.0 unidades (4,31,39); incluso, -- existen criterios para la producción de penicilino amidasa en E. coli, en los que se recomienda que la fermentación debe de prolongarse durante el - tiempo que se tarde en rebasar un pH de 8.0.

Aereación en la Producción de la Penicilino Amidasa

Con respecto a la cantidad de oxígeno necesario para la producción de la penicilino amidasa, podemos decir que ésta se sintetiza en condiciones medias de aereación, Mam, D Ryu (31) informan que la máxima actividad enzimática para Micrococcus luteus se obtiene cuando se cultiva el microorganismo, en 100 ml. de medio, en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Sin

embargo, Okachi, Misawa y Nara (8) no encuentran diferencias en la producción de enzima producida en diferentes condiciones de aereación. Vojtisek y Slezak, informan que para E. coli la síntesis de la enzima puede ser totalmente reprimida por el incremento en la concentración de oxígeno disuelto.

La experiencia en la producción de la enzima por cultivo continuo es realmente escasa. Bohumil y Slezak (32) encuentran que en un cultivo continuo con una velocidad de dilución de 0.5 hr^{-1} y una concentración de ácido fenilacético de 0.015% p/v, la actividad enzimática se pierde y es restablecida cuando se aumenta la concentración del ácido fenilacético al 0.15% p/v. La pérdida enzimática probablemente se debe a la cantidad insuficiente de inductor en el medio para inducir la actividad enzimática durante todo el proceso.

También se han hecho estudios en Bacillus licheniformis 749/c por Acevedo y Cooney (9) en donde se encuentran que por unidad de peso de proteína extracelular la amidasa se incrementa un 50% en condiciones de limitación de nitrógeno.

TABLA 2.1 MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN BENCILPENICILINO AMIDASA
C.P.M. Cole. (52)

Microorganismo	Tipo de Penicilina que hidroliza o sintetiza	Observaciones
<u>E. coli</u> ATCC 9637 (O-NCIB 8666)	Penicilina G-2-Hidroxipenicilina G (síntesis)	Reacción reversible, unida a pared celular
<u>E. coli</u> ATCC 11105 (O-NCIB 8878)	Penicilina G-2-Hidroxipenicilina G (síntesis)	Enzima unida a célula
<u>E. coli</u> X G3A9455	Penicilina G, V, Ampicilina	Uso de bacterias completas
<u>E. coli</u> aisladas en clínica NCIB 7641, 8742, 8744	Penicilina G y Ampicilina	
<u>Alcaligenes faecalis</u>	Penicilina G, V, K, feneticilina, ampicilina	Enzima intracelular
<u>Proteus rettgeri</u> FD 13424 ATCC 9919 ATCC 9250	Penicilina G, V, X y -- otras penicilinas	Enzima intracelular
<u>Nocardia</u> FD 469 ATCC 13635	Penicilina G, X, V y otras incluyendo amidas de penicilinas	
<u>Bacillus negaterium</u> ATCC 14945	Penicilina G n-fenilacetilamino ácidos	Enzima extracelular
<u>Micrococcus luteus</u> AHV 1427	Penicilina G	Enzima intracelular
<u>Micrococcus roseus</u>	Penicilina G	Enzima intracelular
<u>Kluyvera citrophila</u> Ky 3641	Penicilina G	Enzima intracelular

TABLA 2.2 MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN FENOXIMETILPENICILINO AMIDASA
(C.P. M. Cole (52))

Microorganismo	Tipo de Penicilina que hidroliza	Observaciones
<u>Streptomyces lavendulae</u>	Penicilina V, K y F	Enzima extracelular, reacción reversible
<u>Penicillium</u> y otras <u>Penicillium</u>	Penicilina V, K, F y -- carboxipenicilinas	Baja actividad en el micelio
<u>Emirellopsis minima</u>	Penicilina V	Enzima intracelular
<u>Trichophyton mentagrophytes</u> <u>Epidermophyton floccosum</u>	Penicilina V y G	Baja actividad
<u>Aspergillus achraceus</u>	Penicilina V	
<u>Cephalosporium sp.</u>	Penicilina V	Baja actividad en -- micelio
<u>Achromobacter sp.</u> NCIB 9424	Penicilina V	Enzima intracelular, hidroliza otras fenoxiacetil ácidos

TABLA 2.3

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Sales minerales	% p/v de inductor	Condiciones ambientales Temp. °C pH agitación	Observaciones	Referencia
<u>E. coli</u> 9637	glucosa	Agua de cocción de maíz	K ₂ PO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O Co, Fe, Cu Zn, Mg, Mo	--	30 7 120 rpm		1
<u>Micrococcus luteus</u> AHU 1427	medio	Rico		--	30 7 300 rpm		2
<u>E. coli</u> ATCC 9637	glutamato de sodio	(NH ₄) ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	0.2	30 7		3
<u>E. coli</u> ATCC 9637 NCI-B 8743	Licor de Maíz o Extracto de levadura	(NH ₄) ₂ SO ₄		0.1-0.35	24 7.0 250 rpm .4-.9 (VVM)	La adición del fenil acético se hace c/hora hasta completar 0.35% p/v de FA. La fermentación se para cuando el pH sube de 8.0	4
<u>Bacillus megaterium</u> ATCC 14945	glucosa	Hidrolizado de caseína		0.15	30 7 0.2HP/100 gal	El ácido fenil acético se añade después de 8 hrs. de fermentación	4
<u>E. coli</u> ATCC 9637	glutamato de sodio	peptona extracto de levadura	KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ FeCl ₃	0.2	30 7 +	Fenoxiacético. El inductor en este caso es el ácido	5

TABLA 2.3 (continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Sales minerales	% p/v de inductor	Condiciones ambientales Temp. °C	pH	agitación	Observaciones	Referencia
<u>E. coli</u> ATCC 9637		extracto de carne							6
		extracto de levadura	Na Cl	0.2	24	7	+		
<u>E. coli</u>	parafina cetanol	aceite de soya licor de maiz		0.15	25	6.6	+		7
<u>Kluyvera citro-</u> <u>phila K y 3641</u>	glutamato sodio medio Bouillon			0.2	30	7	+		8
<u>Bacillus liche-</u> <u>niformes 749 C</u>	Agar de dextrosa papa	casaminoácidos extracto levadura	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	0.15	30	7	+		9
<u>Micrococcus roseus</u>	glucosa	infusión corazón	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	--	25	7	+	Es posible cultivar la cepa E. coli 9637 en este medio con 0.15% de ácido F.A.	10
<u>E. coli</u> ny I/3-67	ácido glutámico extracto de levadura			0.2	28	7	300 rpm		11
<u>Proteus fittgeri</u> ATCC 9250		hidrolizado de caseína		--	28	68.7	+		12

TABLA 2.3 (continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Sales minerales	% p/v de inductor	Condiciones ambientales Temp. °C pH agitación	Observaciones	Referencia
<u>E. coli</u>	Fenil acetato					La enzima se sintetiza en la fase exponencial. El tiempo de generación en el medio es de 2, la máxima velocidad de síntesis se alcanza cuando se crece en ac. F.A. como única fuente de carbono. La síntesis de la enzima es totalmente reprimida cuando se incrementa la concentración de O ₂ disuelto.	23 - 34 -
<u>E. coli</u> ATCC 11105	Extracto de levadura, triptona, extracto de carne		NaCl	+	27 cambio 25 a las 6 hrs.	El tiempo en el cambio de la temperatura es crítico y debe hacerse a una D = 6 a 546 nm	26
<u>E. coli</u> 5K (pH M12) Híbrida	Extracto de levadura Triptona Extracto de carne		NaCl	--	27°C	El ácido fenil acético reprime	26

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 2.3 (continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Sales minerales	% p/v de inductor	Temp. °C	Condiciones ambientales	Observaciones	Referencia
						pH		
						agitación		
<u>Bacillus megaterium 1495</u>	Glicerol	casaminoácidos		0.1	30	7	El ácido fenil acético se añade después de 12 hrs. de haber iniciado la fermentación por inhibir el crecimiento. La producción de enzima es paralela al crecimiento.	15
<u>E. coli</u>	Licor de maíz			0.2	28	7.6	La fermentación dura 30 hrs.	16
<u>Bacillus megaterium 14945</u>	Glucosa	hidrolizado caseína		0.15		7.0	La fermentación dura 48 hrs. a 72 hrs.	17
<u>Micrococcus roseus 516</u>	Glucosa	infusión corazón	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	0.15		7	Aislan bacterias del suelo y mutan con nitrosoguanidina	18
Probable <u>E. coli</u> aislada del suelo	Glucosa	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄ MgSO ₄	0.1	25-30	7.0		19
<u>Achromobacter sp</u>	Glucosa	extracto levadura	K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ KCl FeSO ₄	--	26			19

TABLA 2.3 (continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Sales minerales	% p/v de inductor	Condiciones ambientales Temp. °C pH agitación	Observaciones	Referencia
<u>Bovista plumbea</u> NRRL 3501	Glucosa	Hidrolizado de extracto levadura	KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ Ca(NO ₃) ₂ NaCl FeSO ₄			Hidroliza fenoximetil penicilina	20
<u>E. coli</u> D-PH-CHOHCNH ₂							21
<u>Streptomyces lavendulae</u>	Glucosa	Harina de soya extracto levadura	NaCl Ca(CO ₃) ₂		27 7 520 rpm 7.2	Obtención de cepas constitutivas sin represión por glucosa y glicerol	27
<u>E. coli</u> ATCC 11105 y 9637	CO ₂	Licor de maíz		0.2	31 7.0 150 lt. aire/min 150 rpm a 10 lt/min.	El CO ₂ se añade en la fase exponencial	28
<u>E. coli</u> ATCC NCIB 8743		Extracto de levadura		0.3 c/hora	24 7 20 lt/min 430 rev/min en 100 lt.	La producción se para cuando el pH es mayor	29
<u>E. coli</u>	ácido succínico	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄	0.07	28 230 rpm		30

TABLA 2.3 (continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Sales minerales	% p/v de inductor	Condiciones ambientales Temp. °C pH agitación	Observaciones	Referencia
<u>E. coli</u>	Licor de maíz	Peptona aceite de frijol de soya		0.015	27 - 29 7.2 0.8 VVM 1.5 ml 0.2/min.		32
<u>Bacillus megaterium</u> ATCC 1496	Glucosa	hidrolizado		0.15	30 7 +		13
<u>Bacillus megaterium</u> ATCC 1496	Glucosa	Extracto carne	NaCl		30 7 +		13
Mutante de <u>E. coli</u>		Peptona extracto de levadura		0.1	23 - 30 7 250 rpm	La mayor actividad se encuentra cuando la cepa se cultiva entre 23 y 25°C.	14
<u>Kluyvera citrophilis</u> ATCC 21285		Peptona Licor de maíz Extracto de levadura		0.5 y 3	30	El inductor es el glutamato, la fermentación dura 48 hrs.	22

Características Fisicoquímicas de la Penicilino Amidasa

Ya han sido varios los trabajos que se han realizado en la purificación y cristalización de la penicilino amidasa (Tabla 2.4). En general podemos decir que ésta tiene un peso molecular que oscila entre 50 000 y 70 000 daltones, para diferentes métodos de purificación y determinación del peso molecular. Carl Kutzbach (35) encontró que la enzima tiene un -- peso molecular aproximado de 70 000 y que en 1% de dodecil sulfato de so-- dio la enzima es disociada reversiblemente dando unidades de un peso mole-- cular de 20 500.

La enzima purificada de E. coli tiene varias especies activas, distinguidas por su comportamiento electroforético (35,4,33), esto es dos puntos isoeléctricos de 6.7, 6.8 y de 6.3 - 6.4.

La energía de activación del rompimiento hidrolítico de la -- bencilpenicilina por la penicilino amidasa procedente de E. coli es de -- 11.4 kcal/mol (33) y para ello no necesita la participación de cofactores o metales pesados (35).

pH Optimo en la Actividad de la Penicilino Amidasa

En general podemos decir que el pH óptimo para la actividad hi-- drolítica de la penicilino amidasa, oscila entre 7 y 9 unidades de pH.

Específicamente la enzima procedente de células de E. coli pre-- senta una actividad máxima a pH de 8.0 - 8.2 (33,4,35,29).

SavitsRaya, Levitov y Shellenberg (33), observaron que para la enzima producida por E. coli se presenta un perfil de pH en forma de campa

TABLA 2.4 PESOS MOLECULARES DE LA PENICILINA AMIDADA PURIFICADA DE DIFERENTES MICROORGANISMOS

Microorganismos	Peso molecular	Método de determinación PM	Referencia
<u>Escherichia coli</u>	50 000 - 70 000		35
<u>Escherichia coli</u>	53 000 + 1 000	Filtración en gel	33
<u>Escherichia coli</u>	71 000 + 2 000	Sedimentación en equilibrio	4
<u>Bacillus megaterium</u>	120 000	Sedimentación en equilibrio	4
<u>Bacillus megaterium</u>	70 000 + 5.000	Filtración en gel	4
<u>Erwinia aricideae</u>	62 000	Capa fina	40
<u>Kluyvera citrophyla</u>	63 000	Electrofoque	41
<u>Micrococcus luteus</u>	79 000		2

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

na, por lo que deben de existir tres formas de equilibrio: ácido (AH_2^+), -- neutral (AH^0) y básica (A^-) distribuidos en forma normal.

La transición entre las tres formas del complejo penicilino --- amidasa - bencilpenicilina, está controlada por dos grupos ionógenos AH_2^+
 $\frac{K_1}{K_2}$ $AH \frac{K_2}{K_1} A^-$. A 25°C los pk_1 y pk_2 del complejo enzima-substrato -- son de 6.05 y 10.0 respectivamente y varían con el incremento de la tempera- tura, a 40°C el pk_1 es de 5.8 y el pk_2 de 10.2.

Se piensa que el grupo ionógeno con un pk de cerca de 6.0, con- trola la actividad catalítica de la enzima y se puede identificar por un -- grupo imidazol de histidina y el grupo ionógeno con un pk de cerca de 10, - debe corresponder al mantenimiento del centro activo de la enzima que puede ser un grupo E - amino de lisina o un grupo hidroxilo de tirosina. En la - Tabla 2.5 se muestran los pH óptimos para enzimas procedentes de diferentes microorganismos.

El buffer a usar dependerá del substrato a hidrolizar; en el -- caso específico de la bencilpenicilina se ha utilizado buffer de fosfato de potasio con una molaridad que oscila entre 0.1 a 0.03 M. (2,4,5,17,29,33,34, 35,36,37,38). Para la hidrólisis de ácido penicilánico con enzima prove--- niente de M. roseus no se encontró diferencia al utilizar buffers de borato de potasio, cloruro de amonio y fosfato de potasio (10). Sin embargo el pH óptimo para hidrolizar el ac. 6-nitro-3fenilacetamino - benzoico, dependera del buffer que se esté utilizando (acetatos, fosfatos, boratos, tris-Hcl).

Temperatura Óptima: Como podemos observar en la Tabla 2.5 la -- temperatura óptima depende más de su origen que del tipo de enzima que este

mos hablando, así encontramos variaciones de temperatura que oscilan desde los 20°C. hasta los 55°C. Otro punto importante que hay que hacer notar -- es la variación en la temperatura óptima según el estado en el que se encuentra la enzima, como es el caso de la penicilino amidasa de E. coli, en células completas, libres o inmovilizadas. Sin embargo esta enzima tiene una baja estabilidad a 50°C. en cualquier estado que la encontremos (4,35). Se ha observado que la actividad para la enzima soluble se pierde rápidamente al tratarse con solventes orgánicos como acetona y al liofilizarse (35), se observó que las mejores condiciones de almacenamiento son en una solución congelada o una suspensión de la enzima en cristales en sulfato de amonio.

TABLA 2.5 TEMPERATURA Y pH OPTIMO PARA LA ACTIVIDAD DE PENICILINO AMIDASA EN DIFERENTES MICROORGANISMOS

Penicilino amidasa G Microorganismo	pH	Temp.	Penicilino amidasa V Microorganismo	pH	Temp.
<u>Alcaligenes</u> sp	8	47	<u>Penicillium chrysogenum</u>	8	20
<u>Alcaligenes faecalis</u>	7.5	37	<u>Cephalosporium</u> sp	8	
<u>E. coli</u> ATCC 9637	7.5	30	<u>Emiceliopsis minima</u> (Stoik IMI 69015)	8	
Células intactas			<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	8	
Enzima soluble	7.8-8	50-52	<u>Fusarium semitectum</u>	7.5	
Enzima insoluble	7.5	37	Células intactas enzimas solubles	8	50
<u>E. coli</u> NCIB 8743A			<u>Pleurotus ostreatus</u>	8	50
Células intactas	8.2	50-55	<u>Penicillium chrysogenum</u> Wis 408	8.5	30
enzima soluble	8.2	37	<u>Fusarium avenaceum</u>	7.5	37
enzima insoluble	7.65		<u>Fusarium conglutinans</u> A Y F 254	8	28
<u>E. coli</u> sp	7.5	30-35	<u>Fusarium moniforme</u> A Y F 255	8	28
<u>E. coli</u> C15 (NCIB9465)	5.5		<u>Penicillium chrysogenum</u> (51 - 20 F 3) enzima	8	28
<u>Proteus rettgeri</u> F D 13424	8		<u>Fusarium semitectum</u> (Bc 805) enzima	7.5	37
<u>Micrococcus roseus</u> ATCC 516	9	35	<u>Rhodotorula glutinis</u>	6.5	20
<u>Bacterium faecalis</u> ATCC 415	7.8				
<u>B megaterium</u> ATCC 14945					
Enzima soluble	8.5	45			
<u>Azotobacter chroococcum</u> Bey C12Pr	7.2	25			

TABLA 2.5 (continuación)

Penicilino amidasa G Microorganismo	pH	Temp.	Penicilino amidasa V Microorganismo	pH	Temp.
<u>Kluyvera citrophila</u> K Y 3641	7.5	35	<u>Streptomyces lavendulae</u> (BRDL 198)	9	28
<u>Nocardia</u> FD 46973	8	28	<u>S. erytraeus</u> JA 4143	7.5	28
<u>Streptomyces ambofaciens</u> (SPSL-15)	7.4	28	<u>S. netropsis</u> 2814		
<u>Neurospora crassa</u>	7.0	37	<u>Streptomyces ambofaciens</u> SPSL-15	7.4	35
<u>Pseudomonas melanogenum</u>	7.5	34	<u>Nocardia globerula</u> K Y 3901	7.4	35
			<u>Erwinia aroideae</u> sp	5.5	28
			<u>Micrococcus ureae</u> K Y 3767	7.4	35

Perfil de Substrato para la Penicilino Amidasa

La penicilino amidasa posee una amplia especificidad para diferentes substratos. En la Tabla 2.6 se muestra una lista de compuestos que son hidrolizado por una enzima de Escherichia coli y sus velocidades relativas, de ella podemos concluir lo siguiente: la enzima hidroliza -- rápidamente a las bencilpenicilinas y lentamente a las alkilpenicilinas. Muestra una mayor afinidad por las fenilacetamidas; pequeños cambios en la parte del fenilacetil de los substratos causa menores velocidades de hidrólisis, así tenemos que para compuestos aromáticos cualquier desviación de la estructura n-fenil se asocia con una baja disponibilidad del compuesto como substrato, en las series alifáticas (ejem. N-fenilglicinas (37)) el grupo acilo que contiene 5 ó 6 átomos de carbonos lineales son los óptimos para la hidrólisis enzimática; esto es, la longitud de cadena de carbonos más próxima a la del grupo fenilacetilo. Se tolera la sustitución -amino a hidroxil pero no carboxil. Aunque el grupo acilo influye en la velocidad de reacción, existe una absoluta especificidad para aminoácidos con configuración L.

Los derivados en el grupo carboxilo 3 de la bencilpenicilina tales como amidas y ésteres son buenos substratos, dando 6-APA-amidasa y 6-APA-ésteres.

Las cefalosporinas con una cadena lateral adecuada resultaron ser buenos substratos; tal es el caso de la cefalotina (ácido, 2-tienilmetilcefalosporánico). Sin embargo, el compuesto natural cefalosporina C (ácido 7-aminonadipil-cefalosporánico) no es substrato.

También se ha observado que la hidroxilación de la bencilpenicilina en posición para, es aún mejor sustrato que la bencipenicilina. La inserción de un átomo de oxígeno entre el carbono α y el benceno de la cadena lateral, o la deleción del grupo α -metileno en la cadena lateral dan sustratos muy pobres (29).

Inmovilización de la Penicilino Amidasa y Reactores Enzimáticos en la Producción del Acido 6-aminopenicilánico

Métodos de inmovilización.

Como se puede observar en la Tabla 2.7 para la producción del ácido 6-aminopenicilánico se han inmovilizado, tanto la enzima penicilino amidasa unida a células así como extraída y purificada de éstas.

Los métodos de inmovilización utilizados para ello son muy variados, principalmente cuando se trata de un extracto de células o de la enzima purificada. Encontramos inmovilización por adsorción, unión covalente, atrapamiento y combinación de unión covalente y atrapamiento, mientras que para la inmovilización de la enzima unida a células solo se realiza por el método de atrapamiento.

Soportes

Los soportes utilizados para la inmovilización de la penicilino amidasa son de naturaleza muy variada, así tenemos polisacáridos como son: sefariosa, dextranas, acetato o triacetato de celulosa, sefadex, DEAE celulosa, alginatos; polímeros sintéticos como: amberlita, poliestireno, po-

TABLA 2.6 PERFIL DE SUBSTRATO PARA LA PENICILINO AMIDASA DE E. coli (2, 4, 29, 33, 35, 37, 39)

Substratos	Velocidad relativa de hidrólisis
Penicilinas	100
(Bencil-)	
p-Hidroxibencil	150
DL- -Hidroxibencil	88
D- -aminobencil	50
-carboxibencil	5
2-Furilmetil	91
2-Tienilmetil	80
Fenoximetil	5.5
-fenoxietil	5
n-propoximetil	40
Isobutoximetil	29
n-Heptil	5
Fenil	5
2,5-Dimetoxifenil	5
Cefalosporinas	
Cefalotina	120
Cefaloridina	104
Cefaloglicina	48
Otros substratos	
Fenilacetamida	140
n-fenilacetilglicina	182
n-fenilacetil-DL-leucina	73
Acido n-fenilacetil-D- -aminofenilacético	0
Acido n-fenilacetil L- -aminofenilacético	139
Acido Bencilpenicilóico	22

liuretanos, poliisocianatos, acrilamida; resinas epóxicas, intercambiadores catiónicos y bentonita.

En general podemos decir que la enzima retiene de un 40 a 70% de su actividad al inmovilizarla por enlace covalente, y de un 50 a 80% cuando se inmoviliza por atrapamiento, esto último tanto para enzima pura como para la unida a células.

Savitskaya, Levitav y Shellenberg hicieron un estudio comparativo de la inmovilización de la enzima proveniente de células de E. coli ATCC 9637, en diferentes soportes con diferentes métodos. Unieron la enzima por unión covalente en soporte de celulosa activados (monoclorotiazil celulosa, 2-(3-amino-4-metoxifenil) sulfonil etil éter de celulosa, - un polímero de poliglicidil metacrilato en un gel de poliacrilamida y en un intercambiador catiónico (KB-2-0.5). Los mejores resultados para la actividad de la penicilino amidasa inmovilizada y la efectividad de la inmovilización se obtiene através de la adsorción de la enzima en intercambiadores catiónicos y en copolímeros de ácido metacrílico y divinilbenzeno, en donde se preserva el 90% de la actividad y se inmoviliza la enzima con respecto al soporte en una relación 3:1, pero la enzima se desorbe -- con una fuerza iónica de 0.1 M. La desorción se evita al combinar este método con un agente bifuncional, aunque la mayor parte de la enzima se inactiva.

Un buen método es el atrapamiento de la enzima en acrilamida con un agente bifuncional, en donde la estabilidad de la enzima depende de la cantidad del reactivo bifuncional. La estabilidad de la enzima aumenta al inmovilizarla por cualesquiera de los métodos antes mencionados.

Con respecto a la inmovilización de la penicilinoamidasas unida a células podemos decir, que la inmovilización siempre se lleva a cabo por el método de atrapamiento y que el soporte más utilizado para este propósito ha sido la acrilamida (5,42,26) dando buenos resultados por su capacidad de atrapamiento y su estabilidad operacional (30 a 42 días).

Klein y Wagner (26,42) hicieron un estudio comparativo de la inmovilización de células de E. coli ATCC 11105 en diferentes soportes, encontrando que la capacidad de atrapamiento es de 70%, 10% para alginatos secos, 10% para metaacrilamida y 60 a 70% para resinas epóxicas, además de que el porcentaje de actividad retenida con respecto a células libres para cada uno de ellos es de 60 para alginatos, 40 para resinas epóxicas c, 28 para resinas epóxicas b, 43 para poliuretano-G, 27 para poliuretano y 47 para metacrilamida. De estos soportes se encontró que las partículas de catalizador de poliuretano y resinas epóxicas no se dañan en un tanque agitado.

Condiciones de Operación y Estabilidad de Reactores Enzimáticos

Las condiciones de operación en la producción del ácido 6-amino penicilánico con penicilino amidasa inmovilizada son de pH de 6.5 a 7.5 en el caso de enzima pura inmovilizada y de pH 8 con el uso de células inmovilizadas, en un rango de temperatura de 30 a 40°C en ambos casos, con concentraciones de penicilina de 10 a 50 g/l y obteniéndose conversiones del 80 al 100% durante 1 a 5 meses ó 15 a 30 corridas en columna con volúmenes de 0.02 a 1000 l. Los principales problemas que se presentan en el manejo de

los reactores son, el control del pH, ya que durante la hidrólisis de la penicilina el pH disminuye por la producción de los ácidos feniácético y 6-aminopenicilánico además que la adición de altas concentraciones de -- álcali disminuye la estabilidad de la enzima (34,36). Otro problema importante es la inhibición que presentan tanto el sustrato como los productos de la reacción enzimática.

Inmovilización de la Penicilino Amidasa Unida a Células en Colágena y Carragenina

En el presente trabajo se presenta el estudio realizado de la inmovilización de la penicilino amidasa unida a células completas inmovilizadas en colágena y carragenina como soportes.

Inmovilización en Colágena

La colágena es una proteína biológica que cumple con algunas características propias para su uso como soporte. Esta constituida principalmente por prolina e hidroxiprolina dándole una naturaleza hidrofílica, lo cual da lugar a una estructura abierta y fibrosa que contiene un gran número de sitios de unión y estabilización, las interacciones entre la colágena y enzimas o elementos atrapados en ella son de tipo iónico, -- uniones de hidrógeno y fuerzas de Vander Waals, su forma membranosa facilita el diseño de un reactor. A un pH neutral la colágena absorbe mas -- que su peso en agua.

La inmovilización de células de E. coli con actividad enzimática de penicilino amidasa se llevó a cabo por el método de acomplejamiento molecular publicado por Vieth y Venkatasubramanian (56). En este pro

cedimiento, las células se añaden directamente a una dispersión acuosa de colágena. En la dispersión, las macromoléculas de colágena existen en su estado microfibrilar nativo y la mejor dispersión molecular se logra en rangos de pH de 2.5 a 4.5 y de 10 a 11.5. La relación colágena-células (peso seco) es de uno a cinco y la estabilidad de almacenamiento de la membrana seca es de más de un año en frío, y de varios meses a temperatura ambiente.

Inmovilización de Penicilino Amidasa Unida a Células de *E. coli* en carragenina

La carragenina pertenece al grupo de los sulfato polisacáridos que se encuentra en las algas marinas de la clase Rhodophyceae como principal componente de la pared celular. La carragenina es una mezcla de un mínimo de dos fracciones que al calentarse en agua pueden ser separadas en una solución de KCl 0.25 M, estas fracciones se denominan carragenina lambda y kappa. La fracción lambda es viscosa y no gelifica (no es sensible al potasio), mientras que la fracción kappa gelifica en presencia de otros iones alcalino o alcalinotérreos a excepción de Litio y Sodio. Todas las carrageninas están compuestas de unidades de galactosa y 3-6,anhidrogalactosa unidas por uniones glucosídicas alfa (1-3) y beta (1-4). Los grupos sulfatos en la fracción kappa se encuentran principalmente en el carbono cuatro, mientras que la fracción lambda el sulfato puede estar en el carbono dos ó seis.

La función gelificante del potasio en la carragenina kappa parece residir en el ester sulfato localizado en el carbono cuatro y que al gelificar se conforma como una doble hélice estabilizando proteínas

como la caseína en la leche (48). Estas características la hacen adecuada para la inmovilización en ella de enzimas o células, además de su disponibilidad comercial por su amplio uso en la industria alimenticia.

El método utilizado para la inmovilización de células de E. coli con actividad de penicilino amidasa, en carragenina es el método informado por Tosa y colaboradores (53), y consiste en suspender la carragenina en solución salina fisiológica a 25-50°C, y añadir las células enfriando a 10°C en una solución 0.3 M de KCl, la actividad retenida para varias enzimas inmovilizadas en carragenina oscila entre 50 y 70% y sus vidas medias de 60 a 686 días.

Curtido en Glutaraldehído

Tanto en la inmovilización de células de E. coli con actividad enzimática de penicilino amidasa en colágena como en carragenina se dá un tratamiento posterior de curtido con glutaraldehído (inmovilización en colágena) y glutaraldehído más etilen amina en el caso de inmovilización en carragenina. Este tratamiento tiene por objeto aumentar la estabilidad del catalizador ya que el grupo aldehído reacciona con los grupos amino de la colágena, de la etilen amina y grupos amino de las células formando puentes intermoleculares.

La efectividad del tratamiento con glutaraldehído depende de su concentración, pH, temperatura y tiempo de contacto con el catalizador (soporte células) (56).

TABLA 2.7 INMOVILIZACION DE LA PENICILINA AMIDASA Y REACTORES ENZIMATICOS EN LA PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINO PENICILINICO

Fuente enzimática	Método de inmovilización	% de actividad retenida en la inmovilización y estabilidad	Rendimientos en reactores	Observaciones	Ficha Bibliográfica
Células de <u>E. coli</u> 9637	Atrapamiento en gel de poliacrilamida	Retiene el 93.6% de la actividad vida media de una columna con 18.6 g de penicilina con 42 días a 30°C y 17 días a 40°C.	Rendimientos del 85.90% con 20 ml. y 5.6 g de penicilina G-K	El pH óptimo del sistema fué de 8.5, y temperatura de 40°C (al igual que las células libres) aunque aumenta la estabilidad a temperaturas en el sistema inmovilizado.	5
Células de <u>E. coli</u> 9637, 11105	Atrapamiento en gel de poliacrilamida		90% con 500 ml de penicilina G-K al 1% P/V para <u>E. coli</u> 9637 y 92% en 24 horas con 500 ml. de penicilina G-K al 2% (P/V para <u>E. coli</u> 11105		49
Células de <u>E. coli</u>	Atrapamiento en resinas epoxidas	La reacción es estable por 30 días con 0.1% de penicilina G, 37°C, pH 7.8 c/24 horas.			42

TABLA 2.7 (continuación)

Fuente enzimática	Método de inmovilización	% de actividad retenida en la inmovilización y estabilidad	Rendimientos en reactores	Observaciones	Ficha bibliográfica
Células de <u>E. coli</u> 9637	Agregación con polietilimina, glutaraldehído y atrapamiento	Retiene el 85% de actividad		Sistema continuo	51
Enzima de <u>E. coli</u>	Unión covalente en XAD-7	Vida media de 85,431 y 655 hrs. a 37, 21 y 10°C respectivamente		La adición de so- sa y la alta moli- ridad del buffer disminuyen la es- tabilidad del cata- lizador	36
Enzima de <u>E. coli</u>	Enlace covalente en un copolímero de metacrilato	Después de 2 meses hay 100% de actividad		Se inmovilizan 100 mg. de enzima por gramo de so- porte	41
Enzima de <u>E. coli</u>	Adsorción en intercambiadores catiónicos (KB y un copolímero de ácido metacrílico)	Retiene 90% de la actividad		La enzima se desorbe con una fuerza iónica de 0.1 M	33
Enzima de <u>E. coli</u>	Unión covalente en poliestireno			La enzima es modificada con núcleos aromáticos	33

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 2.7 (continuación)

Fuente enzimática	Método de inmovilización	% de actividad retenida en la inmovilización y estabilidad	Rendimientos en reactores	Observaciones	Ficha bibliográfica
<u>E. coli</u>	Atrapamiento en un gel de policrilamida	Retiene del 50-60% de actividad, mantiene el 70% de su actividad por 32 días a 37°C pH 7.5. En condiciones de reacción no cambia su actividad en 8 reacciones	96% en 6 horas, con 15 g. de penicilina en 75 ml.	La máxima actividad se obtiene en buffer de fosfatos pH 6.5 a 7.6. La enzima se modificó con anhídrido	16
<u>E. coli</u>	Atrapamiento en triacetato de celulosa con cloruro de metilo		Hasta el 97% con 20 l. de penicilina G-K al 6% P/V		40
<u>E. coli</u>	Unión covalente en DEXA-celulosa con 2-amino-4,6-dicloro-5-triacina	Retiene del 45-81% de su actividad		pH óptimo del sistema 7.5	38
<u>E. coli</u>	Atrapamiento en fibras de acetato de celulosa	No pierde actividad catalítica en 6 meses a 4°C, y retiene el 80% de la actividad inicial por cinco meses a 37°C.			34
<u>Bacillus megaterium</u>	Adsorción en bentonita		100% conversión en 15 hrs. 300 Kg de penicilina G-K en 1133.4 lt.		50

TABLA 2.7 (continuación)

Fuente enzimática	Método de inmovilización	% de actividad retenida en la inmovilización y estabilidad	Rendimientos en reactores	Observaciones	Ficha bibliográfica
Enzima de <u>E. coli</u>	Unión covalente a dextrana o almidón a 0-50°C pH 8-13				44
Enzima de <u>E. coli</u>	Unión covalente en Ficoll sefarosa - 4 B, dextran T 200			El acoplamiento se hace por cadenas de alquilaminas en presencia de glutaraldehído	45
Enzima de <u>E. coli</u>	Combinación de -- atrapamiento en -- gel y enlace covalente			La enzima tiene su estabilidad máxima a pH 5.6	46
Enzima de <u>E. coli</u>	Enlace covalente en Sefadex G-200 activado con bromuro o cloruro de cianógeno		Rendimiento del 96% en 700 ml. con 21 g de bencil penicilina en 3 hrs.	Condiciones de cooperación a 35°C pH 6.5 de 7	7
Enzima de <u>E. coli</u>	Enlace covalente en sefarosa activada con divinilsulfona	Retiene el 41% de actividad		Se inmovilizan 2 grs. de enzima por gramo de polímero	47

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo de este trabajo es el de desarrollar una tecnología para la producción del ácido 6-amino penicilánico (6-APA) por hidrólisis enzimática de la penicilina G, con la enzima Penicilino-Amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas. Desde escala de laboratorio, hasta llegar a un nivel de planta piloto, que nos puede brindar información --- para el subsecuente escalamiento a nivel de producción del 6-APA.

Objetivos Parciales

Para el logro del planteamiento anterior se subdividió el trabajo en áreas especiales con los siguientes objetivos.

1. Area de Microbiología. El objetivo de esta área es el de optimizar - las condiciones de producción de la Penicilino-Amidasa en células de E. coli a nivel laboratorio y su posterior escalamiento a planta piloto.
2. Area de Ingeniería Enzimática. En esta área se cumplirán dos objetivos: a) optimización de la inmovilización de la Penicilino-Amidasa unida a células de E. coli a nivel de laboratorio y su posterior escalamiento a planta piloto; b) Optimización de las condiciones de operación de un reactor enzimático para la producción del ácido 6-amino-penicilánico a partir de la penicilina G, a nivel laboratorio y su posterior escalamiento a planta piloto.

METODOLOGIA

METODOLOGIA GENERAL



Métodos para Medir Actividad Enzimática

Reactivos

Buffer de fosfatos	0.03 M
Fosfato de potasio monobásico	0.57 g
Fosfato de potasio dibásico	4.5 g
Volumen	1 lt.
Ajustar el pH a 8.0 con KOH concentrada	
P-dimetil-amino-benzaldehido	

Pesar 1 g de p-dimetil-amino-benzaldehido (Baker y disolver en 50 ml. de alcohol etílico al 60% adicionar 0.5 ml. de H_2SO_4 concentrado y aforar a 100 ml. con alcohol etílico a 60% (p/v).

Condiciones

Temperatura 37°C, 40°C - 45°C (en el texto se especifica la temperatura)

pH inicial de la mezcla de reacción	8.0
Molaridad (buffer de fosfato)	0.03
Concentración de penicilina-G	25 mM
Tiempo de reacción	20 minutos
Longitud de onda para leer	415 nm.

1) Actividad enzimática de Penicilino-amidasa en células de E. coli

- a) Se toman 10 ml. de medio de cultivo, con células de E. coli - crecidas hasta un mínimo de 100 unidades Klett.
- b) Se centrifugan a 3,000 rpm durante 15 minutos.
- c) Se elimina el sobrenadante
- d) El precipitado se resuspende en 1 ml. de buffer de fosfatos. Se agregan 0.1 ml. de penicilina para tener una concentración final de 25 mM.

- e) Se agita, y se deja durante 30 minutos a la temperatura fijada (37, 40°C o 45°C).
- f) Se toman 0.2 ml. de la mezcla de reacción y se agregan a -- 4.8 ml. de alcohol etílico absoluto.
- g) Se centrifuga durante 10 minutos a 3,000 rpm
- h) Decantar y al sobrenadante agregar 2.5 ml. del reactivo de -- p-dimetil-amino-benzaldehído.
- i) Agitar y dejar reposar durante 10 minutos y leer a una densidad óptica de 415 nm. contra blanco de reactivos.

2) Control de células

- a) Se preparó un paquete celular en la misma forma que en el inciso anterior.
- b) Se añaden 3 gotas de tolueno
- c) Se hierve durante 10 minutos.
- d) Se resuspende en 1 ml. de buffer de fosfatos se añade 0.1 ml. para tener una concentración final de 25 mM de penicilina-G.
- e) Se siguen los mismos pasos que en el inciso (e).

3) Blanco para ajustar a cero de D.O.

- a) Se toma 0.2 ml. de buffer de fosfatos y agregar 4.8 ml. de - alcohol etílico absoluto.
- b) Si hay turbidez centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos.
- c) Decantar y al sobrenadante se le añaden 2.5 ml. de reactivo p-dimetil-amino-benzaldehído.
- d) Reposar durante 10 minutos y ajustar a cero de D.O.

Determinación de Proteína

Reactivos

Solución A = 2% Na_2CO_3 en NaOH 0.1 N

Solución B = $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5%

Solución C = Tartrato de sodio y potasio 1% ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)

Mezcla D = Solución A + solución B 1:1

Mezcla E = Tomar 1 ml. de mezcla D y agregarle 50 ml. de la solución A (decantar después de 24 hrs.)

Reactivo Foli F = Diluir del reactivo Folin (Sigma) con agua destilada 1:1

Estandar = 50, 100, 150 y 200 ug/ml de albúmina bovina.

1) Procedimiento

- a) Tomar 0.01 - 0.05 ml. de la suspensión de células para la -- mezcla de reacción
- b) Aforar ml. con H₂O destilada
- c) Añadir 5 ml. del reactivo E
- d) Reposar durante 10 minutos
- e) Añadir 0.5 ml. del reactivo F
- f) Reposar durante 30 minutos y leer a 590 nm contra un blanco de reactivo.

*El blanco de reactivo se procesa como las muestras, pero se coloca 1 ml. de H₂O inicial

- g) Estandar de albúmina se procesa como las muestras

Crecimiento y Cosecha de E. coli con Penicilina-Amidasa

1. El crecimiento de E. coli dependiendo de la cantidad que se necesitara se realizaba en matraces Erlenmeyer de 1 a 6 litros con la tercera parte de su volumen, o en un fermentador de 14 litros marca New Brunswick Scientific Co., modelo - ml9 - 1410.

2. Parámetros	Temperatura	29°C
	Tiempo	24 - 48 horas
	pH inicial	7 - 7.4
	Aereación	1 V V M
	Agitación en el caso de matraces	120 rpm
	Agitación para el -- prefermentador	300 rpm
	Concentración de F.A.	0.2%

3. En general el medio utilizado fue el medio luria (ver Apéndice de medio de cultivo.
4. Esterilización del medio. Este se llevó a cabo en una autoclave de -- Amsco de México. A 15 lb. de presión, 21°C, y por 20 - 30 minutos.
5. Inóculo. El inóculo correspondía al 10% en volumen, de un cultivo crecido durante una noche, en medio luria con 0.2% de ácido fenil-acético a 29°C.
6. La cosecha de las células se hizo en una centrifuga Sorval Rc-refrigerada en un rotor GSA con 6 compartimientos para botellas de 20 ml., a 12,000 rpm durante 20 minutos. Se eliminaba el sobrenadante colectándose el paquete celular y almacenándose a 4°C en el refrigerador.

METODOLOGIA EN EL AREA DE MICROBIOLOGIA

Método para Identificar la Presencia de Plásmidos en Cepas de E. coli

1. Materiales y reactivos

Medio luria

Buffer TE

Tris base 0.1 M, EDTA, 1 mM, ajustar a pH 8 con ácido acético y glacial y en agua desionizada.

NaOH

1 N

SDS al 10%

Solución neutralizante

(Tris NCl 1.8 M, tris base 0.2 M

Buffer para disolver
agarosa

Trisma base 50 mM
Acetato de sodio 20 mM
EDTA (sal disódica) 2 mM
NaCl 18 mM

Ajustar a pH de 8.05 con ácido acético glacial

Agarosa al 0.8% (en el buffer anterior)

Baño de temperatura constante (New Bruswick Scientific
Modelo G 76)

Colorímetro Spectronic 20

2. Procedimiento

- a) Inocular en 50 ml. de medio luria en una relación 1:20 de un cultivo de E. coli crecida durante toda la noche a 37°C
- b) Crecer hasta 0.6 unidades de D.O. (550 nm).
- c) Centrifugar y lavar con buffer TE
- d) Resuspender en 0.25 ul. de buffer TE
- e) Añadir 50 ul de NaOH, y reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente
- f) Añadir 50 ul de una solución de SDS y reposar durante 10 minutos
- g) Añadir 50 ul de una solución neutralizante
- h) Poner a 40°C -50°C durante 3-5 hrs.
- i) Congelar a -20°C. durante toda la noche (o el tiempo que sea necesario)
- j) Separar la fase acuosa y utilizar 50 ul con unas gotas de azul - de bromo fenol en glicerol

3. Electroforesis

- a) La electroforesis se realizó en agarosa al 8% en el buffer descrito en Materiales y Reactivos
- b) La agarosa se disuelve en baño maría y se deja ebulir durante 10 minutos
- c) Se llenan tubos de vidrio con 1 cm de diámetro y 10 cm de largo, y se espera durante media hora para que gelifique
- d) Se colocan gasas en la parte inferior de los tubos para evitar que el gel se salga
- e) Los tubos se colocan en la cámara de electroforesis y se colocan 50 ul de muestra con una jeringa
- f) Se llena la cámara con buffer TE
- g) Se colocan las salidas de la fuente de poder, el polo positivo abajo y el negativo arriba
- h) Se corre la electroforesis a 40 Volts. constantes hasta que se observa la salida del colorante en la parte inferior
- i) Se sacan los geles de los tubos y se colocan en H₂O destilada con bromuro de etidio 20×10^{-3} ug/ml
- j) A las 24 hrs. se observa bajo una lámpara de luz ultravioleta y si existe plásmido debe observarse más de una banda.

Método para Curar Plásmidos con Bromuro de Etidio

1. Materiales y Reactivos

- Cepa E. coli: ATCC 11105
Medio luria (líquido y en cajas)
Bromuro de Etidio (Sigma) POM g/ml
Cuarto a temperatura constante de 37°, con agitación

2. Procedimiento

- a) De un cultivo de toda noche, diluir hasta tener $10^2 - 10^3$ células/ml.
- b) Tener 5 ml. de medio luria con $10^2 - 10^3$ células/ml. y añadir 80 mg/ml. de bromuro de etidio
- c) Inocular durante 18 hrs. con agitación 37°C

- d) Estriar en medio luria sólido
- e) Parchar colinas aisladas en medio selectivo (luria con kanamicina, luria estreptomycinina, luria + 0.2% de FA (P/V) y luria solo)

* Control. Se crece la misma cepa en ausencia de bromuro de etidio, y esta debe de crecer mejor que la cepa crecida en bromuro de etidio.

- 3. Aquellas cepas que no crezcan en luria, Kanamicina y Estreptomycinina y crezcan en luria, serán las cepas que han perdido el plásmido.

Transformación de Células de E. coli RRI con DNA del plásmido de la cepa E. coli 11105

1. Materiales y Reactivos

NaCl 10 mM frío

CaCl₂ 30 mM frío

Medio luria

Medios selectivos. Merio luria, medio luria con kanamicina, medio mínimo con FA como fuente de carbono NH₄Cl como fuente de nitrógeno, medio mínimo con kanamicina medio luria con -- 0.2% de ácido fenil-acético

Cuarto de temperatura constante de 37°C

Centrífuga Sorval (rotor SS4 con 6 compartimientos para tubos de 30 ml)

2. Procedimiento

- a) 30 ml. de células RRI con una concentración de 4×10^8 células/ml 25 - 30 unidades Klet1
- b) Centrífugar durante 3 minutos a 1,000 rpm
- c) Resuspender en 15 ml. de NaCl frío
- d) Centrífugar durante 3 minutos 1,000 rpm
- e) Dejar en hielo 30 minutos

- f) Centrifugar durante 5 minutos a 5,000 rpm
- g) Resuspender en 3 ml. de CaCl_2 30 mM frío
- h) Poner 0.2 ml. de estas células en el tubo con DNA
- i) Se dejan en contacto las células con el DNA durante 60 minutos
- j) Se calienta a 42°C por 80 segundos
- k) Se deja en hielo por 10 minutos
- l) Se agregan 3 ml. de medio luria
- m) Se incuban 2 - 3 hrs. a 37°C
- n) Se plaquea en medio selectivo (0.1 - 0.2 ml.)

Preparación del DNA

Al DNA ligado que debe estar en un volumen final de 90 y dializado por lo menos 60 minutos se le agregan 10 de CaCl_2 300 mM fresco y se pone en el tubo para transformar.

Nota: Llevar a un volumen de 90 ul con Tris 10 mM EDTA 1 mM pH = 8

Después de dializar se debe centrifugar el DNA para quitar posibles células.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGIA EN EL AREA DE INGENIERIA ENZIMATICA

Inmovilización en Colágena (56)

1. Materiales y Reactivos

Colágena de tendón de vaca
Glutaraldehido (Baker)
HCl (Baker)
Células de E. coli ATCC 9637 o 11105

2. Procedimiento para la Inmovilización en Colágena

- a) Mezclar 0.75 g de colágena en 100 ml. de H₂O destilada a pH de 3.5 a 4°C
- b) Agitar durante 45 minutos
- c) Reposar durante 5 minutos
- d) Realizar el paso b y c por tres veces
- e) Añadir 0.375 g. peso seco de células
- f) Agitar durante 1 minuto
- g) Dejar reposar durante 5 minutos
- h) Repetir los pasos f y g hasta tener una suspensión homogénea
- i) Vaciar y esparcir la mezcla en una superficie lisa
- j) Dejar secar a 40°C

3. Procedimiento para Curtir Colágena con Células

- a) Tomar la pieza de colágena con células que se desea curtir, e introducirla en glutaraldehido al 2% durante 30 minutos
- b) Lavar con agua destilada

Inmovilización en Carragenina (53)

1. Materiales y Reactivos

Células de E. coli ATCC 9637 o 11105
Carragenina K (Proveedor Francés)
Solución salina al 0.9%

KCl	0.3 M
Buffer de fosfatos	0.5 M
Etilen amino	
Glutaraldehido (Baker)	

2. Procedimiento para Inmovilización de Células de E. coli en Carragenina

- Se disuelven 3.4 g. de Carragenina (K) en 68 ml. de solución salina, a 50°C
- Se disuelven células microbianas en 32 ml. de solución salina
- Se mezclan las células con la carragenina a 50°C
- Se vierte la mezcla sobre una superficie fina.
- Se deja enfriar alrededor de 10°C por 30 minutos
- Se sumerge en cloruro de potasio 0.3 M a 10 - 4°C

3. Procedimiento para Curtir Carragenina con Células de E. coli

- Se toman 100 g peso húmedo con catalizador (carragenina-células)
- Se suspenden en 500 ml. de una mezcla de buffer de fosfatos 0.5 M y KCl 0.3 M y Etilen amina .085 M a 4°C agitándose por 5 minutos.
- Se añade glutaraldehido para tener una concentración final de 0.2% P/V.
- Se deja agitar durante 30 minutos
- Se lava con KCl 0.3 M

Método para Medir Actividad Enzimática en Células de E. coli con Penicilina amidasa inmovilizados en colágena.

Los parámetros son los mismos que las mencionadas en Metodología General.

- Pesar 0.05 - 0.5 g de colágena y resuspender en 15 ml. de buffer de fosfatos en matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- Agitar durante 30 minutos

- c) Tomar 0.2 ml. de muestra y procesarla como en el número 1, inciso f en la Sección de Metodología General

Método para Medir Actividad Enzimática en Células de E. coli con Penicilino-Amidasa inmovilizadas en Carragenina

Los parámetros son los mismos que los mencionados en Metodología General.

- a) Pesar 0.4 - 0.7 g. peso húmedo de carragenina y resuspender en -- 15 ml. de buffer de fosfato, en matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- b) Agitar durante 30 minutos
- c) Tomar 0.2 ml. de muestra y procesar como en el número 1, inciso f en la Sección de Metodología General.

Método para Medir Actividad Enzimática en Reactores Empacados con Colágena y Carragenina con Células Inmovilizadas de E. coli.

- a) El método que se utilizó fue el método de p-dimetil-amino-benzaldehído, ya descrito en Metodología General, así como los parámetros incluidos en esta sección.
- b) En general se utilizaron tanto para reactores con colágena, como para carragenina Columnas Batch, con recirculación del sustrato en la columna de un recipiente en donde se controlaba el pH y la temperatura y a donde llegaba la mezcla de reacción que salía de la Columna. De este recipiente era en donde se tomaban los 0.2 ml de muestra, que se procesaban en la forma descrita en el inciso a.
- c) También se utilizaron tanques agitados batch en estos casos la muestra se tomaba directamente del reactor (0.2 ml. de muestra).

Operación de Reactores Enzimáticos

1. En general el reactor tipo que se maneja tanto para células inmovilizadas en colágena como en carragenina fue el que se esquematiza en la figura 3.1.

Como se observa el control de pH y temperatura no se encuentra directamente en el reactor en donde se lleva a cabo la reacción, sino en un recipiente adjunto que está comunicado a la salida y entrada del reactor. Para mantener la temperatura en estos reactores se cubrían con fibra de vidrio y papel aluminio.

2. Mantenimiento de los Reactores

- a) Los reactores empacados con colágena se lavaron con buffer de fosfatos, una vez que se corría, la reacción. En los tiempos muertos, los reactores se dejaban a temperatura ambiente, y las piezas de membrana esparcidas en redes a temperatura ambiente.
- b) Los reactores empacados con carragenina se lavaron con KCl 0.3 M - después de correr la reacción, durante los tiempos muertos éstos se quedaban a temperatura ambiente con KCl 0.3/M.
- c) Para el uso de los reactores se utilizaron bombas peristálticas -- Cole Palmer modelo E-650.

Empaque de Reactores Enzimáticos con Células de E. coli Inmovilizadas en Colágena y en Carragenina

1. La forma de empacar columnas con colágena con células inmovilizadas -- fue de dos tipos:

La primera que consistió en enrollar la membrana completa de colágena curtida sobre una red de plástico, y de esta forma se introducía a las columnas.

La segunda que era cortando la membrana de colágena en cuadros de 1 - 2 cm. por lado y rellenar la columna con ello.

2. Forma de empacar columnas con carragenina con células inmovilizadas de E. coli

Una vez formadas las camas de carragenina con células, éstas se cortaron en cuadros de aproximadamente 0.5 cm x .5 cm x .5 cm, se curtió -- y se lavó, y esta era la forma en la que se introdujeron a las columnas.

METODOLOGIA EN PLANTA PILOTO

3. Cuando se operaron tanques batch agitados en colágena en carragenina, se utilizaron cuadros de soporte curtido para empacarlas

Producción de Células de E. coli (ATCC 9637) con Actividad Enzimática de Penicilino-Amidasa en Planta Piloto

1. Se llevaron a cabo las fermentaciones a nivel de planta piloto para las cuales se utilizó el siguiente medio de cultivo:

NN + 0.2% (P/V) de ácido fenilacético y 0.8 g/l de cloruro de amonio. Para las dos fermentaciones se hizo una prueba de esterilidad en los tanques que consistió en cargar los tanques con un medio rico, esterilizar y dejarla durante toda la noche para ver si no había contaminación, en el tanque de 3,000 l. se detectó un escape de aire en una de las tuberías, arreglándose y quedando listo el tanque.

2. Primera Fermentación

Capacidad del tanque 250 l.
Dimensiones del tanque (58 cm de diámetro y 100 cm. de altura)

Se comenzó la limpieza del fermentador a las 8 a.m. a las 9.30 se carga el tanque, se ajustó pH a 7.5 antes de esterilizar, y a las 10:00 a.m. se comenzó a esterilizar.

Se inoculó a las 12:20, con 6.5* l., con un inóculo reciente, crecido en el mismo medio de cultivo.

- a) Condiciones de la Fermentación:

Volumen de trabajo	160 l.
Temperatura	27 - 29°C (control manual)
Presión	0.5 kg/cm ²
Aire	IVVM
Agitación	280 rpm
pH inicial (no hubo control de pH)	7.4

- b) Supervisión de la Fermentación

La fermentación duró 24 horas, durante el proceso se rectificó la temperatura cada 2 hrs. y se tomo una muestra cada 2 hrs. a las que se les determinó pH, D.O. (a 550 nm), proteína y actividad específica. Cuando hubo necesidad de añadir antiespumante se utilizaron silicones al 50%.



3. Segunda Fermentación

Capacidad del Tanque 5,000 l.

La limpieza del tanque comenzó a las 7:40 a las 8:00 a.m. se empezó a cargar, y se ajustó pH a 7.6 con KOH concentrada antes de esterilizar a las 10:00 a.m. se empezó a esterilizar el tanque y a las 10:20 se inoculó. El inóculo fué de 21 litros de los cuales 6 litros eran recién cosechados 15 litros refrigerados.

a) Condiciones de la fermentación

Volumen de trabajo	3,000 l.
Temperatura	27 - 29°C (control manual)
Presión	0.7 kg/cm ²
Aire	1. VVM
Agitación	112 rpm
pH inicial	7.5
(no hubo control de pH)	

b) Supervisión de la Fermentación

La fermentación duró 168 hrs., y a las 72 hrs. de esta se realizó el fermentador con una solución estéril de 100 l. con 1.3 kg. de NH₄Cl y 6.1 de fenil acetato de sodio al 64%.

Se tomaron muestras cada 2 hrs. a las que se les determinó pH, -- D.O. (55 nm), proteína y actividad enzimática específica.

Inmovilización de Células de E. coli (ATCC 9637) con actividad Enzimática de Penicilino-Amidasa a Nivel de Planta Piloto

La cantidad de catalizador fabricado fué de 1.5 kg. (carragenina - células).

La inmovilización se llevó a cabo en carragenina por el método ya descrito en esta misma sección, para ello se utilizaron vasos de 1,000 ml. con 500 ml. de solución fisiológica de NaCl, 17 g. de carragenina y 100 g. de células (peso húmedo), una vez homogenizada la carragenina a 50°C por 10 - 20 minutos. La extensión del soporte se llevó a cabo sobre mica de plástico y placas de rayos X ya usados. El curtido del soporte se hizo en la forma ya descrita en esta sección, en vasos de 1 l. con 260 g. de catalizador sin curtir y 500 ml. de la solución para curtir.

Reactor Enzimático con Células de E. coli Inmovilizadas en Carragenina, a Nivel de Planta Piloto.

1. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en una columna Farmacia con 105 cm. de altura y 30 cm. de diámetro considerando la chaqueta, y el sistema utilizado se esquematiza en la figura 3.2.
2. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:
 - a) Volumen 20 l (7 l. en el recipiente exterior y 13 l. en la columna)
 - b) Flujo, en las 2 primeras corridas fué variable y osciló entre 2.33 ml/seg. a 50 ml/seg., constantes. El flujo fué de abajo hacia arriba, con una bomba Randolph modelo 500 con H P de potencia.
 - c) Temperatura: 38 - 40°C controlada por un termomix que estaba recirculando el agua a través de la chaqueta que cubría la columna.
 - d) pH, 7.6 - 8.2 controlado por un potenciómetro
 - e) Concentración de sustrato. 25 - 50 g/l de penicilina-G potásica
 - f) Cantidad de catalizador, 1.3 kg.
3. Manejo de la Columna

La columna se empacó con el catalizador añadiendo primero 5 litros de KCl 0.3 M. Una vez puesto los 1.3 kg del catalizador se añadieron 8 litros de KCl 0.3 M, quedando aproximadamente 5 litros en la columna de espacio muerto. Una vez empacada la columna se procedió a lavar con aproximadamente 60 litros de KCl por 6 hrs. La penicilina se disolvió en buffer de fosfato de potasio pH 8.0, 0.03 M, el pH se controló con KOH, 5 N. En cada corrida, se tomaron muestras cada hora, haciéndose determinaciones de 6-APA por el método del p-dimetil-amino-benzaldehído ya antes mencionado.

La reacción se paró cuando no hubo más conversión de penicilina a 6-APA. Se lavó con 15 - 20 litros de KCl 0.3 M y se dejó a temperatura ambiente con KCl 0.3 M.

RESULTADOS EN EL AREA DE MICROBIOLOGIA

Medios de Cultivo en la Producción de la Penicilino Amidasa

Como se mencionó en la sección de antecedentes (Producción de la Penicilino Amidasa), la composición de los medios de cultivo para la producción de la penicilino amidasa es muy diversa, siendo ésta desde la utilización de medios mínimos hasta medios ricos. En el laboratorio se probaron algunos medios de cultivo de uso común para el cultivo de E. coli, con el objeto de determinar las condiciones reproducibles para la producción de la penicilino amidasa.

Así se creció una cepa de E. coli 9637 de la colección de la ATCC en medios mínimos (M9, mínimo (MM) y ricos (luria (Lb) y medio glutámico (Ver Apéndice para la composición de medios). Se midió su crecimiento a través del tiempo y se determinó la actividad enzimática de las células por el método descrito en metodología general. Tabla I.

Como se puede observar el crecimiento más rápido ocurre en el medio luria, y las actividades mayores se obtienen en los medios luria y MM. Por lo que se procedió a crecer la cepa de E. coli en los medios luria y mínimo con 0.2% P/V de ácido fenil acético como posible inductor a 37°C.

Se observa que las cepas crecidas en medio mínimo (MM) solo crecieron 35 unidades en 20 horas y que la actividad específica fue de 0.23 μM 6A PA/mg de proteína en 2 horas, mientras que en el medio luria las cepas habían alcanzado a crecer 100 unidades Klett en 6.5 hrs. mostrando una actividad enzimática de 0.91 μM 6A PA/mg de proteína en 2 hrs. escogiéndose así el medio luria para trabajar en el laboratorio y producir la penicilino amidasa en cepas de E. coli.

Acido Fenilacético como Inductor de la Penicilino-Amidasa

Es un hecho ya conocido que el ácido fenilacético (AFA) induce la síntesis de Penicilino Amidasa (1,3,4,6).

Con objeto de comprobar ésta observación, se realizó el siguiente experimento: células de la cepa de E. coli 9637 se crecieron en un medio luria a 28°C con concentraciones de AFA hasta del 0.35%. Pudo observarse (Fig. 4.1) que la concentración óptima de AFA para la producción de la enzima fué de 0.2% y que dicho incremento fue de aproximadamente de 5 veces más del nivel basal (Sin AFA).

Síntesis de la Penicilino Amidasa por Células de E. coli Crecidas a Diferentes Temperaturas

Otro hecho reportado en la literatura es que la síntesis de Penicilino Amidasa es óptima cuando los cultivos bacterianos se incuban alrededor de 30°C (Tabla tres antecedentes) en consecuencia se determinó la actividad enzimática de E. coli 9637 a diferentes temperaturas en medio luria con 0.2% de AFA como inductor. Logró observarse, que la mayor actividad de Penicilino Amidasa se presentó en aquellos cultivos que habían sido incubados a 28°C (Fig. 4.2).

Efecto de la Glucosa en la Producción de la Penicilino Amidasa

Se ha observado (11,24), que la glucosa y los polialcoholes en general reprimen la producción de la penicilino amidasa en cepas de E. coli. Este hecho se verificó en el laboratorio creciendo células de E. coli 9637 en un medio rico con diferentes concentraciones de glucosa, 0.2% de ácido -

ESTA TESIS NO SALA
DE LA BIBLIOTECA

fenilacético a 29°C y luego midiendo su actividad específica (Tabla 4.2). - Observándose que 2 g/l. de glucosa son suficientes para bajar la producción de la penicilino amidasa en las células de E. coli.

Selección de una Cepa Productora de Penicilino Amidasa

Una vez optimizadas las condiciones de producción de la enzima, en células de E. coli (medio luria con 0.2% de ácido fenilacético, cultivado a 28°C), se procedió a escoger la cepa que produjese mayor cantidad de enzima, de entre las cepas de E. coli existentes en el laboratorio (9637, - 9637B, 11105). Tabla 4.3), mostrando mayor actividad enzimática la cepa de E. coli ATCC 11105, por lo que se escogió para proseguir con la investigación.

Crecimiento de E. coli y Producción de la Penicilino Amidasa en Medio Luria

Para saber como se relacionaba la producción de la Penicilino - Amidasa con el crecimiento de E. coli, se crecieron cepas de E. coli 11105 en un medio luria con 2% p/v de ácido fenilacético a 29°C, en matraces --- (Fig. 4.3).

Se midió la densidad óptica del cultivo y la actividad específica a través del tiempo.

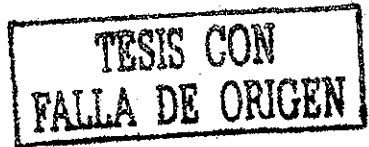
En el experimento se observa que la curva de crecimiento del microorganismo es diauxica y que no existe producción de la enzima en las primeras 2 horas que corresponde a la fase lag y exponencial de la curva, que la producción de la enzima empieza en la fase exponencial y que ésta se ve aumentada en la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

Efecto del cambio de la Temperatura, adición de Inductor y Aereación en la Producción de la Penicilino-Amidasa y en el Crecimiento de E. coli

Como se concluyó de los experimentos anteriores y se muestra en la literatura (23), la penicilino amidasa se produce en las fases exponencial y estacionaria en el crecimiento de E. coli. Esto sucede aproximadamente después de las 4 horas de crecimiento. Este comportamiento se observa en la producción de metabolitos secundarios como es el caso de la penicilina, por lo que en la producción de ésta, se deja crecer el micelio del Penicillium durante su fase lag y logarítmica, para luego hacer un cambio de temperatura a durante la fase estacionaria, óptima para la producción de la penicilina (57).

Otro hecho que se observa al crecer las células de E. coli en medio luria con ácido fenilacético, es el bajo rendimiento celular, sobre todo si se considera que se está trabajando con un medio rico, al respecto varios autores (28,31,4,11,9) han informado acerca del efecto tóxico de ácido fenilacético, y específicamente para E. coli 9637 (Szentirmai) informa que el ácido deberá añadirse en las primeras 5 horas de crecimiento del microorganismo. Otro factor que afecta la producción de la enzima (8,23) es el de la aereación que a su vez afecta el rendimiento celular.

Así pues, con el objeto de observar el efecto de ácido fenilacético una vez iniciado el crecimiento de las células de E. coli, la importancia de la aereación y el efecto de un cambio de temperatura de 37°C a 29°C durante las primeras horas de crecimiento en la producción de la enzima y el rendimiento celular, se cultivaron células de E. coli 11105 (Tabla 4.4) en matraces Erlenmeyer de 125 ml., con 25 y 50 ml de medio



luria, a 37 y 29°C, a las 4 horas de crecimiento se añadió medio para completar 50 ml., ácido fenilacético para tener una concentración final del 0.2% P/V, y se hizo el cambio de temperatura a 29°C.

En la Tabla se observa, como ya se había concluído, que tanto la temperatura de 29°C como la presencia del ácido fenilacético son determinantes en la producción de la enzima. Otro factor que cabe resaltar de este experimento es la influencia de la baja aereación, ya que tanto a 29°C como a 37°C se produce mayor cantidad de enzima cuando se tiene un volumen inicial de 50 ml con ácido fenilacético que cuando se tienen 25 ml.

La producción de la enzima y el rendimiento celular se ven alterados si se añade el ácido fenilacético y se hace un cambio de temperatura de 37° a 29°C a las 4 horas de crecimiento (experimentos 4 y 7).

El mayor rendimiento celular se obtiene cuando no se realiza un cambio de temperatura de 37 a 29°C a las cuatro horas de crecimiento y se tiene un volumen inicial de 25 ml. Sin embargo, en estas condiciones, se obtiene una baja producción de la enzima.

Efecto del Acido Glutámico en la Producción de la Penicilino-Amidasa y el Crecimiento de E. coli

Okachi Misawa y Nara informan que para el cultivo de Kluyvera citrophila en la producción de Penicilino-Amidasa, el añadir 2% P/V de ácido glutámico en un medio rico aumenta los rendimientos celulares aún en presencia del ácido feniacético, y ayuda a la producción de la enzima. Con el objeto de verificar este comportamiento en la producción de penici

lino amidasa en E. coli y así poder aumentar los rendimientos celulares, se creció E. coli 11105 (Tabla 4.5) en medio luria con 0.2% de ácido fenilacético a 29°C y con concentraciones de ácido glutámico en % P/V de 0 a 3, en agitación rotatoria por 24 horas. En la tabla se puede observar que el ácido glutámico añadido al medio antes mencionado no incrementa considerablemente el rendimiento celular ni la actividad enzimática en ninguna de las cantidades añadidas.

Producción de Penicilino Amidasa en Células de E. coli en un Cultivo Lote Retroalimentado

Con objeto de ver la producción de la enzima en células de E. coli 11105 en un cultivo reemplazado, para su posterior producción en cultivo continuo, se cultivaron células de E. coli 11105 en un fermentador con 8 litros de medio luria con 0.2% P/V de ácido fenilacético a temperatura constante de 29°C, a las 24 horas de crecimiento se vació el cultivo dejando 500 ml para el inóculo y se añadió 7.5 l de medio precalentado a 29°C. Este paso se repitió once veces (Tabla 4.6) hasta completar 329 horas de cultivo.

En el experimento se observa que la actividad enzimática se pierde cada dos y cuatro pases aún cuando se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura, aereación, composición del medio de cultivo y pH inicial y final.

Presencia de un Plasmido en Cepas de E. coli que Producen Penicilino-Amidasa

Como se observa en la sección anterior, la información para -

la producción de la Penicilin-Amidasa se pierde através del tiempo después de varios pases en el cultivo de células de E. coli. Esto se puede deber a que las condiciones ambientales en las que se cultiva el microorganismo no sean las adecuadas para ejercer una presión selectiva y se conserve así la información que codifique para la enzima, ésto será más o menos factible si la información se encuentra en el cromosoma o en un plásmido.

Con el objeto de saber si las cepas de E. coli (9637, 11105) - que producen la Penicilino-Amidasa contenían un plásmido que estuviera implicado en la regulación de la producción de la enzima, se hizo un lisado de células de E. coli (9637 y 11105) y se corrió una electroforesis, como se indica en Materiales y Métodos, Sección de Microbiología.

En la Figura 4.4, podemos observar que existe un plásmido de - en ambas cepas.

Se tomó la cepa de E. coli 11105, se mutó para obtener una cepa E. coli 11105 Nal^R, y así tener un marcador cromosomal (ver Materiales y Métodos), además de las resistencias a Kanamicina y Estreptomycin que - presentaba la cepa.

Se trató de curar a la cepa del plásmido, por los métodos de bromuro etídio, Kanamicina y SDS (Ver Materiales y Métodos) sin éxito.

Así pues, se transformaron células de E. coli K 12 RR1, con el DNA del plásmido de la cepa 11105 (El DNA del plásmido fué proporcionado - por el Dr. Francisco Bolívar), se seleccionaron tres cepas resistentes a

Kanamicina, que creciesen en medio mínimo con NH_4Cl y ácido fenilacético, se rectificaron marcadores para la cepa de E. coli K 12 RR1, las cepas -- se crecieron en medio luria con 0.2% de ácido fenilacético a 29°C y en -- medio mínimo con NH_4Cl como fuente de nitrógeno y ácido fenilacético como fuente de carbono, se midió actividad enzimática, resultando ésta negativa, por lo cual es posible concluir que la información que codifica para la síntesis de la Penicilino-Amidasa no se encuentra en el plásmido, cuando menos en su totalidad.

Producción de Penicilino-Amidasa y Crecimiento de E. coli 11105 en otras Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Con el objeto de tener un medio más económico que el medio -- luria, para la producción de la Penicilino-Amidasa, se probaron otras --- fuentes de carbono y nitrógeno. Como podemos ver en la Tabla 3 de Antecedentes y por los resultados obtenidos con el medio luria, una fuente tanto de carbono como de nitrógeno muy utilizada en general para cualquier microorganismo que produzca la enzima es el extraco de levadura, otra fuente -- reportada en patentes (7,12,13) para el crecimiento de E. coli y produc--- ción de la enzima es el agua de cocimiento del maíz.

En el laboratorio se probó como otra opción de fuente de carbono la sacarosa, (Tabla 4.7) que en un medio mínimo junto con el NH_4Cl no es aprovechada, tal parece que en la cepa de E. coli 11105 existe cierta - auxotrofia ya que no siempre se observa crecimiento en medio mínimos, además de que la masa celular para tales cantidades de azúcares es muy baja, por otro lado parece ser que las condiciones de aereación en el crecimien-

to de la cepa son determinantes ya que se necesitaron 24 horas con 25 ml - de medio para que se observara crecimiento y se añadan los 25 ml. restantes junto con el ácido fenilacético. Cuando se utiliza licor de cocimiento de maíz, no se observa crecimiento, además de que éste presenta demasiados sólidos difíciles de aprovechar e interfieren en la cosecha de las células para su posterior inmovilización. En el caso del crecimiento del microorganismo y producción de la enzima con extracto de levadura, se observa que el microorganismo crece, y existe una actividad enzimática adecuada, sin embargo parece que al aumentar la concentración de extracto de levadura de 10 g/l a 20 g/l la actividad enzimática disminuye.

El Acido Fenilacético como Fuente de Carbono e Inductor en el Crecimiento de E. coli y Producción de la Penicilino-Amidasa

Como sabemos para varios sistemas enzimáticos inducibles, el inductor de la enzima puede servir a su vez como substrato en el medio. Si observamos la actividad enzimática tenemos que ésta esencialmente hidroliza amidas, además, Batchelor (58) informan que una forma de seleccionar microorganismos que produzcan la Penicilino Amidasa, es crecer éstos en Penicilina, así la enzima hidrolizará a la penicilina en ácido 6-aminopenicilánico y ácido fenilacético el cual sirve como fuente de carbono. Formando así el gene que codifica para la Penicilino-Amidasa, parte de una vía metabólica en donde se aprovechan compuestos del tipo de la penicilina como nutrientes.

En el laboratorio se crecieron cepas de E. coli 9637 que produce la enzima y E. coli K 12 (RR1) que no la produce (Tabla 4.8) en NH_4Cl -

como fuente de nitrógeno y diferentes concentraciones de ácido fenilacético (0.1, 0.2 y 0.4% P/V) como fuente de carbono a 29°C y 37°C.

Se puede observar que la cepa 9637 que tiene la enzima aprovecha el ácido fenilacético como fuente de carbono, sin embargo, ésta utilización se aprovecha tanto a 29°C como a 37°C y sabemos que la actividad enzimática a esta última temperatura es baja. En las cepas de E. coli RRI se observa crecimiento a las 48 horas llegando a un óptimo de 0.3 unidades de D.O. lo cual indica cierta utilización del APA como fuente de carbono o bien dicho crecimiento se deba a mutaciones espontáneas con dicha capacidad. El crecimiento de E. coli en ácido fenilacético como fuente de carbono concuerda con lo informado por Vojtisek y Slezak.

Se midió actividad enzimática específica en cepas crecidas en este medio y se obtuvieron actividades que oscilaron entre 2 y 5 uM de 6-APA/mg de proteína en 30 minutos a 40°C.

Crecimiento de E. coli en Fenilacetamida

Como se muestra en experimentos anteriores las cepas de E. coli que contienen la enzima crecen perfectamente en ácido fenilacético como fuente de carbono y NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Por otro lado Cole, Savidge y Vanderlaegle informan que la Penicilino-Amidasa muestra su mayor afinidad por fenilacetamidas, además de la existencia de otros informes en las que se obtienen mutantes hiperproductoras de la enzima al crecer cepas de E. coli en hidroxifenilacetamida y NH_4Cl .

En el laboratorio se crecieron células de E. coli 9637 en fenilacetamida como única fuente de carbono y de nitrógeno (Tabla 4.9).

Los resultados muestran que las células crecen en fenilacetamida a las 24 hrs. cuando han sido previamente cultivadas en ácido fenilacético como fuente de carbono o sea que para crecer en fenilacetamida como fuente de carbono y nitrógeno necesitan tener la enzima que hidrolise la unión amida, y así obtener el ácido fenil acético y el amonio.

Se midió actividad enzimática siendo ésta de 5.5 uM de 6-APA/mg de proteína en 30 minutos a 40°C. Las actividades enzimáticas encontradas en las cepas de E. coli 9637 crecida en ácido fenilacético y NH_4Cl y en fenilacetamida en experimentos posteriores son muy similares no aumentando la actividad enzimática en células crecidas en fenilacetamida.

Crecimiento de E. coli y Producción de la Penicilino-Amidasa en Diferentes Aminoácidos como Fuentes de Nitrógeno

Por los experimentos anteriores parece claro que la fuente de carbono adecuada para la producción de la Penicilino-Amidasa es el ácido fenilacético que a su vez sirve de inductor, y que el uso de medios ricos traen consigo algún tipo de represión por algún componente en el medio. Por otro lado tenemos informes en las que se crece E. coli (11) y Kluyvera citrophila (8) en medios ricos con ácido glutámico para obtener mejores rendimientos celulares y producción de enzima e incluso que en el caso de Kluyvera citrophila ATCC 21285 (22) el glutamato es añadido como inductor en lugar del ácido fenilacético.

Sabemos que el ácido glutámico es el aminoácido al cual llegan arginina, histidina, glutamina y prolina después de reacciones de transaminación para colectar sus grupos amino, así el ácido glutámico por la glutamato transaminasa es convertido a celoglutarico y entrar al ciclo de -- Krebs, y en este recorrido existe una regulación por nitrógeno.

Con el objeto de observar si la producción de la Penicilino- -- Amidasa estaba regulada por nitrógeno. Se creció la cepa de E. coli en -- arginina, histidina, prolina y ácido glutámico como fuentes de nitrógeno -- en presencia de glucosa como fuente de carbono, (Tabla 4.10) obteniéndose un crecimiento positivo, para las cepas crecidas en arginina, glutámico y prolina. Luego se creció la cepa de E. coli en arginina glutámica, prolina y NH_4Cl como fuentes de nitrógeno y en glucosa y ácido fenilacético como fuentes de carbono y se midió actividad enzimática. (Tabla 4.11) se observa que la mayor actividad se observa cuando la cepa crece en medio mínimo con ácido fenilacético como fuente de carbono y NH_4Cl como fuente de nitrógeno por lo que parece no haber regulación por nitrógeno.

Efecto de la Concentración de Fosfatos en el Crecimiento de E. coli 9637

Con el objeto de tener un medio más económico para la producción de la Penicilino-Amidasa y así poder llevar a cabo un escalamiento en la producción de la enzima a nivel de planta piloto, se creció E. coli 9637 en diferentes concentraciones de fosfato de potasio monobásico (1.4, 3.5, 7, 13.6 g/l) (ver Tabla 4.12), en un medio mínimo, con 2 g/l de ácido fenilacético y 0.8 g/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno, y se midió D.O. a 540 nm y actividad específica a través del tiempo.

El experimento se observa, que a las 23 horas de haberse iniciado el experimento, solo han crecido aquellas células que se cultivan con 1.4 g/l de fosfato de potasio monobásico, indicándonos esto, que una concentración de fosfatos mayor de 1.4 g/l en el medio de cultivo, en las condiciones dadas, retrasa el crecimiento de las células de E. coli, pero no afecta la producción de la enzima.

Crecimiento de E. coli y Producción de la Penicilino-Amidasa en Medio --- Mínimo

Para saber en que forma se asocia la producción de Penicilino Amidasa con el crecimiento de E. coli cultivada en medio mínimo, se crecieron cepas de E. coli 9637 en un medio mínimo con 2 g/l de ácido fenilacético como fuente de carbono y 7 g/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno, en un fermentador de 14 l, con 10 l de medio a 29°C, con aereación y agitación. Se midió crecimiento por densidad óptica a 540 nm. y actividad enzimática específica a través del tiempo (Figura 4.5).

En el experimento se observa que la producción de la enzima en este medio está relacionado con el crecimiento del microorganismo.

RESULTADOS EN EL AREA DE INGENIERIA ENZIMATICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS DE LA INMOVILIZACION EN COLAGENA

Inmovilización de Células de *E. coli* con Actividad Enzimática de Penicilino Amidasa, en Membranas de Colágena curtidas y sin curti\$ con Glutaraldehido

Con el objeto de verificar lo informado por Vieth y Venkata--subramanian (56), al respecto del aumento en estabilidad de las membranas de colágena con células inmovilizadas, al tratarlas con glutaraldehido. Se inmovilizaron células de *E. coli* 9637 con actividad enzimática de penicilino amidasa por el método descrito en metodología en ingeniería --enzimática para inmovilizar células de *E. coli* en colágena, unas de ellas se curtieron con 0.5% de glutaraldehido mientras otras se dejaron sin curtir. En ambos casos se almacenaron a temperaturas de 4, 29 y 37°C, y se midió actividad enzimática a 45°C. (Tabla 5.1). Se calculó la vida media del catalizador en las diferentes condiciones observándose que la vida media es mayor en aquellas membranas que fueron curtidas, no observándose ningún efecto por la temperatura de almacenamiento.

Efecto del Tiempo de Curtido sobre la Actividad Enzimática de la Penicilino Amidasa en Células de *E. coli* inmovilizadas en Membranas de Colágena

Como se mencionó en antecedentes, la efectividad del curtido con glutaraldehido en un catalizador (enzima-soporte) depende del tiempo de contacto, concentración, pH y temperatura en que se lleve a cabo el --curtido así, pues para obtener una resistencia adecuada del catalizador --con una buena actividad enzimática, se curtieron membranas de colágena --con células de *E. coli* con penicilina amidasa inmovilizadas a temperatura ambiente con 0.5% de glutaraldehido durante 15, 30 y 45 minutos y se les midió su actividad enzimática inicial (Tabla 5.2). Se observa que no exis

te diferencia de actividad entre las membranas curtidas a los 15 y 30 minutos y que la actividad disminuye cuando el catalizador se deja curtiendo durante 45 minutos.

Efecto de la Concentración de Glutaraldehído en la Actividad Enzimática de Penicilino Amidasa, unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Colágena

Con el objeto de observar el efecto de la concentración de glutaraldehído sobre la estabilidad del catalizador células (penicilino amidasa-colágena), se curtió éste con concentraciones de glutaraldehído del 0.5, 1, 1.5 y 2% P/V, durante 30 minutos a temperatura ambiente, se midió actividad enzimática inicial (Tabla 5.3) y se dejaron las membranas durante 13.2 días a 45°C, pH inicial de 8.0 con una concentración de penicilina G-K de 18 g/l midiéndose actividad enzimática cada 24 horas. En estos experimentos se observa que la actividad enzimática en los catalizadores tratados con las diferentes concentraciones de glutaraldehído es del mismo orden de magnitud siendo menor en el caso del curtido con glutaraldehído al 2% P/V, sin embargo la actividad enzimática retenida a través del tiempo es mayor en aquellas membranas curtidas con 2% P/V de glutaraldehído.

Capacidad de la Colágena para atrapar Células de E. coli con Actividad Enzimática de Penicilino Amidasa

Con el objeto de verificar la capacidad de atrapamiento de la colágena en nuestro sistema, se inmovilizaron células de E. coli en porcentajes de 50, 42 y 33% (Células del total del catalizador). Se curtie-

ron con 2% P/V de glutaraldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se mantuvieron en una mezcla de reacción durante 6 días a 45°C, pH 8.0, tomándose muestras para determinar ácido 6-aminopenicilánico producido cada 24 horas (Tabla 5.4). En la tabla se observa que hay una mayor actividad para el catalizador al 33% que es el que contiene menor número de células, aunque la diferencia en actividad con el catalizador de 42% de células es muy poca.

El catalizador con 50% de células resultó muy poco manejable por lo que se desecho sin medirle actividad enzimática. Los resultados no concuerdan con lo informado por Vieth y Venkatasubramanian(56) ya que ellos pueden inmovilizar hasta 5 gramos de células peso seco por gramo de colágena.

Estabilidad de Almacenamiento de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Membranas de Colágena

Con el objeto de observar la estabilidad de la penicilino amidasa unido a células inmovilizadas en membranas de colágena se almacenó el catalizador, a las temperaturas de 4°C ambiente y 37°C durante 15 días, 1 y 3 meses y se les midió actividad inicial y después del tiempo de almacenamiento (Tablas 5.5). Observándose que en cualquiera de las 3 condiciones, al mes de almacenamiento el catalizador solo mantiene de un 30 a 35% de su actividad inicial. Estas observaciones no concuerdan con lo informado por Vieth y Venkatasubramanian quienes obtienen estabilidad de 1 año de las membranas almacenadas en frío.

Influencia del Flujo en la Producción del Acido 6-Aminopenicilánico en --
una Columna Continua

Como se mencionó en la sección de antecedentes los tamaños de reactores utilizados en la producción del ácido 6-aminopenicilánico varían en su capacidad desde 0.21 a 1000 l, encontrándose diferentes problemas en su manejo. Con el objeto de observar el comportamiento del catalizador colágena - células - penicilino amidasa en reactores, se empacó una columna con una capacidad de 52 ml, con catalizador y se corrió a 45°C y pH inicial de 8. La concentración de penicilina fue de 20 g/l y los flujos oscilaron entre 5 - 50 ml/hn. Figura (5.1).

La mayor producción de 6-APA se obtuvo cuando se trabajó con un flujo de 11.4 ml/hr. que es aproximadamente 0.25 del volumen de la columna.

Estabilidad Operacional de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Colágena en una Columna con Recirculación

Con el objeto de observar la estabilidad operacional de la penicilino amidasa en células de E. coli inmovilizadas en colágena, se empacó una columna de 80 ml de capacidad con el catalizador, y se operó a 45°C, pH 8.0 inicial, 7.50 g/l de penicilina y un flujo de 45 - 60 ml/h. durante un mes, determinándose actividad enzimática diariamente (Figura 5.5), obteniéndose una vida media de 4 meses.

Influencia del pH en la Producción del Acido 6-aminopenicilánico

Por los perfiles de pH antes presentados en este trabajo y por los mencionados en antecedentes, sabemos que el pH óptimo para la activi--

dad de la penicilino amidasa oscila entre 7.0 y 8.0. Con el objeto de observar la influencia en el control del pH en la producción del ácido, por la penicilino amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas en colágena, se realizó la reacción de hidrólisis a un pH inicial de 8.0 con y sin control, con diferentes concentraciones de penicilina, durante 6 horas después de este tiempo se midió la producción del ácido 6-aminopenicilánico (Tabla 5.6). Se observa que la cantidad de ácido producida siempre es mayor en la reacción en donde el pH ha sido controlado a 8 unidades no importando la concentración de penicilina, y que la diferencia de producción entre el sistema controlado y el no controlado es mayor a medida que se aumenta la concentración de penicilina en el sistema.

Perfil de Temperatura de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Colágena

Otro de los parámetros que se ven modificados al inmovilizar las enzimas, es la temperatura óptima a la cual se realiza la reacción enzimática. Para la penicilino amidasa proveniente de E. coli se ha informado (ver Tabla 2.5, Sección de Antecedentes) una temperatura óptima de 50-52, 30, y 37°C en el caso de la enzima soluble y 30, 50-55°C para la enzima unida a células de E. coli.

En el laboratorio se realizó el perfil de temperatura para la actividad enzimática de la penicilino amidasa unidas a células de E. coli (11105), y ésta inmovilizada en colágena en un rango de temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C durante 30 min. (Figura 5.2). Obteniéndose una temperatura óptima de 55°C para ambos sistemas.

Perfil de pH para la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en membranas de Colágena

Al inmovilizarse las enzimas en un soporte, se obtiene un catalizador modificado, por lo que las condiciones óptimas para que se realice la reacción enzimática también pueden verse modificadas.

Para la penicilino amidasa se ha informado que sus pH óptimos para la reacción enzimática son de 7.5 y 8.2 para células intactas de E. coli y 7.65, 7.8 y 8.2 para la enzima insoluble. (Ver Tabla 2.5 en Antecedentes). En el laboratorio se realizó el perfil de pH para la penicilino amidasa unida a células de E. coli ATCC 1105 y este mismo sistema inmovilizado en colágena. (Figura 5.3). Se midió actividad enzimática en ambos sistemas en un rango de pH de 6.5 a 9.0, obteniéndose un pH óptimo de 8.5 para la penicilino amidasa unida a células de E. coli, y de 8.0 cuando ésta se inmoviliza en colágena.

Producción del Acido 6-Aminopenicilánico en una Columna empacada con Penicilino Amidasa Unida a Células Inmovilizadas en Colágena con Diferentes Concentraciones de Substrato

Como se ha informado por varios autores (antecedentes Tabla 2.7) las concentraciones de penicilina utilizadas en los diferentes reactores enzimáticos en la producción del ácido 6-aminopenicilánico, varían de 10 a 50 g/l en volúmenes de 0.02l a 1000 l. con conversiones en ellos del 80 al 100%.

Con el objeto de saber que rendimientos se obtenían en la producción del ácido 6-aminopenicilánico, al hidrolizar la penicilina G, con la penicilino amidasa unida a células inmovilizadas en colágena y de obser-

var el efecto de la concentración de la penicilina, en la reacción enzimática; se empacó una columna con 13.2 g de catalizador y se circuló un volumen de 0.5 l., con concentraciones de penicilina de 5, 12 y 24 g/l manteniendo un pH de 8.0 constante (Tabla 5.7 y Figura 5.4). En el experimento se observa que la concentración del sustrato influye en la velocidad de producción del 6-APA, ya que se obtienen 17.3 μM de 6-APA/ml cuando se tienen 12 y 24 g/l de penicilina en el sistema, solo que en 5 horas en el caso de 12 gr/l y en 10 horas para 25 g/l y la velocidad inicial cuando se utilizan 12 g/l de penicilina es de 3.36 μM 6-APA ml/h, mientras que es de 1.98 para cuando se tienen 24 g/l de penicilina. Otro hecho importante es que no se llega al 100% de conversión ni aún en el caso de tener 5 g/l de penicilina en el sistema.

Producción del Ácido 6-Aminopenicilánico en un Tanque Agitado y en una Columna con Recirculación. Empacados con Penicilino Amidasa Unida a Células Inmovilizadas en Colágena

En general los reactores de elección para la utilización de enzimas inmovilizadas son columnas de flujo pistón, por su manejo, empaque de los reactores, y las inhibiciones por producto que presentan las reacciones enzimáticas.

Con el objeto de elegir el reactor adecuado para la producción del ácido 6-aminopenicilánico por la penicilina amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas en colágena, se empacaron dos reactores con el catalizador. Uno correspondiente a un tanque agitado con 5 g de catalizador y una columna con recirculación con 11.7 g de catalizador, ambos reactores --

con 20 g/l de penicilina-G-L y 500 ml de volumen a pH de 8 constante y 45°C
Tablas 5.8 y 5.9.

En el tanque agitado se obtiene una conversión máxima del 42% en 8 horas, en el cuarto experimento (32 horas de reacción) ya se ha perdido el 30% de la actividad inicial además de que el catalizador no resiste la agitación.

En la columna con recirculación también se obtiene el 41% de conversión, sin embargo hay que considerar que este reactor contiene un -- poco más que el doble del catalizador que en el tanque agitado, así tene--mos que sin el tanque agitado obtenemos 2275 uM de 6-APA/g de catalizador y solo 953 uM 6-APA/g de catalizador en la columna con recirculación. En este reactor no se observa deterioro físico en el catalizador.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS DE LA INMOVILIZACION EN CARRAGENINA

Efecto de la Concentración de Glutaraldehído en la Actividad Enzimática de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Carragenina

Como se mencionó en antecedentes, el tratamiento de los sopor_{tes} con glutaraldehído, les dá mayor resistencia, sin embargo su efectivi_{dad} en matrices con enzimas o células inmovilizadas, dependerá del tiempo de contacto, concentración, pH y temperatura en que se lleve a cabo el --
curtido. En el laboratorio se inmovilizó la penicilino amidasa unida a -
células de E. coli en carragenina por el método descrito por Tosa y cola
boradores (53) variándose en éste la concentración de glutaraldehído uti
lizada en el curtido, para obtener una actividad enzimática adecuada y --
una buena estabilidad en el catalizador. Así se curtió con 0.85 mM de --
etilen amina y concentraciones de glutaraldehído en un rango de 0.5 a 2%
P/V (Tabla 6.1), observándose que la actividad enzimática después de 30 -
minutos de reacción en cada uno de los catalizadores es del mismo orden -
de magnitud, se dejaron durante 24 horas en condiciones de reacción de hi
drólisis y se determinó la producción de 6-APA (Figura 6.1), observándose
que la mayor actividad corresponde al catalizador curtido con 2% P/V de -
glutaraldehído, y manteniéndose esta actividad durante una semana, mien--
tras que el catalizador curtido con 0.5 de glutaraldehído se destruye al
tercer día de prueba.

Capacidad de Atrapamiento de la Carragenina de Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli

Tosa y colaboradores informan que es posible inmovilizar 16 g
peso seco de células en 4 g peso seco de carragenina (53). Con el objeto

de verificar esta capacidad de atrapamiento de la carragenina en nuestro sistema, y probar su resistencia a la agitación, se inmovilizó la penicilino amidasa unida a células de E. coli variando la relación carragenina-células (peso seco) 1:1, 1:2 y 1:3, se curtió y se colocaron en buffer de fosfatos 0.03 M pH de 8.0 a 29°C con agitación rotatoria de 120 rpm - durante 24 horas (Tabla 6.2). Se observa que sólo resiste la agitación aquel catalizador que contiene el 50% de la relación carragenina-células, aunque utilizando las tres relaciones se logra inmovilizar a las células de E. coli con la actividad enzimática de la penicilino amidasa.

Estabilidad de Almacenamiento de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en carragenina

Con el objeto de observar la estabilidad de almacenamiento de la penicilino amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas en carragenina, se almacenó el catalizador, a las temperaturas de 4°C, ambiente y -37°C, durante 15 días, 1 y 3 meses. Se les midió actividad enzimática antes y después del almacenamiento (Tabla 6.3), observándose que el catalizador almacenado a 4°C mantiene el 100% de su actividad aún después de 4 meses de almacenamiento mientras que los almacenados a temperatura ambiente y 37°C solo mantiene un 70%.

Perfil de pH de la Penicilino Amidasa unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Carragenina

Así como la penicilino amidasa unida a células inmovilizadas en colágena, se realizó un perfil de pH, para observar si había algún cam-

bio con respecto al pH óptimo para la penicilino amidasa unida a células de E. coli y así operar los reactores enzimáticos, también se hizo un -- perfil de pH para el sistema inmovilizado en carragenina, en un rango de 6.5 a 9.0 (Figura 6.2). Observándose una meseta de actividad enzimática óptima a 8.0 y 8.5 unidades de pH.

Perfil de Temperatura de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en carragenina

Otro parámetro que se midió una vez que se inmovilizó la penicilino amidasa unida a células de E. coli, al inmovilizarse en carragenina, fué la temperatura óptima de reacción. Esto se hizo en un rango de - temperaturas de 30 a 60°C durante 30 minutos (Figura 6.3). En el experimento se observa una temperatura óptima de reacción de 55°C para la penicilino amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas en carragenina.

Producción del Acido 6-aminopenicilánico en un Tanque agitado con Penicilino amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en Carragenina, con Diferentes concentraciones de sustrato

Una vez más se probó la penicilino amidasa unida a células de E. coli pero ahora en carragenina, en función de diferentes concentraciones de sustrato (10, 20, 30, 40 y 50 g/l de penicilina-G-K) pH constante de 8.0 a 40°C y 10.95 g de catalizador (Tabla 6.4 y Fig. 6.4), para observar los rendimientos y comportamientos del catalizador en un tanque agitado como reactor.

En el experimento se observa, que el aumento en la concentración de sustrato no afecta la velocidad de reacción, y que la cantidad -

de 6-APA que se obtiene es de 55 a 70 μ M 6-APA, deteniéndose en este punto la reacción. Un problema que se observa, es que el catalizador se ve afectado por la agitación en el sistema.

Producción del Acido 6-aminopenicilánico en una Columna con Recirculación, con Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli Inmovilizadas en carragenina

Otro reactor que se probó en la producción del 6-APA con la penicilino amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas en carragenina fué el de una columna con recirculación. Para ello se montaron dos columnas, una con una capacidad de 180 ml, y otra con 1,100 ml, con 23 g y 54 g de catalizador respectivamente, a 40°C, pH de 8.0 constante y con concentraciones de penicilina que oscilaron entre 6 y 50 g/l. (Tablas 6.5, 6.6 y Figuras (6.5 y 6.6). En ambas columnas no se observa deterioro físico del catalizador y la velocidad de reacción no disminuye al aumentar la concentración de substrato. La velocidad de reacción y las conversiones son mayores en la columna con 54 g de catalizador, aunque la relación catalizador volumen es mayor en la segunda columna.

RESULTADOS EN LA PLANTA PILOTO



Resultados a Nivel de Planta Piloto

Durante el desarrollo de una tecnología existen dos etapas - previas antes de llegar a un nivel de producción.

La primera a nivel laboratorio que consiste de una serie de estudios mínimos que nos ayudan a definir el sistema en cuestión, encontrando los parámetros físicos y químicos que la rigen, para poder reproducirlo y así llegar a optimizarla. La segunda etapa a un nivel de planta piloto en donde se reproduce el fenómeno estudiado en el laboratorio en condiciones definidas pero a una escala mayor, este estudio nos permite:

- a) Confirmar los datos del laboratorio
- b) Obtener datos para el diseño de la planta comercial
- c) Posibilidad de diseñar procesos integrados del mismo proceso
- d) Detectar limitaciones en el proceso debidas a impurezas en las materias primas
- e) Contar con suficiente producto para hacer evaluaciones técnicas y de mercado
- f) Evaluar técnica y económicamente el proceso con riesgo mínimo
- g) Obtener datos referentes al mantenimiento y seguridad del proceso

Es por esto que en el presente trabajo se presenta como objetivo fundamental escalar cada una de las áreas que integran el proceso, a un nivel de planta piloto.

A continuación presentaré los estudios realizados en la planta piloto.

Producción de la Penicilino Amidasa en Células de E. coli a Nivel de --
Planta Piloto

La producción de la penicilino amidasa a nivel de planta piloto se realizó en cepas de E. coli ATCC 11105 nunca presentó problema para crecer en medios mínimos. Las condiciones de producción del microorganismo fueron las óptimas encontradas en el laboratorio, estas son: cultivo del microorganismo en un medio mínimo con 2 g/l de ácido fenilacético como fuente de carbono e inductor y 0.8 g/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Todas las materias primas que constituyen el medio fueron grado industrial, el pH inicial fué de 7.4, a una temperatura de 28 - 29°C y una aereación de IVVM. La fermentación se hizo en tanque agitador con un volumen de trabajo del 60% de la capacidad del tanque. El equipo fué proporcionado por FERMIC, S.A. (compañía productora de antibióticos).

Se realizaron dos fermentaciones, la primera de 160 l, ya -- que en ésta podríamos observar si obteníamos los rendimientos celulares y la actividad específica esperados, además de poder visualizar algun -- problema en la operación del fermentador antes de realizar la segunda -- fermentación de 3000 litros, en la que obtendríamos la cantidad de enzima necesaria para llevar a cabo la reacción de hidrólisis tanto con célu las inmovilizadas como con la enzima inmovilizada.

En la primera fermentación se inoculó con 6.5 litros de cepa crecida en medio mínimo, y cosechados recientemente. En esta primera -- fermentación la producción de la enzima fue muy similar a la producción en el laboratorio. (Fig. 7.1). Durante las primeras 10 horas que se --

pudo medir su producción esta estuvo asociada al crecimiento, y la actividad específica final del lote fué de 3.67, que era la esperada. La -- masa celular obtenida fué de 1 Kg. peso húmedo que corresponden aproximadamente a 160 g peso seco, obteniendo de esta forma un rendimiento celular de 1.06 g/l después de centrifugar y considerando que la pérdida de la masa celular fué de un 20 - 30%, podemos decir que aproximadamente se obtuvieron 1.2 - 1.3 g/l mientras que lo esperado eran 1.5 g/l. En la fermentación se observó que después de 20 horas de crecimiento empieza a haber lisis celular por lo que la fermentación pudo haber sido detenida en este tiempo, obteniendo así una masa celular mayor. Un problema que se presentó fué la presencia de una gran cantidad de espuma, problema -- que se resolvió, introduciendo aire a cúpula y añadiendo antiespumante. Se procedió a realizar la segunda fermentación en un tanque de 500 l con un volumen de trabajo de 3000 l. El tanque se inoculó con 2l l. de la cepa crecida en el mismo medio mínimo utilizado en la fermentación. De estos 2l l., 15 l. estuvieron refrigerados durante una semana y los 6 l. restantes fueron cosechados recientemente. En esta segunda fermentación el microorganismo comenzo a crecer después de 48 horas de haber inoculado el tanque, se reinocula el fermentador con 3840 g de ácido fenilacético y 1300 g de NH_4Cl a las 24 horas de haberse iniciado el crecimiento -- ya que por percances técnicos no se pudo cosechar a las 24 horas después de haberse iniciado el crecimiento, cosechándose hasta las 96 horas después de haberse iniciado éste. La actividad específica de la enzima en la célula de E. coli crecidas en esta fermentación fué de 1.7. La masa celular obtenida fué de 12 Kg. peso húmedo, que eran 2.4 Kg peso seco, ob -- teniéndolo así un rendimiento celular de 0.8 g/l después de centrifugar --

una vez más si consideramos que en la operación de centrifugado se puede de un 20 a un 30% de la masa celular, se obtuvieron en la fermentación 0.96 - 1.04 g/l de células que son el 64 - 69.33% de lo esperado. Los datos de esta segunda fermentación nos muestran, que hubo una fase lag muy prolongada, un rendimiento celular bajo y una menor producción de la enzima. Con respecto a la fase lag tan prolongada podemos decir que esto se debió a: 1o. La calidad del inóculo, ya que este estaba constituido por dos terceras partes de un inóculo viejo en el que probablemente no había células viables, con respecto a este punto cabe mencionar que hubo una gran cantidad de espuma desde el inicio de la fermentación, lo cual habla de la presencia de proteína, y probablemente, esto se debiera a células lisadas en el inóculo. 2o. La interrupción de la corriente eléctrica durante 78 minutos entre las 3.5 y 6 horas de la fermentación, en donde prácticamente no hubo ningún servicio, principalmente aire en el medio que en un volumen de 3000 l. presenta mayores problemas por el oxígeno disponible. 3o. La agitación en el tanque, mientras que en la primera fermentación ésta era de 320 rpm en la segunda fué de 120 rpm, esto disminuye la concentración de oxígeno disuelto.

Con respecto al bajo rendimiento celular, tal vez se halla debido a una lisis celular en el medio ya que el cultivo duró 96 horas con el microorganismo creciendo. La baja actividad enzimática pudo ser consecuencia de todos los factores antes mencionados y además de que la cantidad de ácido fenilacetio añadida al medio haya sido insuficiente para inducir completamente al sistema.

Comparando las dos fermentaciones antes descritas podemos -- decir, que es muy importante la calidad del inóculo y la concentración -- de oxígeno disuelto en el medio, y que la disminución en el rendimiento celular y a la producción de la enzima no se debieron al cambio de esca- la sino a problemas técnicos.

Inmovilización de la Penicilino Amidasa Unida a Células de E. coli en -- Carragenina a Nivel de Planta Piloto

El soporte elegido para inmovilizar a la penicilino amidasa unida a células de E. coli, a nivel de planta piloto fué la carragenina a través de las condiciones óptimas de inmovilización encontradas en el laboratorio.

Se eligió la inmovilización en carragenina sobre el uso de la colágena porque:

- a) La estabilidad de almacenamiento de la penicilino amidasa en -- las células inmovilizadas en carragenina es mayor, ya que -- mientras en esta se conserva el 100% de la actividad inicial -- después de haber sido almacenada durante 4 meses a 4°C, la en- zima en células inmovilizadas en colágena solo retiene el 30% al ser almacenada en las mismas condiciones.
- b) La producción del ácido 6-aminopenicilánico es mayor cuando se inmoviliza en carragenina que en colágena, así tenemos que en el primero se obtienen hasta 113 mM de 6-APA/ml, mientras que en el segundo solo se obtienen 18 mM 6-APA/ml.

La inmovilización se llevó a cabo utilizando recipientes -- mayores (vasos de precipitado, ver Sección de Materiales y Métodos en --



Planta Piloto) para realizar el mezclado de carragenina con las células. La actividad del catalizador obtenida en el laboratorio inmovilizando en zima en células con una actividad específica de 2.22, fué de 579 uM de 6-APA/g de soporte, mientras que la obtenida en el catalizador producido a nivel de planta piloto fue de 210 uM de 6-APA/g de soporte, inmovilizando enzima en células con una actividad de 1.1.

Si hacemos la relación de la actividad de los dos catalizadores, encontramos que la actividad del catalizador producido en el laboratorio es de 2.75 veces mayor que lo del producido en la planta piloto, en donde se inmovilizó enzima con 2.07 veces menor actividad. Por lo tanto el catalizador producido a nivel de planta piloto tiene menor actividad que el catalizador producido en el laboratorio y esto se debió sustancialmente a la baja actividad específica encontrada en las células. Sin embargo también hubo efectos de las condiciones de inmovilización y estos pudieron deberse al tiempo de mezclado a 50°C de la carragenina con las células, que fué mayor de 5 a 10 minutos por la cantidad manejada, además, de los cambios de temperatura sufridos durante el almacenamiento del catalizador sin curtir, ya, y a que hubo interrupción de la corriente eléctrica y descomposición de los cuartos de temperatura, oscilando ésta en ellos de 0°C a 18°C. Este conjunto de sucesos dió como consecuencia un catalizador con la mitad de actividad enzimática de la esperada.

Producción del 6-APA en un Reactor Enzimático a Nivel de Planta Piloto

Para la producción del ácido 6-aminopenicilánico a nivel de planta piloto, se utilizó una columna batch con recirculación, con un volumen de operación de 20 l, concentraciones de penicilina de 50 y 25 g/l

pH controlado de 8.0, temperatura constante de 40°C, flujo de 140 a 600 ml/min y 1.3 Kg de catalizador (para mayor detalle acerca de las dimensiones y operación del reactor, ver Metodología de Planta Piloto en la sección de Metodología). Se eligió operar una columna con recirculación sobre un tanque agitado para la reacción de hidrólisis en la planta piloto, ya que si bien es cierto que en el tanque agitado, a nivel laboratorio se obtuvieron un máximo de 5957 μM de 6-APA/g de soporte y en la columna con recirculación 2940 μM 6-APA/g de soporte, en esta última no se observa ningún inconveniente en su operación, mientras que en el tanque agitado se tuvo que cuidar la forma de cargar el tanque con el catalizador para que este no sufriera daño durante la reacción, siendo éste un gran inconveniente para su escalamiento a un nivel mayor.

Las condiciones de temperatura y pH en la operación del reactor fueron las óptimas encontradas en el laboratorio para lograr una buena actividad enzimática y estabilidad tanto de la enzima como de los productos y substrato que conforman la reacción. Se operó el reactor con 20 litros de volumen y 50 g/l de penicilina ya que si la actividad del catalizador a nivel laboratorio se hubiese conservado en la planta piloto y se guardara una relación directa entre volumen de operación y cantidad de catalizador, para 20 l con 50 g/l de penicilina se hubiesen tenido que utilizar 766 g de catalizador para obtener cuando menos un 80% de conversión pero la actividad del catalizador en la planta piloto fué de 2.75 veces menor que la del laboratorio y se utilizaron 1.3 Kg de catalizador en un volumen de 20 litros con 50 g/l de penicilina en las tres primeras corridas. En las 2 últimas corridas se utilizaron 25 g/l de penicilina ya que

en los 3 experimentos anteriores con 50 g/l de penicilina, se llega a una conversión del 67%. Los flujos utilizados fueron los obtenidos con la -- bomba utilizada. Las dos primeras corridas se realizaron con un flujo -- variado para ver si se podía disminuir los problemas de inhibición por -- sustrato y productos junto con el control de pH.

En las tres corridas realizadas con 50g/l de penicilina (Fi-- gura 7.2) se obtienen de un 60 a 67%, mientras que lo esperado era de un 80%, sin embargo al igual que en el laboratorio los problemas se presen-- taron cuando se tenían en el reactor alrededor de 80 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de 6-APA. Otro fenómeno presentado en el reactor en la planta piloto fué el de que la reac-- ción alcanza un máximo de conversión y luego se inhibe totalmente. Si -- bién en las tres corridas se obtiene un rendimiento del 60%, el comporta-- miento de éstos através del tiempo es diferente, así tenemos que la velo-- cidad inicial de la primera corrida fué de 6.6 μM de 6-APA/ml/hora mien-- tras que en las dos posteriores fué de 11-12 μM de 6-APA ml/hora que es -- casi el doble de la primera. En la primera y tercera corrida hay una apa-- rente activación del soporte. Estos comportamientos no se deben al flujo ya que solo en la tercera corrida el flujo es constante. Quizá este com-- portamiento se deba a la teoría dada por Chibata (61); que es que una vez puestos en operación los reactores con células inmovilizadas, éstas su-- fren lisis a simples alteraciones en las membranas celulares, disminuyen-- do los problemas de difusión por quedar la enzima más disponible; así te-- nemos que en la primera corrida después de ocho horas de reacción la co-- lumna se activa, permanece mas o menos constante durante la segunda corri-- da, volviéndose a activar en la tercera corrida.

Con respecto a los experimentos con 25 g/l de penicilino -- (Fig. 7.3) se observa que en la primera corrida la velocidad inicial es de 17 μM de 6-APA/ml/hora y un 100% de conversión es mayor que las velocidades obtenidas en los reactores operados con 50 g/l de penicilina sin embargo, podemos decir que en éstos reactores hubiese inhibición por substrato ya que en el segundo experimento con 25 g/l de penicilina se obtiene una velocidad inicial de 12.91 μM de 6-APA/ml/hora y solo se lleva a un 80% de conversión. Tal vez en este último experimento se obtuvo tan baja conversión y menor velocidad porque el lavado en el experimento anterior no fué el adecuado o bien porque la columna estuviese perdiendo actividad.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como se mencionó anteriormente los objetivos de este trabajo fueron:

1. Optimizar la producción de la penicilino amidasa en cepas de E. coli a nivel laboratorio y su posterior escalamiento a nivel de planta piloto.
2. Optimización de la inmovilización de la penicilino amidasa unida a células de E. coli a nivel laboratorio y su escalamiento en planta piloto.
3. Optimización de las condiciones de operación de un reactor enzimático para la producción del ácido 6-amino penicilánico a partir de la penicilina G, a nivel laboratorio y su posterior escalamiento a planta piloto.

Para cubrir el primer objetivo se planteó la siguiente estrategia; pasar la información genética que codifica para la síntesis de la penicilino amidasa de la cepa de E. coli (ATCC 11105 ó ATCC 9637) a una cepa de E. coli K-12, cepa de la cual se tiene mucha información acerca de su información genética en el cromosoma, lo cual favorecía su manejo en el laboratorio, a diferencia de la cepa silvestre de E. coli que contenía la información que codifica para la enzima, y así poder realizar un posible mejoramiento de la cepa a través de manipulaciones genéticas por metodología en genética "clásica" o por el uso de técnicas de DNA recombinante y así sobreproducir la penicilino amidasa. La transferencia de la información genética sería mediante una transducción con el fago P_1 de una cepa de E. coli (9637 o 11105)^{au-} que contuviese la información para la penicilino amidasa, a una cepa de E. coli K-12 (RRL) leu⁻ pro⁻ vit. B₁⁻.

La forma de seleccionar aquella cepa que hubiese adquirido la información para sintetizar la enzima, sería aquella que fuese capaz de -- crecer en un medio en ausencia de leucina, y presencia de N-fenilacetil-L-leucina, ya que la enzima hidrolizaría el compuesto liberando al medio -- ácido fenilacético que se utilizaría como inductor y leucina que se aprovecharía para el crecimiento de la célula. Para ello se creó una cepa de -- E. coli ATCC 9637 Leu⁻ a través de un tratamiento con etilmetanosulfonato y enriquecimiento con penicilina (ver Materiales y Métodos). Se optimizaron las condiciones de propagación del fago P₁ de cepas de E. coli ATCC 9673 -- y ATCC 11105 y se sintetizó el compuesto N-fenil-acetil-L-leucina (trabajo realizado por el laboratorio y por el Q. Daniel Carranco). Desafortunadamente las cepas de E. coli K-12 que no producen la penicilino amidasa hi-- drolizaron la N-fenilacetil-L-leucina pudiendo crecer en este compuesto -- como fuente de leucina por lo cual el método de selección de cepas con penicilino amidasa no funcionó. Así se invirtieron mas esfuerzos en tratar de obtener un método para seleccionar esta cepa, tales como uso de indicadores en el medio, y de sustratos que al ser hidrolizados diesen alguna -- coloración a las colonias bacterianas; todo ésto sin éxito; por lo que nos avocamos a tratar de encontrar las condiciones óptimas de producción de la enzima en las cepas de E. coli silvestres que ya producían la enzima. En este momento se había encontrado en el laboratorio que la temperatura ópti-- ma de producción de la enzima era a 28°C, con una concentración de ácido -- fenilacético como inductor de 0.2% P/V y que no era factible el uso de medios mínimos ya que la glucosa reprimía la síntesis de la enzima y tal pare-- cía ser el caso del glicerol y otros polialcoholes (11) lo que nos hacía --

trabajar con un medio rico seleccionándose el medio Luria. En este medio, se observa que la enzima se produce en la fase exponencial tardía y estacionaria en el crecimiento del microorganismo, que es muy importante el cultivo en condiciones bajas de aereación ya que para matraces Erlenmeyer de 125 ml había que producir la enzima con 50 ml del medio. Sin embargo los rendimientos celulares no eran mayores que 2 g por litro ni aun suplementando el medio con ácido glutámico; estos rendimientos resultan ser muy bajos para un medio tan rico y costoso, razón por la cual este medio no es factible para su uso en producción. Se buscaron otras alternativas en medios ricos y más baratos como es el licor de maíz no logrando a crecer el microorganismo, por la presencia de tanto sólidos y tal vez la cantidad de ácido fenilacético presente en el medio. Se probó a la sacarosa como otra posible fuente de carbono ya que al ser hidrolizada y liberarse la fructosa y glucosa la primera podía ser una fuente de carbono que no reprimiese la producción de la enzima y permitiera crecer al microorganismo; sin embargo, esto no resultó ya que se necesitaban como mínimo 8 g por litro del disacárido, y la cepa (E. coli ATCC 11105) no siempre crecía. Por los resultados antes obtenidos no se deshechó el uso de medio Luria y se decidió producir la enzima en este medio en un cultivo retroalimentado, observándose que la información para producir la enzima se va perdiendo de cada dos a cuatro pases hasta llegar a perderse totalmente. Este resultado nos habla de dos posibilidades: a) que la información que codifica para la producción de la enzima se encontraba en un plásmido que se segregaba fácilmente o que las condiciones de crecimiento no ejercían una presión para que se expresase la información aunque esta se encontrara en el cromosoma. Los estudios en el laboratorio mostraron que si bien es cierto que ambas cepas

contienen un plásmido, la información que codifica para la síntesis de la enzima no se encuentra en él. Trabajos realizados por Wagner (59) muestran que la información se encuentra en el cromosoma.

Finalmente se optó por utilizar al inductor, el ácido fenilacético, como fuente de carbono, en un medio mínimo con NH_4Cl como fuente de nitrógeno, encontrándose resultados positivos para el crecimiento celular además de mayor producción de la enzima que en un medio Luria. Tratando de encontrar mejores sustratos en el medio para una mayor producción de la enzima, se probó la fenilacetamida (sintetizada en el laboratorio por el Q. Daniel Carranco) como única fuente de carbono y nitrógeno; también se probaron los aminoácidos, leucina, arginina, histidina, prolina y ácido glutámico como fuente de nitrógeno. Las cepas de E. coli crecieron en todos los sustratos antes mencionados, sin embargo, la producción de la enzima no fué mayor que la producida en un medio mínimo con ácido fenilacético como fuente de carbono y NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Otro hallazgo importante en la utilización de medios mínimos fué el hecho de que las bacterias crecieron más lentamente en presencia de cantidades crecientes de fosfatos; y de que la producción de la enzima en este medio está asociada al crecimiento celular.

De los resultados obtenidos podemos decir:

1. Del sistema que regula la producción de la enzima: a) que se trata de un sistema inducible y que el inductor reconocido es el ácido fenilacético. b) Con respecto a la temperatura de producción de la enzima tal vez éste pueda ser un mecanismo regulatorio a nivel de represor en donde éste sea más afín al operador a 37°C . c) La enzima no parece estar regulada por nitrógeno ya --

que cuando la cepa de E. coli se crece en otras fuentes de nitrógeno que no son NH_4Cl no se observa un aumento en su producción.

d) La síntesis enzimática se ve reprimida por la presencia de glucosa en el medio. Gaigand y Khadigashaikh (30) encuentran que ésta represión se anula cuando se añade al medio AMP_c y Vojtisek y Slezak (24) proponen que esta represión es directa sobre las enzimas que degradan el ácido fenilacético y esto en forma indirecta afectaría la síntesis de la penicilino amidasa. Esta hipótesis se ve apoyada por experimentos en el laboratorio que nos mostraron que cuando se crece la cepa de E. coli en un medio mínimo con glucosa y ácido fenilacético no se observa una curva de crecimiento diauxica como debería de esperarse si se utilizaran las dos fuentes de carbono. así tendríamos que al expresión de la penicilino amidasa no se ve afectada por catabolito y que la fuente de carbono preferente para el crecimiento celular es la glucosa.

Esto a su vez nos habla de una enzima catabólica ya que en un medio mínimo con ácido fenilacético como única fuente de carbono la producción de la enzima está asociada al crecimiento del microorganismo, mientras que en un medio rico esta producción es en la fase exponencial tardía y estacionaria además de perderse en un cultivo retroalimentado.

2. Con respecto a la utilización del ácido fenilacético como fuente de carbono podemos decir que tal vez éste sea metabolizado por la vía de 3,4, hidroxifenilacetato descubierta por Cooper y Skinner (60) (Fig. 8.1).

Curiosamente estos autores informan que esta vía se encuentra presente en ciertas cepas de E. coli pero no en E. coli K-12. En esta vía están envueltas ocho enzimas y tal parece que tres grupos de genes que lo regulan que son: a) los compuestos 3 y 4 hidroxifenilacético inducen a las enzimas 3 y 4 hidroxifenil hi-

droxilasa. b) El 3,4,dihidroxifenilacetato induce a una 5,carboximetil, hidroximuconico deshidrogenasa, una 5,carboximetil, 2-hidroximuconico descarboxilasa, una 2,hydroxihepta,2,4,dieno, 1,7,hidrolasa y una 4,hydroxi,2-cetopimélico liasa y c) un grupo regulador de la semialdehido deshidrogenasa asociada a NAD presente cuando se crece el microorganismo en 4,aminobutirato como fuente de nitrógeno, ácido succínico como fuente de carbono y a 28°C. En nuestros estudios encontramos que las cepas de E. coli K-12 que aparentemente no poseen la información que codifica para la producción de la penicilino amidasa no crecen en ácido fenilacético como única fuente de carbono. Si observamos la vía metabólica propuesta, existe una gran participación del NADH y del oxígeno y recordemos que Vojtisek y Slezak (21) informan -- que la penicilino amidasa no se produce en altas concentraciones de oxígeno disuelto. Otro hallazgo en el laboratorio es de que las células de E. coli crecen más rápidamente en bajas concentraciones de KH_2PO_4 , esta sal en un medio mínimo cumple la función de crear un sistema buffer fuerte, pudiendo esto estar relacionado con la disposición en el medio de protones, que favorezcan la producción del NADH. Por estos hallazgos, es posible que el ácido fenilacético sea metabolizado por esta vía, y por tanto la regulación de la penicilino amidasa podría estar involucrada con la expresión de este conjunto de enzimas.

3. Para una producción óptima de la enzima en cepas de E. coli, el microorganismo deberá crecerse en un medio mínimo con 0.2% P/V de ácido fenilacético como inductor y fuente de carbono, con -- 0.8 g/l de NH_4Cl , bajas concentraciones de K_2HPO_4 , en ausencia de glucosa. Las ventajas del uso de este medio sobre un medio rico son, a) el costo y b) la actividad específica obtenida, ya que mientras en el primero se obtienen de 3 a 5 unidades como -- promedio en el segundo, se obtienen de 0.5 a 1.0 unidades, además de que en un medio rico la producción de la enzima se pierde después de varios pasos.

Para cubrir el segundo y tercer objetivo en el trabajo, se de cidió inicialmente, inmovilizar a la penicilino amidasa unida en células de E. coli en colágena. Las razones de la elección de esto como soporte para inmovilizar en ella nuestro sistema fueron: a) disponibilidad en el laboratorio; b) el método de inmovilización utilizada, ya que éste es a través del atrapamiento celular que es la forma más adecuada de inmovilizar células, por la estabilidad de éstas en el soporte, c) las condiciones de inmovilización de pH y temperatura no parecían afectar mayormente la -- estabilidad de la enzima y d) en el momento de iniciar el trabajo solo se había informado de la inmovilización de células completas en colágena y -- poliacrilamida.

Se optimizaron las condiciones de inmovilización para nuestro sistema, encontrando que la estabilidad del catalizador es mayor si se --- curte y este curtido debe hacerse con una concentración de glutaraldehído del 2% P/V y durante 30 minutos. La capacidad de atrapamiento de la colágena fué de 0.5 g peso seco células de E. coli con penicilina amidasa, por 1 g de colágena, cabe señalar que en nuestro sistema la capacidad de atrapamiento es 10 veces menor que la informada por Vieth y Venkatasubramanian (56), esto tal vez se deba a que nosotros inmovilizamos las células húmedas recién cosechadas o almacenadas en tolueno. La enzima pierde el 45% - de su actividad inicial al ser inmovilizada y curtida en colágena. La enzima en las células inmovilizadas en colágena presenta una máxima activi-- dad a 55°C y pH de 8.0. La temperatura es la misma encontrada con la enzi-- ma en células libres, indicandonos que la inmovilización en colágena no la confiere ni le resta estabilidad, por lo que la enzima no parece ser modificada durante la inmovilización. El pH óptimo en el sistema inmovilizado

se ve un poco desplazado hacia la acidez, ya que la enzima en células sin inmovilizar presentan un pH óptimo de 8.5, parece ser que en este caso el microambiente afecta a la enzima y este es ácido ya que la inmovilización se lleva a cabo a pH de 3.5 y 4. Habiendo protones en el ambiente.

Un punto importante en la reacción de hidrólisis es el mantener el pH en 8 unidades ya que la conversión a 6-APA puede ser de un 30% menor sino se controla.

Los reactores probados para realizar la reacción de hidrólisis con la enzima en células de E. coli inmovilizadas en colágena fueron un tanque agitado y una columna con recirculación. Estos reactores se eligieron, primero porque en ellos se controla fácilmente el pH de la reacción y segundo porque en la reacción de hidrólisis que cataliza la penicilino amidasa proveniente de E. coli (específicamente en células de E. coli ATCC 9637), se observa inhibición por la penicilina (K_i de 0.4 683 M) inhibición competitiva por el ácido fenilacético (K_i AFA de 1.1×10^{-3} M) e inhibición no competitiva por el 6-APA (K_i de 6/APA de 7.2×10^{-3} , datos obtenidos en el laboratorio (62), así tenemos que el tanque agitado aminora los problemas de inhibición por sustrato ya que este, luego, luego es convertido al producto o(s) deseados, mientras que para la inhibición por producto se recomienda una columna continua; sin embargo, en este tipo de reactor un grave problema que se presenta es el control de pH, por lo que se optó por una columna con recirculación.

En el tanque agitado se obtiene una productividad específica de 284.38 μ M de 6-APA/g de catalizador en 1 hora y un 42% de conversión con 20 g/l de penicilina, pero presenta el inconveniente de que se tienen

que cubrir las propelas del tanque para que el catalizador no se dañe. En la columna con recirculación se obtienen una productividad específica de 119/25 μM 6-APA/g de catalizador por hora, y un 43% de conversión con 20 g/l de penicilina, en este reactor no se daña el catalizador. Como se puede observar no importa el tipo de reactor que se utilice, la conversión a la que se llega es de un 43% con 20 g/l de penicilina y este es el problema principal para la enzima inmovilizada en colágena, tal parece que la penicilino amidasa se ve afectada por el pH en el que se encuentra inmovilizada y esto se palpa mejor en los experimentos de almacenamiento del catalizador ya que éste no importa la temperatura en que se almacene (4°C, 37°C o ambiente) al mes pierde el 70% de su actividad inicial.

Así los bajos rendimientos y estabilidad de almacenamiento nos llevaron a buscar otra matriz en donde inmovilizar las células de E. coli con actividad enzimática de la penicilino amidasa. Así fue como se eligió a la carragenina como una segunda opción para nuestro sistema. Este soporte se eligió por su disponibilidad en el comercio, b) el método de inmovilización y c) las condiciones de inmovilización.

Después de optimizar las condiciones de inmovilización para nuestro sistema logramos atrapar 1 g de células de E. coli (peso seco) en 1 g de carragenina, esta capacidad de atrapamiento es 4 veces menor que la informada por Chibata (53), ya que él lograr inmovilizar 16 g de células de E. coli o enzima en 4 gramos de carragenina. Tal vez esto se deba al tiempo de mezclado de las células con la carragenina a 50°C, ya que en nuestro caso se dan de 10 a 20 minutos suficientes para homogenizar la mez

cla, pero no más tiempo porque la enzima se vería afectada por el calor, el curtido se hace con 2% P/V de glutaraldehído en 30 minutos, en estas condiciones de inmovilización la enzima retiene de un 50 a 60% de su actividad y el catalizador resultante presenta una resistencia a una agitación rotatoria de 120 rpm por 24 horas a 29°C y se conserva el 100% de su actividad inicial después de 4 meses de almacenamiento a 4°C en KCl 0.3 M.

La enzima presenta una máxima actividad a un pH de 8.0 y a una temperatura de 55°C, estos valores son los mismos que para la enzima en células libres, lo que muestra que la enzima no sufre ninguna modificación al inmovilizarse ni se ve afectada por el microambiente al estar en el soporte. Los reactores utilizados para la reacción de hidrólisis con carragenina fueron al igual que para colágena un tanque agitado y una columna con recirculación. En ambos reactores no se observa que al aumentar la concentración de sustrato disminuya la velocidad inicial de la reacción de sustrato no influye en la velocidad de reacción en la cantidad de catalizador utilizado. Al igual que para colágena la productividad específica fué mayor en el tanque agitado, siendo esta de 507 μM de 6-APA/g de catalizador/hora, mientras que en la columna fué de 356.36. En el tanque agitado el catalizador se daña por la agitación. Con respecto a la mejor productividad específica en el tanque agitado podemos decir que esto se debe a que en este reactor existen menores problemas de transferencia de masa ya que en el sistema hubo agitación tanto por propela como por aire burbujeado haciendo un tanque perfectamente mezclado, seguramente que también se aminorará el problema de la inhibición por sustrato, pero

esto no fué determinante ya que tanto en los reactores por columna como en el tanque el aumentar la concentración de sustrato no afecta la velocidad inicial de la reacción. En ambos reactores se llega a un máximo de producción y la reacción se detiene no hay mayor conversión aunque no se haya -- llegado al 100% de ésta, en este fenómeno está tanto el problema de la inhi-- bición por productos y esta depende básicamente de la actividad enzimática específica del catalizador y a la cantidad de éste en el reactor.

La siguiente etapa en el proyecto fué escalar el proceso a nivel de planta piloto, para ello se eligieron las condiciones óptimas encontradas y desarrolladas en cada una de las áreas planteadas para llegar a -- este objetivo; así la producción de la enzima se realizó en una fermenta-- ción batch (de lote) en medio mínimo con 2 g/l de APA como inductor y fuente de carbono y 0.8 g/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. La reacción de hidrólisis se realizó en una columna batch con recirculación, con penicil-- lino amidasa en células de E. coli inmovilizados en carragenina a pH de -- 8.0 y temperatura de 40°C. En los experimentos en la planta piloto se observa: lo.) que las materias primas grado industrial utilizadas tanto en la fermentación, producción del catalizador y reacción de hidrólisis no -- afectan el proceso, la única materia prima importante que no eran grado -- industrial son el glutaraldehido y la etilenamina para el curtido del cata^a lizador, dato que habrá que rectificar con reactivos grado industrial ya -- que estos grado analítico son muy costosos.

2. Los resultados obtenidos en la planta piloto confirman el trabajo realizados en el laboratorio, esto es: a) el crecimiento de la -- cepa de E. coli y producción de la enzima en un medio mínimo; fueron muy --

similares a los obtenidos en el laboratorio, la actividad enzimática específica obtenida fué de 3.67 y 1.1 mientras que las actividades obtenidas en el laboratorio fueron de 3 a 5 unidades, los rendimientos celulares -- en la planta piloto fueron del 80% de los obtenidos en este.

b) En la reacción de hidrólisis se observa que un problema fundamental es la inhibición por los productos, ya que al igual que en el laboratorio la reacción se detiene después de alcanzar un máximo de conversión. Sin embargo, en el laboratorio se alcanza una productividad específica de 356.36 μM de 6-APA/g de catalizador/hora mientras que en la planta piloto ésta es de 174 μM de 6-APA/g de catalizador/hora, esto, como ya se mencionó anteriormente posiblemente se debió a que el catalizador utilizado tenía 2.75 veces menor actividad que el producido en el laboratorio. Durante operación del reactor no se observa que el catalizador sufra ningún daño por el flujo utilizado, ni contaminación, ni empacamiento.

3. Para el mejoramiento del proceso es necesario, determinar la concentración óptima de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, hacer experimentos de estabilidad, de almacenamiento tanto de la enzima como de la viabilidad de las células en el medio de cultivo a diferentes temperaturas, medir la productividad de la enzima, en catalizadores de diferentes tamaños y cilíndricos para evitar problemas de transferencia de masa y dar un curtido más eficiente al catalizador. Probar la alternativa de la utilización de un sistema de columnas, con diferentes tiempos de residencia, para aminorar los problemas de inhibición por producto. Con es--

tas modificaciones en el catalizador y en el reactor y la producción de 6-APA obtenida se determinará la concentración de substrato con el que se trabaje, ésta tendrá que ser aquella en la cual se obtenga un mínimo de 20 g/l de 6-APA para lograr rendimientos y pureza adecuadas en el proceso de purificación del 6-APA, pero siempre considerando que esta concentración se logre con el mínimo de penicilina ya que ésta tiene aproximadamente un 66% de incidencia en el costo del proceso.

4. Se encuentra que las limitaciones en el proceso fueron esencialmente de equipo disponible para experimentos de esta capacidad, principalmente en lo que respecta a la fabricación del catalizador. Se sugiere que esto se lleve a cabo en una columna enchaquetada (Figura 8.2); para mantener una temperatura de 45°C en donde se puedan mezclar las células con la suspensión de carragenina. Esta columna deberá tener en la parte inferior unos orificios cilíndricos de 0.5 cm o menores, unas cuchillas giratorias para cortar el catalizador y un recipiente con enfriamiento (Salmuera) en donde se coloque el KCl y se mantenga frío para recibir el catalizador ya cortado. En la parte superior de la columna se colocará un pistón que comprima la mezcla de células carragenina.

Para la fermentación son suficientes matraces de 1 litro, 1 tanque de 10 litros y una de 100 litros para posteriormente pasar a tanques mayores.

Por los problemas del control de pH e inhibición por substratos y productos en la reacción de hidrólisis se recomienda un sistema de columnas en donde se añada el substrato y se mantenga el pH entre columna

y columna, estas columnas tendrán en su interior una entrada de aire para fluidificar lo suficiente el sistema para que haya una mayor superficie de contacto sin causar problemas por la inhibición por producto.

Sin embargo este punto será totalmente aclarado cuando se midan e investiguen los parámetros cinéticos que rigen a la enzima en células inmovilizadas elaborar la ecuación de velocidad para la hidrólisis enzimática de la penicilina, hacer cálculos teóricos en la ecuación para un tanque agitado (considerando que el reactor utilizado en la planta piloto tiene este comportamiento) rectificar si los resultados concuerdan con los obtenidos en la planta piloto y hacer el cálculo teórico para las columnas en serie y hacer una comparación con el tanque agitado. Como antecedente cabe señalar que ya ha sido elaborada la ecuación de velocidad en la enzima en células de E. coli en el laboratorio, con resultados muy cercanos a los obtenidos en el laboratorio (Figuras 8.3, 8.4) (62); esta ecuación no es de la forma de Michaelis Menten, y la solución de una ecuación ya sea la que describe el comportamiento de un tanque agitado o la de una columna no resulta sencillo.

5. Las condiciones mínimas de seguridad requeridas en una planta piloto para la producción del 6-APA son:

- a) En el área de la producción de la penicilino amidasa en cepas de E. coli. Deberán estar comunicados los tanques y la centrífuga en donde se cosechen las células, para una mejor esterilización y menor contaminación del recinto con cepas de E. coli que contamina fácilmente y puede perjudicar la salud de los operarios.

- b) Una planta de energía eléctrica propia ya que la interrupción de ésta en el proceso le daña considerablemente.
- c) Una área específica para el proceso de separación y purificación del 6-APA, con equipo adecuado para la utilización de solventes.

6. El personal que opere la planta no necesita tener estudios especializados y éste podrá obtener un adiestramiento previo, y tendrá que ser dirigido por individuos que conozcan cada una de las áreas - (microbiólogos, químicos e ingenieros químicos).

7. En el proceso a nivel de la planta piloto se obtuvo suficiente ácido 6-aminopenicilánico como para poder realizar un estudio preliminar de la viabilidad económica del proceso (Estudio realizado en el laboratorio por el Ing. Enrique Galindo) tomando como bases: (63).

- a) Catalizador: células de E. coli inmovilizadas en carragenina
- b) Escalamiento: a partir de los datos obtenidos de la planta piloto y algunos estudios del laboratorio.
- c) Producción de 10 ton de 6-APA al año
- d) Los precios de las materias primas se concideran los utilizados en la planta piloto
- e) Depreciación lineal a 10 años
- f) Gastos financieros; 14% interéses sobre el 75% de la inversión fija.
- g) Planta independiente para la producción del biocatalizador que podrá elaborar hasta 850 Kg/año. Esto es 413% de los requerimientos de la planta de hidrólisis.

En el estudio se observa que el proceso es económicamente viable y competitivo con los costos de la vía química tradicional ya que el costo del Kg de 6-APA producido por vía enzimática es de \$ 1,544 pesos, mientras que 1 Kg por la vía química es de \$ 1,857.00.

En conjunto los resultados obtenidos en la planta piloto nos muestran:

1. Que el proceso elaborado en el laboratorio, para la producción del ácido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de la penicilina-G, es técnicamente viable a nivel de producción. Su elaboración no implica instalaciones especiales ni personal especializado, su operación es simple, las materias primas requeridas están disponibles en el país; y no necesita de una ubicación en especial.
2. Que la producción del 6-APA por vía enzimática compite económicamente con el proceso químico para la producción del ácido, lo que que lo convierte en una posible tecnología económicamente viable, cabe señalar que ésta es totalmente factible de mejorar, ya que el estudio económico se basó en los datos aportados por la planta piloto, y dicho experimento se realizó en instalaciones no destinadas para ello, por lo que el costo de muchos servicios y materias primas así como el tiempo invertido para su elaboración fueron altas.
3. Que la interacción de diferentes disciplinas unidas en un objetivo común, es necesario para el desarrollo de diferentes procesos que puedan ser aplicados dando un beneficio a la sociedad.
4. Que el trabajo realizado en los centros de investigación, brinda un apoyo fundamental para el desarrollo y mejoramiento de tecnologías propias, colaborando de esta forma con la independencia tecnológica necesaria para el progreso del país.

TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 3.1 ESQUEMA DE LOS REACTORES ENZIMATICOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

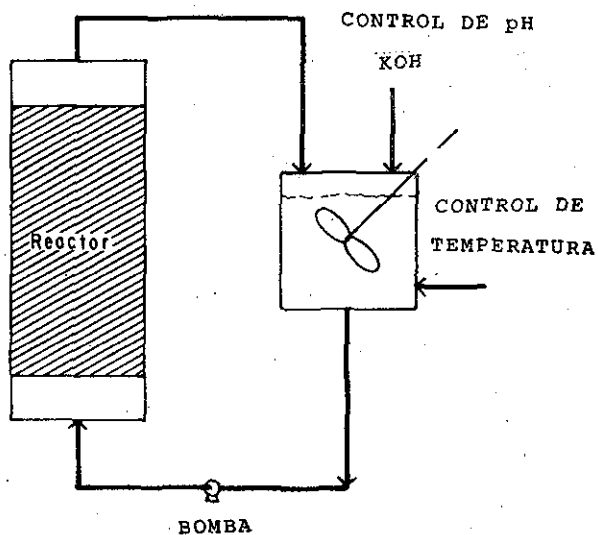


FIGURA 3.2 REACTOR ENZIMÁTICO EN PLANTA PILOTO

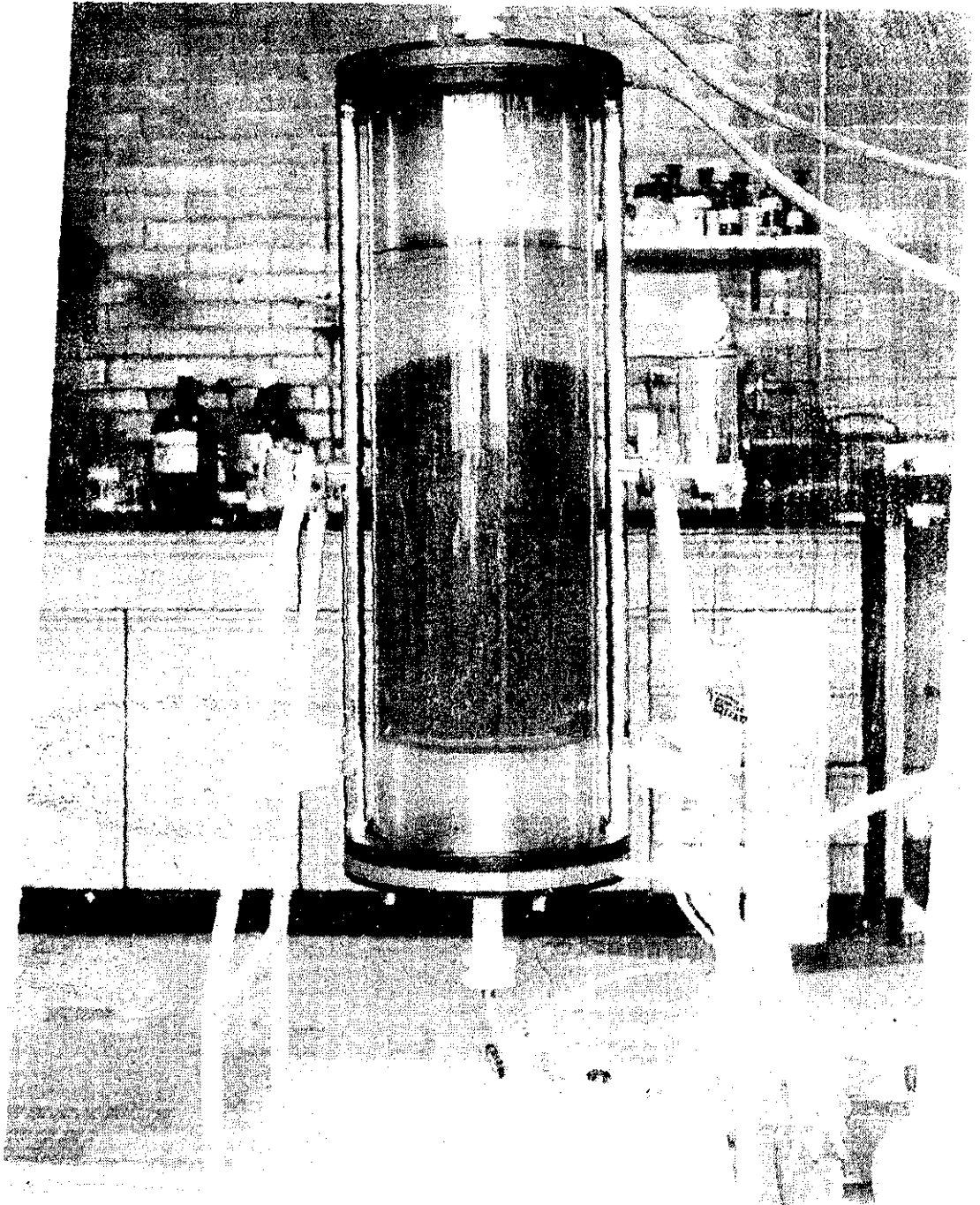


TABLA 4.1 PRODUCCION DE P.A. EN CELULAS DE E. coli CRECIDAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo	Unidades Klett (60 min.)		Actividad enzimática uM 6-APA/mg Prot celu lar en 2 hrs.
	0.0 hrs.	2.30 hrs. - 3.30	
M ₉ (glucosa)	29	52 80	0.271
M ₉ (glicerol)	29	35 37 toda la noche 197	0.34
MM	29	61	0.2
Luria	20	194	0.80709
Glutámico	20	62 115	0.271

Se creció E. coli 9637 en medio luria durante toda la noche, se diluyó el crecimiento 1:20 en los siguientes medios de cultivo (tiempo cero): M₉ con glucosa como fuente de carbono, M₉ con glicerol como fuente de carbono, medio luria y glutámico. Una vez alcanzadas 100 unidades -- Klett de crecimiento, se determinó actividad enzimática y proteína por los métodos descritos en metodología general y se calculo la actividad específica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 4.2 ACTIVIDAD DE PENICILINO-AMIDASA EN CEPAS DE E. coli CRECIDAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

Concentraciones de glucosa g/l	Actividad específica
2	0.21
1	0.92
0	0.835

" uM 6-APA/mgr Proteína en 2 horas a 37°C

Se creció E. coli 9637, en un medio completo con ausencia de leucina de Difco (Leucina Assay Medium), buffer NN, 0.2% P/V de ácido fenilacético, concentraciones de glucosa de 0, 1, y 2 g/l, a 29°C durante toda la noche, se cosecho, midió actividad enzimática y proteína por los métodos descritos en metodología general.

TABLA 4.3 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PENICILINO-AMIDASA EN DIFERENTES CEPAS DE E. coli.

Cepa	Actividad específica
ATCC 9637	2.0
ATCC 9637B	4.7
ATCC 11105	6.2

Actividad en μM 6-APA/g proteína en 2 horas.

Se crecieron las cepas de E. coli 9637, 9637B, 11105, en medio luria -- con 0.2% P/V de ácido fenilacético a 29°C durante toda la noche se cosecharon y se les midió actividad enzimática y proteína como se describe en materiales y métodos, las muestras se procesaron por duplicado -- presentandose el promedio de los resultados.

TABLA 4.4 EFECTO DEL CAMBIO DE TEMPERATURA, ADICION DE INDUCTOR Y AERACION EN LA PRODUCCION DE PENICILINA AMIDASA Y CRECIMIENTO E. coli (11105)

Temperatura inicial (°C)	Volumen inicial de medio luria (ml.)	Cambio de temperatura a las 4 hrs.	Adición al medio a las 4 hrs. (ml.)	Actividad esp. uM 6-APA/mg Prot.	Masa celular g/l
1. 37	50	-----	-----	0.4	1.96
2. 37	50 + 0.2% FA	-----	-----	1.27	1.87
3. 37	25	-----	25 + 0.2% FA	0.67	3.12
4. 37	25	29°C	25 + 0.2% FA	1.61	1.87
5. 29	50	-----	-----	0.77	1.90
6. 29	50 + 0.2% FA	-----	-----	2.90	1.60
7. 29	25	-----	25 + 0.2% FA	1.66	1.90

Se cultivaron células de E. coli 11105 en matraces Erlenmeyer con 25 y 50 ml. de medio luria, presencia y ausencia de ácido fenil acético a 29 y 37°C, con agitación de 120 rpm. A las 4 horas se hizo cambio de temperatura y se añadió ácido fenil acético para tener una concentración final de 0.2% se dejó crecer las células hasta completar 24 horas. Se cosecharon las células, se determinó actividad enzimática y proteina por los métodos descritos en metodología general. Los resultados que se muestran es el promedio de los experimentos realizados por duplicado. El inóculo fue igual para todos y consistió en 2 ml. de células de E. coli crecidas en medio luria a 29°C durante toda la noche con agitación.

TABLA 4.5 EFECTO DEL ACIDO GLUTAMICO EN LA PRODUCCION DE LA PENICILINO-AMIDASA Y EL CRECIMIENTO DE E. coli

Acido glutámico % P/V	Actividad esp.*	Peso seco g/l
0	1.05	1.12
1	0.99	1.17
2	1.24	1.87
3	1.8	1.17

* Actividad esp. = uM 6-APA/mg-prot. en 30 min a 40°C

Las células de E. coli 11105 se crecieron en 50 ml de medio luria, 0.2% de ácido fenilacético y concentraciones de ácido glutámico en % P/V de 0, 1, 2 y 3. Con agitación rotatoria, a 29°C durante toda la noche. El móculo consistió en 5 ml de células crecidas durante toda la noche en medio mínimo a 37°C con agitación. Una vez crecidas las células se cosecharon, se midió actividad enzimática, proteína y peso seco por los métodos descritos en metodología general. Todos los experimentos fueron hechos por duplicado, en la tabla se muestra el promedio de éstos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 4.5 PRODUCCION DE LA PENICILINO-AMIDASA EN CELULAS DE E. coli --
 CULTIVADAS EN UN CULTIVO EN LOTE PETROALIMENTADO

Tiempo de iniciada la fer- mentación con adición de medio fresco cada 24 hrs.	pH inicial	pH final	Actividad esp. uM 6-APA/mg -- Prot. 30' a 40°C
24	----	----	1.15
70	6.81	8.32	0.68
94	6.99	7.96	0.73
118	7.07	8.30	0.56
142	7.01	8.53	0.37
166	6.98,	8.49	0.47
233	7.0	8.61	0.45
257	7.07	8.52	0.25
281	6.99	8.47	0.26
205	7.01	8.49	0.13
329	7.05	8.35	0.07

Las células de E. coli 11105 se cultivaron en un fermentador de 14 l. con 8 litros de medio luria, 0.2% de ácido fenilacético, 29°C, 300 rpm luum de aereación. Cada 24 horas se vacía el cultivo, dejando 500 ml de inóculo, y adicionando 7.5 l de medio luria con ácido fenilacético. Se determinó el pH inicial y final en cada lote, así como su activi--dad enzimática y proteína con los métodos descritos en metodología --general.

TABLE 4.7 PRODUCCION DE PENICILINO-AMIDASA Y CRECIMIENTO DE E. coli EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y NITROGENO

Fuente de carbono (g/l)	Fuente de nitrógeno g/l	CreCIMIENTO	Actividad esp.	Masa celular* g/l
Sacarosa 2, 4, 6, 8	NH ₄ Cl 8	-	-	-
Sacarosa 8	NH ₄ Cl 8	+	0.5	1.68
Sacarosa 16	NH ₄ Cl 8	+	0.29	1.44
Sacarosa 18	NH ₄ Cl 8	+	0.27	2.4
Sacarosa 20	NH ₄ Cl 8	+	0.23	1.4
Sacarosa 8	NH ₄ Cl, licor de maíz (20,40,60,80)	-	-	-
Sacarosa 8	NH ₄ Cl, extracto levadura 10	+	0.57	2
Sacarosa 8	NH ₄ Cl, extracto levadura 20	+	0.36	2.48

En todos los experimentos el inóculo consistió en 5 ml medio mínimo crecido a 37°C, con agitación durante toda la noche.

Para los experimentos realizados con sacarosa y NH₄Cl, se cultivaron células de E. coli 11105 en matraces Erlenmeyer con 25 ml de NN, sacarosa y NH₄Cl a las 24 horas se añadieron 25 ml de medio y ácido fenilacético para tener una concentración final de ácido de 0.2% P/V a 29°C, con agitación se cosecharon a las 48 horas y se determinó actividad enzimática y proteína.

Para los experimentos realizados con licor de maíz, se cultivaron las células de E. coli 11105 con ácido fenilacético inicial, sin él, con volumen inicial de 25 y 50 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 125 ml a 29°C con agitación durante 48 horas.

TABLA 4.8 EL ACIDO FENILACETICO COMO FUENTE DE CARBONO E INDUCTOR EN EL CRECIMIENTO DE E. coli Y PRODUCCION DE LA PENICILINO-AMIDASA

CEPA	% AFA	Temperatura de crecimiento en °C	Crecimiento en D.O. (540) a través del tiempo			
			0.0 hr.	3.5 hr.	23 hr	48 hr
RR11	0.1	29	0.72	0.06	0.07	0.2
RRI	0.2	29	0.05	0.04	0.06	0.16
RRI	0.4	29	0.06	0.05	0.06	0.01
RRI	0.1	37	0.07	0.06	0.065	0.27
RRI	0.2	37	0.06	0.05	0.05	0.2
RRI	0.4	37	0.06	0.05	0.05	0.2
9637	0.1	29	0.07	0.06	1.5	
9637	0.2	29	0.12	0.1	1.5	
9637	0.4	29	0.022	0.02	0.16	
9637	0.1	37	0.08	0.075	1.5	
9637	0.2	37	0.03	0.025	0.95	
9637	0.4	37	0.042	0.04	0.8	

Se crecieron las cepas de E. coli 9637 y RRI K12 en 10 ml. de medio mínimo con NH_4Cl como fuente de nitrógeno y concentraciones de -- ácido fenilacético de 0.1, 0.2, 0.4% P/V como fuente de carbono a - 29 y 37°C, con agitación rotatoria, en matraces nefelométricos de - 125 ml. Se midió densidad óptica a 540 um a los 3.5, 23 y 48 horas. El inóculo provino de una dilución 1:20 de células de E. coli crecidas en medio mínimo con glucosa y NH_4Cl crecidas a 37°C, durante 24 horas.

TABLA 4.9 CRECIMIENTO DE E. coli EN FENILACETAMIDA

Fuente de carbono en el inóculo	D.O a 540 nm.	
	o horas	24 horas
AFA	0.06	1.0
Glucosa	0.1	0.1

Se crecieron cepas de E. coli ATCC 9637 y RRI en un medio mínimo con 1g/l de glucosa, y 1g/l de AFA durante toda la noche, se tomaron 5 ml se lavaron y se crecieron en 20 ml de un medio mínimo con fenilacetamida como -- único puente de carbono y nitrógeno. Se midió D.O a 540 nm.

TABLA 4.10 CRECIMIENTO DE E. coli CON ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PENICILINO-AMIDASA, EN DIFERENTES AMINOACIDOS COMO FUENTE DE NITROGENO

Fuente de nitrógeno	D.O. (550 mm.) 0 hrs.	A través del tiempo	
		23 hrs.	45 hrs.
Leucina	0.23	0.13	0.08
Arginina	0.21		
Acido glutámico	0.19	1.2	
Histidina	0.12	0.6	0.34
Prolina	0.20		

La cepa E. coli 9637 se cultivó en 10 ml. de medio mínimo con 2 g/l de glucosa como fuente de carbono y 2 g/l de -- cada aminoácido, en matraces nefelométricos de 125 ml, a 37°C con agitación rotatoria.

El inóculo provino de una dilución 1:20 de un cultivo crecido durante toda la noche en medio mínimo con glucosa y NH_4Cl como fuentes de carbono y nitrógeno.

TABLA 4.11 PRODUCCION DE PENICILINO-AMIDASA EN DIFERENTES AMINOACIDOS COMO FUENTE DE CARBONO

Fuente de nitrógeno	Fuente de carbono	
	Actividad específica	
	AFA	Glucosa
NH ₄ Cl	1.98*	0.33
Prolina	1.47	0.91
Arginina	1.51	0.67
Acido glutámico	1.28	0.71

* Actividad específica = μ M 6-APA/mg proteína -- 30 min 40°C

Se crecieron cepas de *E. coli* 9637 en 10 ml de medio mínimo con 1 g/l de glucosa ó 1 g/l de ácido fenilacético y 2 g/l de las diferentes fuentes de nitrógeno (ácido glutámico, prolina, arginina) y 0.8 g/l de NH₄Cl, en matraces nefelométricos de 125 ml, a 29°C con afitación rotatoria. El inóculo provino de una dilución 1:20 de un cultivo crecido durante toda la noche a 37°C en medio mínimo con NH₄Cl y glucosa como fuentes de nitrógeno y de carbono.

Las cepas se crecieron durante 24 horas, se centrifugaron, se determinó actividad enzimática y proteína como se describe en metodología general.

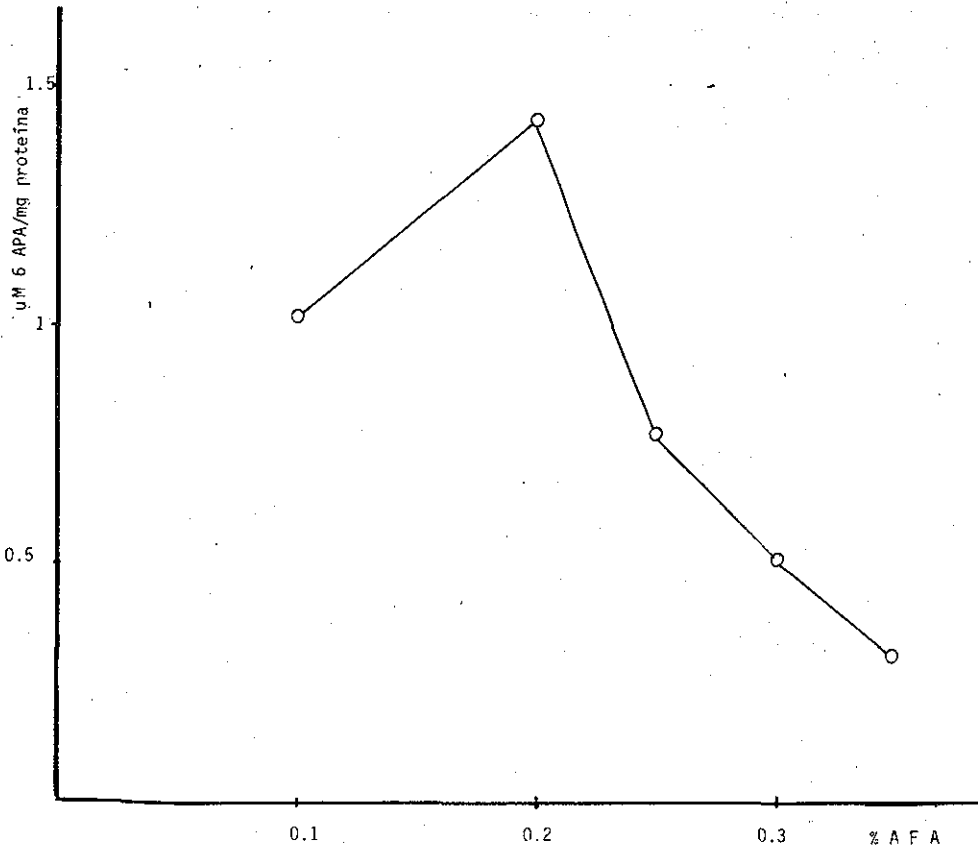
TABLA 4.12 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFATOS EN LA PRODUCCION DE E. coli 9637

Concentración de KH_2PO_4 g/l	D.O. (540 nm)			Actividad específica*	
	0 hrs.	17 hrs.	23 hrs.	23 hrs.	39 hrs.
1.4	0.15	0.49	0.77	1.97	3.34
3.5	0.15	0.16	0.18		
7.0	0.15	0.15	0.17		
13.6	0.15	0.16	0.16		

* Actividad específica = μM 6-APA/mg de proteína en 30 min. a 40°C

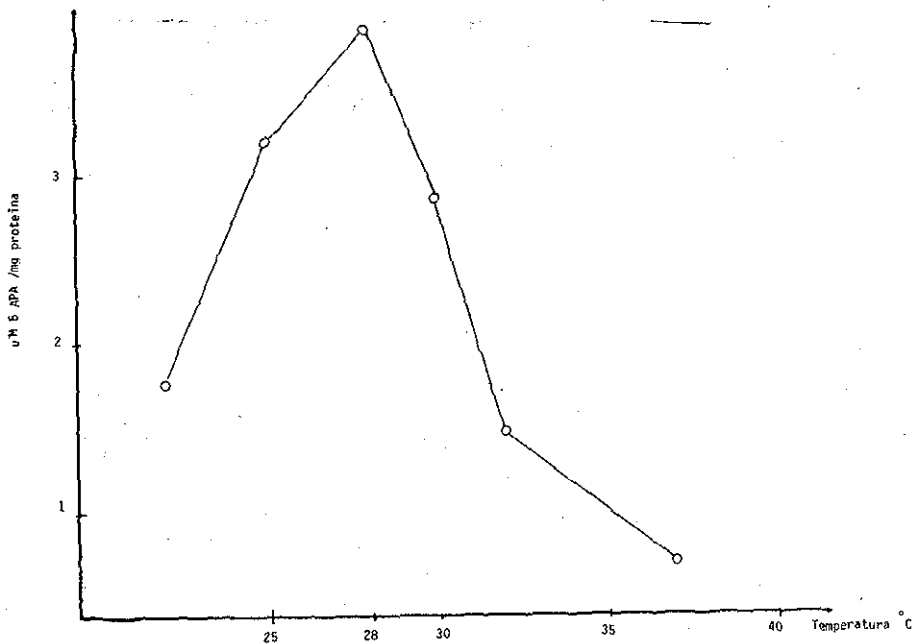
Se crecieron cepas de E. coli 9637 en matraces Erlenmeyer de -- 125 ml. con 50 ml de medio mínimo, 2 g/l de ácido fenilacético como fuente de carbono, 8 g/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno, con concentraciones de KH_2PO_4 en g/l de 1.4, 3.5, 7.0 y 13.6, a 29°C., -- con agitación rotatoria. El inóculo provino de cepas crecidas en el mismo medio con 13.6 g/l de KH_2PO_4 a 29°C. Se tomaron 5 ml de muestra, se les midió D.O. a 540, se centrifugaron y se les determinó actividad enzimática y proteína como se describe en metodología general. El experimento se hizo por duplicado, mostrándose el promedio de los resultados.

FIGURA 4.1 PRODUCCION DE PENICILINO AMIDASA EN CELULAS DE *E. coli* CRECIDAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACIDO FENIL ACETICO



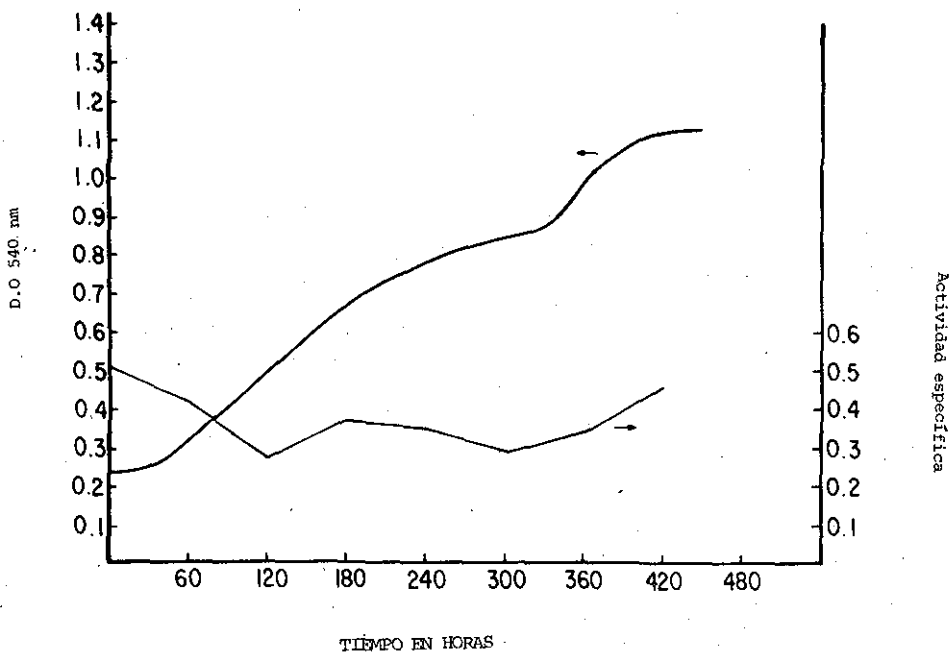
Células de la cepa de *E. coli* 9637 se crecieron en un medio luria a 28°C con concentraciones de ácido fenilacético de 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35% P/V. (El inóculo provino de una dilución de las bacterias crecidas en el mismo medio a 37°C) una vez crecidas las células se cosecharon, se les midió actividad enzimática y proteína por los métodos descritos en metodología general.

FIGURA 4.2 PRODUCCION DE PENICILINO AMIDASA EN CELULAS DE E. coli
CRECIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS



Células de la cepa E. coli 9637 se crecieron en medio luria con 0,2% P/V de ácido fólico a temperaturas de 22, 25, 29, 30, 32, 37°C. (El medio provino de una dilución de la bacteria 1:20 crecida en el mismo medio a 27°C). Una vez crecidas las células se procedió a cosechar, medir actividad enzimática y proteína por los métodos descritos en metodología general.

FIGURA 4.3 PRODUCCION DE PENICILINO AMIDASA EN CELULAS DE E. coli CRECIDAS EN MEDIO RICO



Se creció la cepa de E. coli 11105 en medio luria con 0.2% P/V de ácido fenilacético a 29°C con agitación, en matraces Erlenmeyer de --- 250 ml. con 100 ml. de medio.

El inóculo provino de la misma cepa crecida en las mismas condiciones durante toda la noche.

Se muestreó, y se determinó D.O. a 540 nm y actividad enzimática específica por la metodología descrita en materiales y métodos.

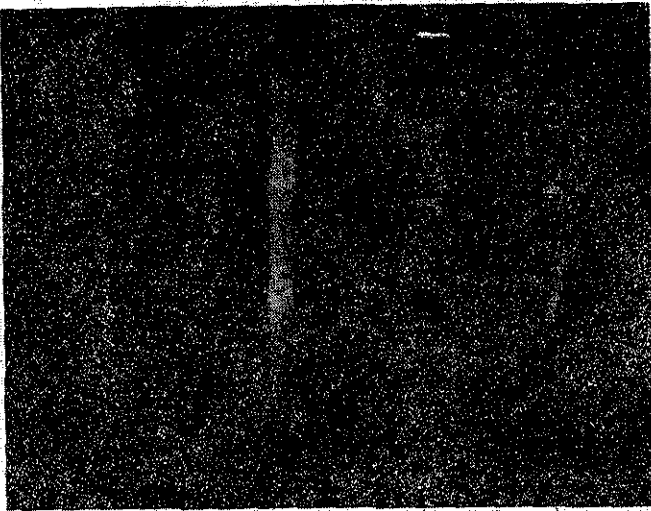
El experimento completo se realizó por triplicado, obteniéndose en --- cada uno de ellos resultados similares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 152 -

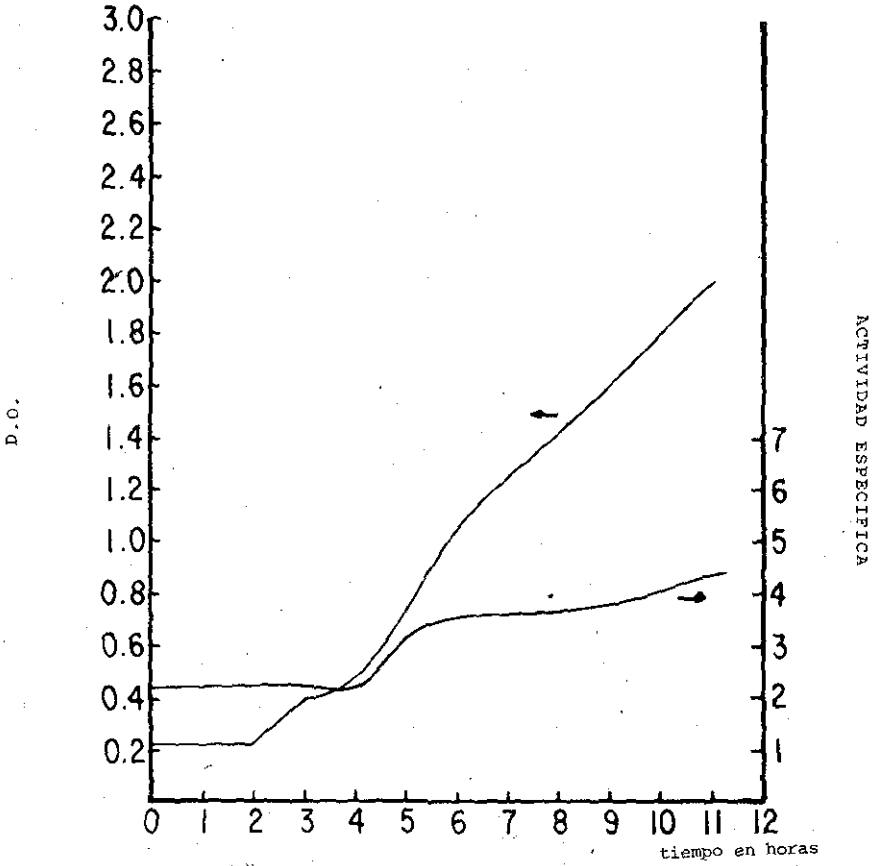
FIGURA 4.4 PRESENCIA DE UN PLASMIDO EN CEPAS DE E. coli PRODUCTORA DE
PENICILINO AMIDASA

E. coli ATCC 9637 1105



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 4.5 PRODUCCION DE LA PENICILINO AMIDASA EN CELULAS DE E. coli CRECIDAS EN MEDIO MINIMO



Se crecieron cepas de E. coli en un fermentador de 14 l. con 10 l. de medio mínimo con 0.2% de ácido fenilacético como fuente de carbono y 0.89/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno a 29°C con agitación y aereación. Se muestreó cada hora durante 12 horas y se determinó actividad enzimática - específica y D.O a 540 nm.

TABLA 5.1 INFLUENCIA DEL CURTIDO CON GLUTARALDEHIDO EN LA ESTABILIDAD DE MEMBRANAS DE COLAGENA CON CELULAS INMOVILIZADAS E. coli CON ACTIVIDAD DE PENICILINO AMIDASA.

Temperatura de almacenamiento °C	Vida media en días de membranas de colágena con células de <u>E. coli</u>	
	Sin curtir con glutaraldehido	Curtidas con glutaraldehido
4	28	40
29	23.9	40
37	19.5	40

Se inmovilizó penicilino amidasa unida a células de E. coli en colágena, como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Una parte del catalizador, se curtió con 0.5% de glutaraldehido durante 15 minutos, y la parte restante se dejó sin curtir. Se pesaron 0.1 g y se colocaron en tubos de ensaye con 5 ml de buffer de fosfatos 0.03M pH 8,0. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K a 45°C con 18 g/l de penicilina, durante 8 horas - después de las cuales se determinó el 6-APA producido, se lavó el catalizador y se almacenó a temperaturas de 4, 29 y 37°C, durante toda la noche. Esta rutina se realizó durante 50 días al cabo de las cuales se calculó la vida media del catalizador.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5.2 EFECTO DEL TIEMPO DE CURTIDO CON GLUTARALDEHIDO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PENICILINO AMIDASA EN CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA

Tiempo de curtido en minutos	Actividad enzimática inicial*
15	161.5
30	161.5
45	145.0

Actividad enzimática expresada como uM de 6-APA/g de catalizador durante 1 hora a 40°C, pH 8.0 sin agitación.

Se pesaron 0.1 g de catalizador, y se curtieron con glutaraldehido al 0.5% P/V a temperatura ambiente, durante 15, 30 y 45 minutos, se lavaron las membranas con agua destilada, y se colocaron con 5 ml. de buffer de fosfatos 0.03M pH 8.0, se añadió penicilina-G potásica (18 g/l) y se dejó reaccionado durante 1 hora a 40°C sin agitación. Se tomaron 0.2 ml. de muestra y se añadió la cantidad de ácido 6-aminopenicilánico.

TABLA 5.3 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA

Concentración de glutaraldehido % P/V	Actividad enzimática inicial	% de Actividad enzimática retenida a través del tiempo (días)**				
		5.6	7.3	8.3	12.3	13.2
2	268	75	66	66	66	66
1.5	251	64	49	49	56	50
1.0	357	60	49	49	49	45
0.5	304	68	57	57	56	52

* Actividad enzimática expresada como uM de 6-APA/g de soporte en 1 hora a 45°C, pH 8.0, 18 g/l de penicilina G-K.

La actividad enzimática se midió cada 24 horas, y las condiciones de reacción fueron las antes mencionadas, cada 24 horas se cambiaba la mezcla de reacción.

T
Se tomaron 0.09 - 0.1 g de membrana y se curtieron con concentraciones de glutaraldehido de 0.5, 1, 1.5 y 2% P/V, -- durante 30 minutos se lavaron con agua destilada y se colocaron en 5 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH de 8 con -- 18 g/l de penicilina G-K, a 45°C a la hora se tomaron 0.7 ml. de muestra y se midió la producción del ácido 6-aminopenicilánico por el método descrito en metodología general. Las muestras se dejaron reaccionando durante 13 días tomándose muestras cada 24 horas y cambiando la mezcla de reacción. Los experimentos se realizaron con controles de membranas en ausencia de penicilina, y la mezcla de reacción sin membranas, se trataron de la misma forma, que las muestras, no detectándose formación del ácido 6-aminopenicilánico.

TABLA 5.4 CAPACIDAD DE LA COLAGENA PARA ATRAPAR CELULAS DE E. coli CON ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PENICILINO AMIDASA

Relación en peso seco células/catalizador, (%)	Actividad enzimática* a través del tiempo (días)				
	1	2	5	6	8
33	918	1070	948	815	867
42	844	1008	929	797	853

* Actividad enzimática - uM de 6-APA/g de soporte en -- 24 h a 45°C

Se inmovilizo y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli en colágena como se describe en Materiales y Métodos en la sección de Ingeniería Enzimática, variando la relación de células con respecto al catalizador (colágena-células-penicilino amidasa), en un 33% 42% y 50%. Se pesaron 0.1 g de cada catalizador, y se colocaron en tubos de ensaye con 5 ml. de buffer de -- fosfatos 0.03M pH 8.0. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K, a temperatura de 45°C -- con 18g/l de penicilina. Se determino el 6-APA producido en 24 horas durante 8 días. El catalizador se -- lavo cada 24 horas con agua destilada.

Las determinaciones se hicieron por duplicado.

TABLA 5.5 ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA

Temperatura de almacenamiento	% de actividad enzimática** retenida a través del tiempo		
	15 días	1 mes	3 meses
4°C	99	35.7	31.6
Temperatura ambiente	75.5	33.4	34.5
37°C	79	29.4	22.7

* Almacenamiento de membranas secas

** Actividad medida a temperatura 40°C, pH 8 en 30 min.

Se pesaron 0.15 g de catalizador y se pusieron en 15 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH 8 en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. y se midió producción del ácido 6-aminopenicilánico por el método descrito en metodología general, a 40°C. Con una concentración de penicilina G-K de 18 g/l con agitación rotatoria durante 30 minutos, se lavo con agua destilada y se almaceno a temperaturas de 4, 37°C y temperatura ambiente, volviéndose a medir la actividad enzimática a los 15 días 1 y 3 meses desechándose las muestras -- después de cada determinación. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado mostrándose en la tabla el promedio de los resultados.

TABLA 5.6 INFLUENCIA DEL pH EN LA PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINO PENICILANICO

mM de Penicilina G-K	Producción de 6-APA sin control de pH (en uM)	Producción de 6-APA con control de pH (en uM)	2 - 1 uM de 6-APA
25	319	372	53
50	206	328	122
100	367	502	135
200	192.5	341.3	149

Se prepararon lotes de 0.5 g de catalizador (Enzima unida a células inmovilizadas en colágena) y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de buffer de fosfatos 0.03M, pH 8.0 y concentraciones de penicilina de 25, 50, 100 y 200 mM, con agitación magnética a temperatura de 45°C, se tomo muestra cada hora y se midió la producción de ácido 6-amino penicilánico, como se menciona en Metodología General en Materiales y Métodos, y pH, ajustándose éste a 8 unidades con sosa 0.1 M. a un grupo de matraces. El experimento se realizó por duplicado mostrándose en la tabla el promedio después de 6 horas de reacción y corrigiendo el volumen final por la adición de sosa.

TABLA 5.7 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA COLUMNA EMPACADA CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS INMOVILIZADAS EN COLAGENA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUBSTRATO

Concentración de Penicilina-G-K g/l	Tiempo en hrs.	Producción 6-APA (uM/ml)	% de conversión de 6-APA	Velocidad inicial (uM 6-APA/ml/hr.)
5	5	9.695	72	2.44
12	5	17.3	53.7	3.36
24	10	17.27	26.8	1.98
control			0.0	

Se empacó una columna de 1.6 cm de diámetro interno, 40 cm de altura y 40 ml de volumen, con 13.2 g de catalizador (peso seco), penicilinoamida-sa unida a células inmovilizadas en colágena). Cortando en cuadros de 1 cm x 1 cm. Se llevó a cabo la reacción de hidrólisis a un pH constante de 8, con 0.5 l de volumen, concentraciones de penicilina de 5, 12 y 24 g/l. Se tomó una muestra por duplicado durante cada hora, y se midió producción de ácido 6-aminopenicilánico como se describe en Metodología General en la sección de Materiales y Métodos. Se calculó el % de conversión con respecto a la penicilina en el reactor. El control consistió en una solución de penicilina sin catalizador, y el catalizador en buffer en ausencia de penicilina. En la Tabla se muestra el promedio de cada una de las corridas con diferente concentración de penicilina realizada por triplicado.

TABLA 5.8 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UN TANQUE AGITADO, EMPACADO CON PENICILINO AMIDASA UNIDO A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA

No. de experimento	uM 6-APA en el reactor en 8 hrs	% Conversión relativa	% Conversión de 6-APA
1	11375	100	42
2	10200	89.6	38
3	9380	82.0	35
4	8210	71.2	31

En un recipiente de 1 l. se empacó con 5 g de penicilino amida sa unida a células de E. coli inmovilizadas en colágena por el método descrito en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K para la producción de ácido 6-aminopenicilánico, con un volumen de 500 ml de buffer de fosfatos con una concentración de penicilina de 20 g/l a un pH constante de 8.0, y una temperatura de 45°C con agitación magnética. La reacción duró ocho horas tomándose muestras por duplicado durante cada hora, para la determinación del 6-APA. En la tabla se muestran el promedio de las determinaciones. Después de cada experimento se descargó el reactor y se lavó el catalizador con agua destilada.

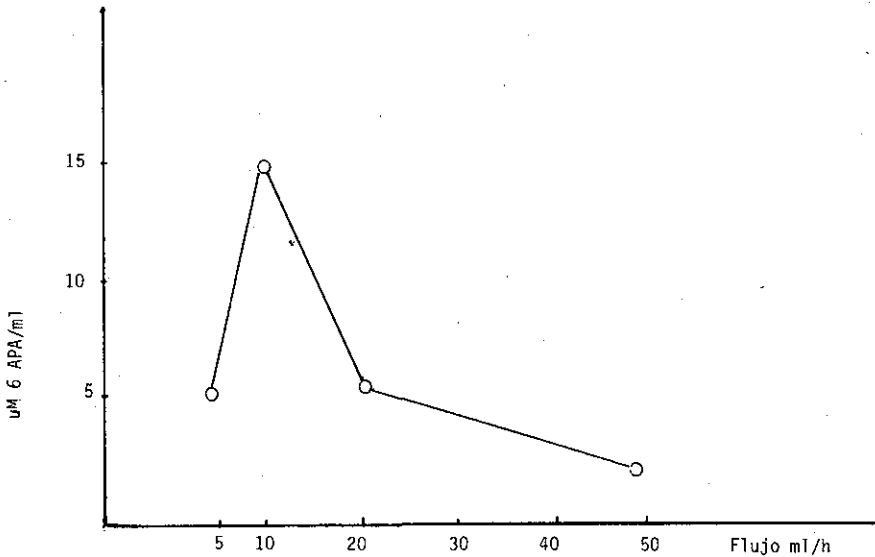
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5.9 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA COLUMNA CON RECIRCULACION EMPACADA CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS de E. coli INMOVILIZADAS EN MEMBRANAS DE COLAGENA

No. de experimento	um 6-APA en el reactor	% conversión	Tiempo en hrs.
1	8385	30.5	7
2	11150	41.4	8

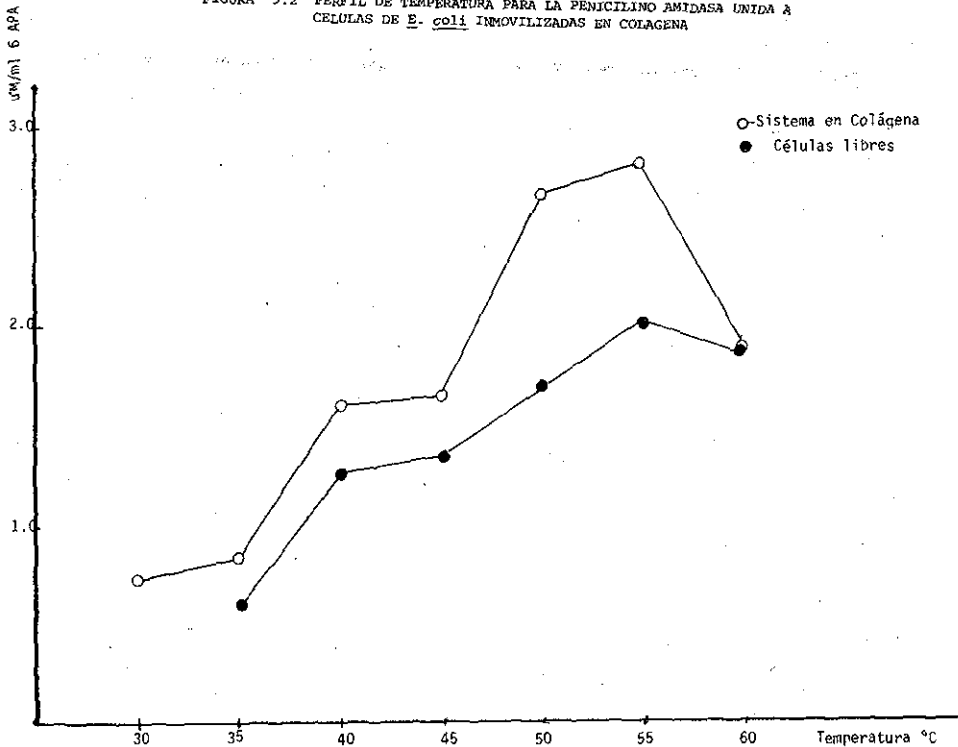
Una columna de farmacia modelo R-25 -26 con 2.5 cm de diámetro interno longitud de 400 cm., se empacó con 11.7 g de penicilino amidasa unida a células de E. coli inmovilizadas en colágena como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería enzimática. Se realizó la reacción de hidrólisis en buffer de fosfatos 0.03 M a pH de 8 constante, en un volumen de 500 ml, de los cuales 180 se encontraban en la columna y el resto en un recipiente conectado a ésta, ambos a temperatura de --45°C. Se tomaron muestras por duplicado durante cada hora para la determinación del 6-APA producido. En la tabla se muestra el promedio de las determinaciones. Después de cada experimento se descarga el reactor y se lava el catalizador.

FIGURA 5.1 INFLUENCIA DEL FLUJO EN LA PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINO PENICILANICO EN UNA COLUMNA CON RECIRCULACION, CON PENICILILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS INMOVILIZADAS EN COLAGENA



Se inmovilizó y se curtió, penicilino amidasa unida a células de *E. coli* en colágena, por el método descrito en Materiales y Métodos, en la sección de Ingeniería Enzimática. Se pesaron 6 g del catalizador y se introdujeron, enrollados, en una columna de vidrio con 5 cm de diámetro interno y 30 cm de largo. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K, a 45°C, con pH inicial de 8.0 en buffer de fosfatos 0.03M, una concentración de penicilina- de 20 g/l, volumen de 52 ml y flujos de 5, 11.4, 21.6 y 48.4 ml/h., durante 38 horas como máximo. Se muestreo durante cada hora para determinar la cantidad de 6-APA producida por la metodología descrita en Metodología General. La reacción se paró una vez que la producción de 6-APA comenzó a descender. En la figura se muestra la producción máxima alcanzada.

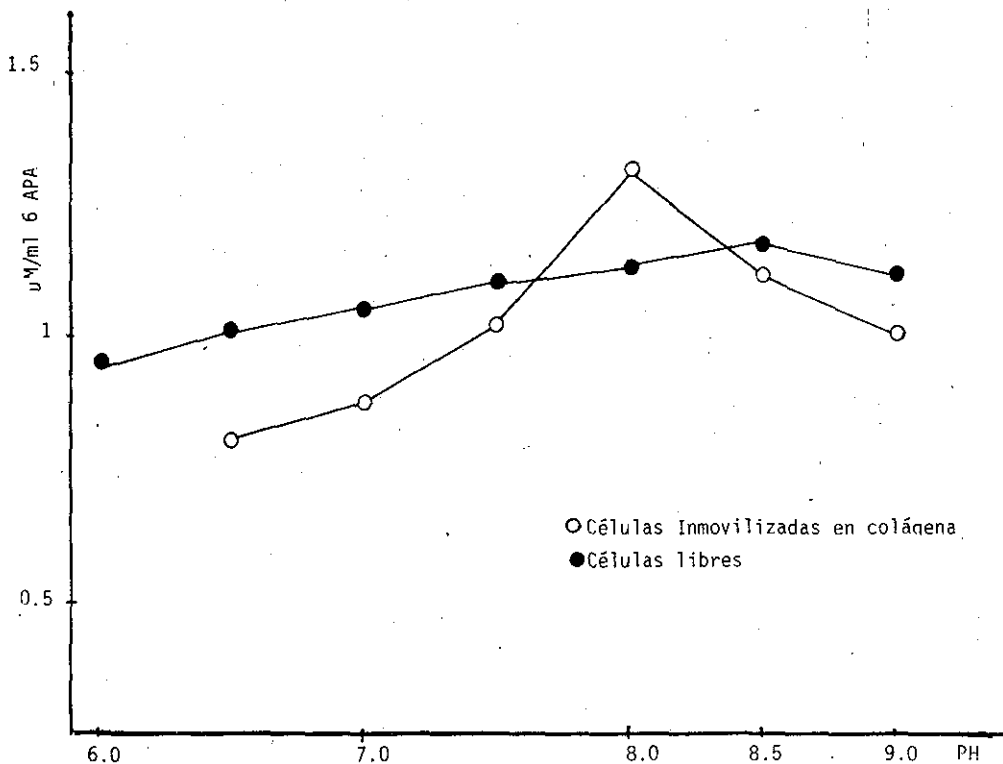
FIGURA 5.2 PERFIL DE TEMPERATURA PARA LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA



Se crecieron células de E. coli 11105 en 6l. de medio luria, se cosecharon y se resuspendieron en 100 ml de solución salina fisiológica, de esta solución se tomaron 1.5 ml y se llevó a un volumen de 5 ml con buffer de fosfato 0.03 M, pH 8.0 en matraces Erlenmeyer de 50 ml. Se inmovilizó y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli 11105 en colágena, como se menciona en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática, se pesaron 0.15 g del soporte seco y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 15 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH 8.0.

Tanto para las células sin inmovilizar como para las inmovilizadas se realizó la reacción de hidrólisis con 18 g/l de penicilina-G/K, agitación rotatoria de 100 rpm y temperaturas de 30, 35, 40, 50, 55 y 60°C en 30 min. Se determinó 6-APA. El experimento se realizó por duplicado, mostrándose en la figura el promedio de estos.

FIGURA 5.3 PERFIL DE pH PARA LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA



Se crecieron células de E. coli en 6 l. de medio Luria, se cosecharon y resuspendieron en 100 ml de solución salina fisiológica. De esta solución se tomaron 1.5 ml y se llevó a un volumen de 5 ml con buffer de fosfatos 0.03 M en un rango de pH de 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, y 9.0 en matraces Erlenmeyer de 50 ml. Se inmovilizó y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli 11105 en colágena, como se menciona en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Se pesaron 0.15 g de soporte seco y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 15 ml de buffer de fosfatos 0.03 M con un rango de pH de 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9. Para ambos sistemas se llevó a cabo la reacción de hidrólisis con 18 G/l de penicilina-G-K, agitación rotatoria de 100 rpm, temperatura de 40°C en 30 min. Se determinó la cantidad de 6-APA producido. El experimento se realizó por duplicado, mostrándose en la figura el promedio.

FIGURA 5.4 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA COLUMNA EMPACADA CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS INNOVATIVAS EN COLAGENA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUBSTRATO.

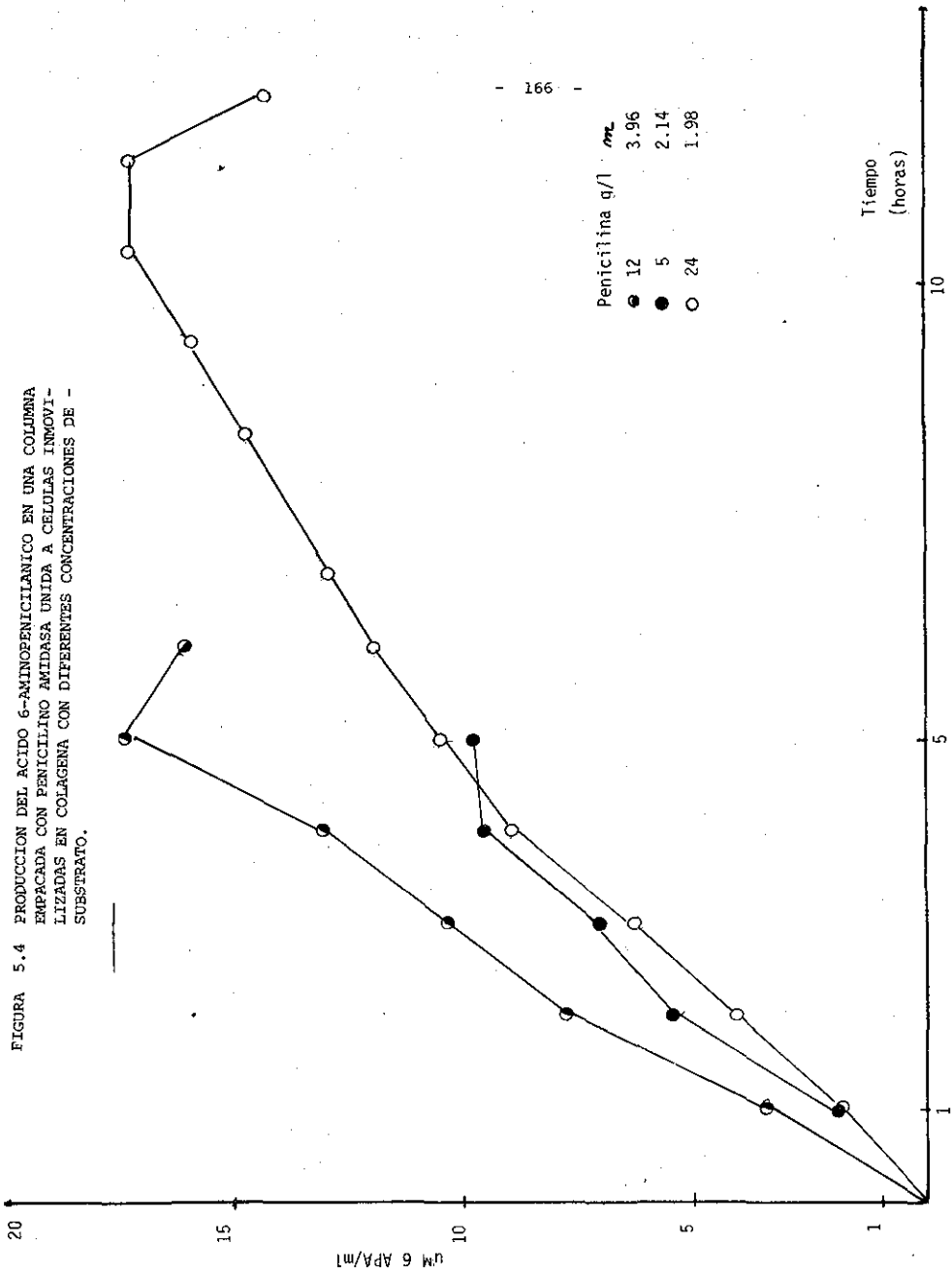
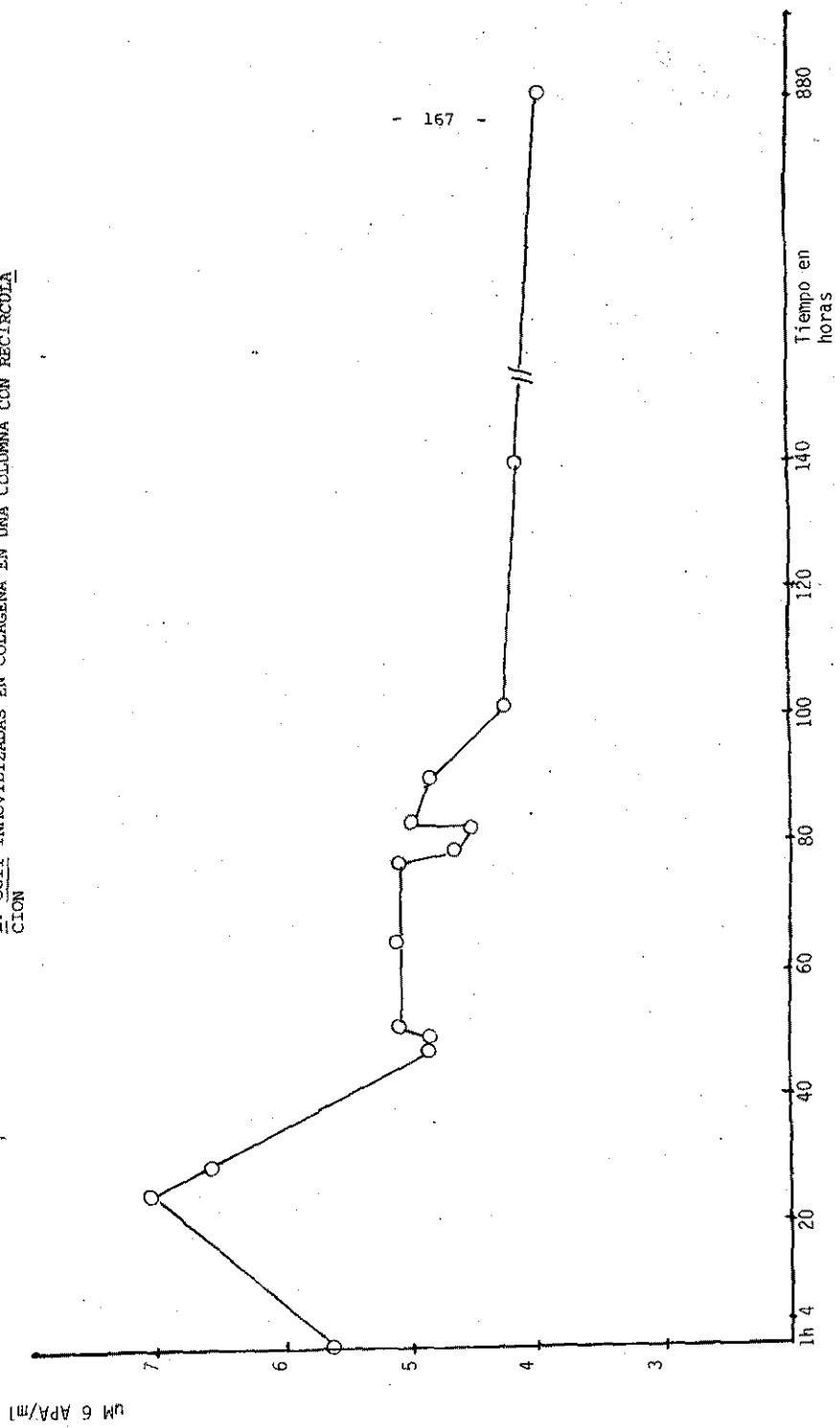


FIGURA 5.5 ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LA PENICILINA AMIDASA EN CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN COLAGENA EN UNA COLUMNA CON RECIRCULACION



167

Se empacó una columna de 80 ml de capacidad con penicilino amidasa en células de E. coli inmovilizadas en colágena. La reacción de hidrólisis se realizó a 45°C, pH de 8.1 y 7.5 g/l de penicilina con un flujo de 45 - 60 ml.

TABLA 6.1 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA

Concentración de glutaraldehido % P/V	Actividad enzimática de P. A.*
2.0	378
1.5	470
1.0	478
0.5	439

* Actividad expresada como uM de 6-APA/g de soporte en 30 minutos a 40°C.

Se inmovilizó la penicilino amidasa unida a células de E. coli como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería enzimática, el catalizador se cortó en cuadros de aproximadamente 0.5 cm X 0.5 cm. y se currieron variando la concentración de glutaraldehido en 0.5, 1.0, 1.5, y 2% P/V, se lavaron con KCl 0.3M hasta obtener una solución de lavado transparente. Se colocaron trozos de catalizador pesados, en matraces Erlenmeyer de 125 ml y se realizó la reacción de hidrólisis en 15 ml de buffer de fosfatos 0.03 M a pH de 8.0 inicial, 40°C, con agitación rotatoria de 100 rpm y 8 g/l de penicilina-G-K, durante 30 minutos. Se determinó la producción de 6-APA. - El experimento se realizó por duplicado mostrándose en la tabla el promedio de los resultados.

TABLA 6.2 RESISTENCIA A LA AGITACION DE LA CARRAGENINA CON CELULAS DE E. coli CON ACTIVIDAD DE PENICILINO AMIDASA

Relación en peso seco células/catalizador	Resistencia a la agitación
50%	+
66%	-
75%	-

Se inmovilizaron células de E. coli con actividad enzimática de penicilino amidasa, y se curtió como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. En la inmovilización se varió la relación células en peso seco y catalizador en un 50, 66 y 75%. Una vez curtido el catalizador se lavó y se colocó en matraces Erlenmeyer con 20 ml de buffer de fosfato, 0.03 M pH 8.0, en agitación rotatoria de 120 rpm durante 24 horas. El experimento se realizó por duplicado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 6.3 ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA

Temperatura de almacenamiento (°C)	Actividad Enzimática retenida a través del tiempo		
	<u>15 días</u>	<u>1 mes</u>	<u>4 meses</u>
4	100	100	100
temperatura ambiente	100	85	70
37	100	100	69

Se pesaron lotes de 0.7 g (peso húmedo) de catalizador y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 15 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH de 8.0. La reacción de hidrólisis se realizó a 40°C, con 18 g/l de penicilina - G-K y una agitación rotatoria de 100 rpm durante 30 minutos. Se determinó la producción del 6-APA. Se lavó el catalizador con KCl 0.3 M y se almacenó a temperatura de 4, 37°C y ambiente (en KCl .3 M), volviendo a realizarse la reacción a los 15 días 1 y 3 meses, desechándose la muestra en cada determinación. Todo el experimento se realizó por duplicado mostrándose en la tabla el promedio de las determinaciones.

TABLA 6.4 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UN TANQUE AGITADO, CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA, CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUBSTRATO.

Penicilina (g/l)	Tiempo (Hrs)	Conversión (%)	Velocidad µM 6-APA/ml hr.
10	5	97.8	(10) 6.14
20	8.5	97	(20) 6.8
30	10.25	67.7	(30) 7.4
40	10	65.53	(40) 7.12
50	11.75	58	(50) 7.7

Se inmovilizó y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli en carragenina como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Se pesaron 10.95 g (peso seco) de catalizador y se colocaron en un fermentador de 1.5l de capacidad. Se realizó la reacción de hidrólisis en 1 litro de buffer de fosfatos --- 0.03 M, pH 8.0 constante, temperatura de 40°C, agitación de 320 rpm y concentraciones de penicilina de 10, 20, y 50 g/l. Se midió el -- 6-APA producido como se describe en metodología general, cada 30 minutos, hasta obtener la máxima cantidad de 6-APA producida momento en que se paró la reacción y se lavó el catalizador con KCl 0.3 M.

TABLA 6.5 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA CO LUMNA CON RECIRCULACION, CON PENICILINO AMIDASA -- UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRA GENINA

Penicilina (g/l)	Tiempo (Hrs)	Conversión (%)
6	4	97.7
12	6.5	85
24	7.5	54.6
48	9.5	47.7

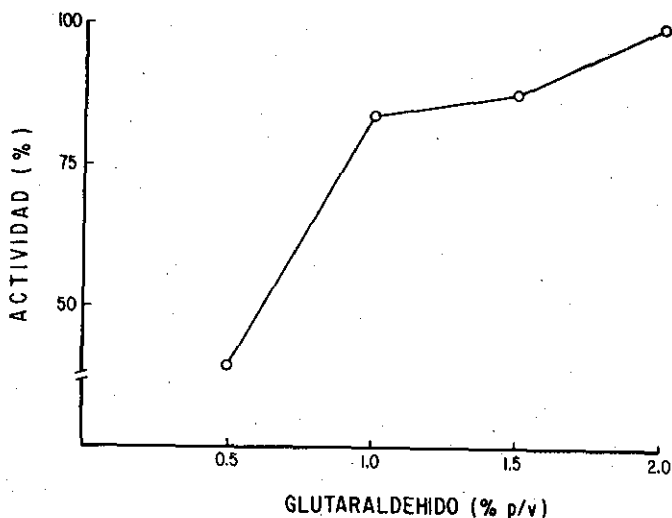
Se inmovilizó y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli en carragenina, como se describe en Materiales y Mé todos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Se pesaron - 23 g de catalizador (peso seco), se empacó una columna de far macia modelo R 25/26, de 2.5 cm de diámetro interno, longi tud de 40 cm. 10 ml de capacidad. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K, con 500 ml de buffer de fos fatós 0.03 M, pH 8.0 constante, 40°C y concentraciones de pe nicilina de 6, 12, 24, y 48 g/l. Se determinó la producción del 6-APA como se describe en metodología general, por dupli cado cada 30 minutos hasta obtener la máxima producción de 6-APA. El catalizador se lavó con KCl 0.3 M después de cada experimento.

TABLA 6.6 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA COLUMNA CON RECIRCULACION, CON PENICILINO AMIDASA -- UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA

Penicilina (g/l)	Tiempo (Hrs)	Conversión (%) de 6-APA
10	1.5	99.7
20	3.5	90
30	6	86
50	9.25	83.8

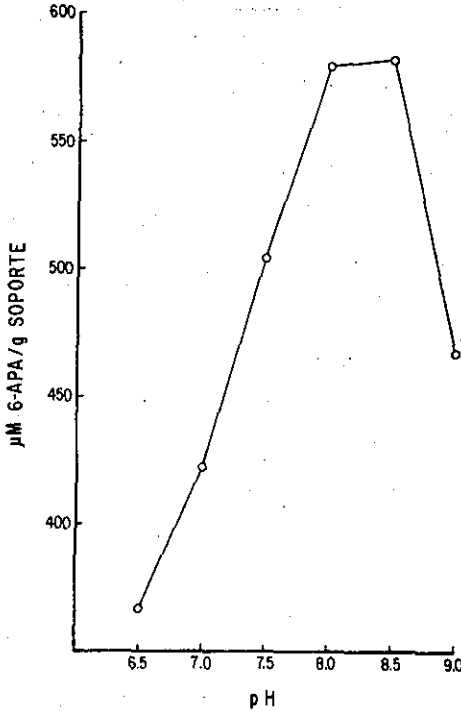
Se inmovilizó y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli en carragenina, como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Se pesaron 53.9 g de catalizador (peso seco), y se empacó en una columna de vidrio con 5 cm. de diámetro y 67 cm de largo con una capacidad de 1.100l. Se realizó la reacción de hidrólisis en 1.4 l de buffer de fosfatos 0.03 M pH de 8.0 constante, 40°C y concentraciones de penicilina de 10, 20, 30 y 50 g/l. Se determinó la producción de 6-APA por la metodología descrita en Metodología General, por duplicado cada 30 minutos, hasta obtener la máxima producción de 6-APA. El catalizador se lavó con KCl 0.3 M después de cada experimento.

FIGURA 6.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO EN LA PENICILINOAMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA



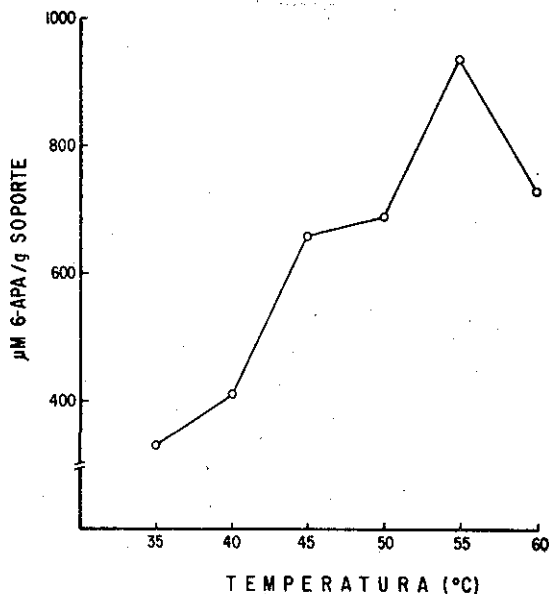
Se inmovilizó penicilino amidasa unida a células de E. coli en carragenina. Para el curtido se utilizaron concentraciones de glutaraldehído de 0.5, 1.0, 1.5 y 2% P/V, se lavo con KCl 0.3 M hasta que la solución de lavado fuese transparente. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K, en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 15 ml de buffer de fosfato 0.03 M pH 8.0 inicial, con agitación de penicilina de 18 g/l, después de tres horas de reacción se determino la cantidad de 6-APA producida por el método descrito en Materiales y Métodos en Metodología -- General. El experimento se realizó por duplicado mostrándose en la figura el promedio de los resultados.

FIGURA 6.2 PERFIL DE pH DE LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA



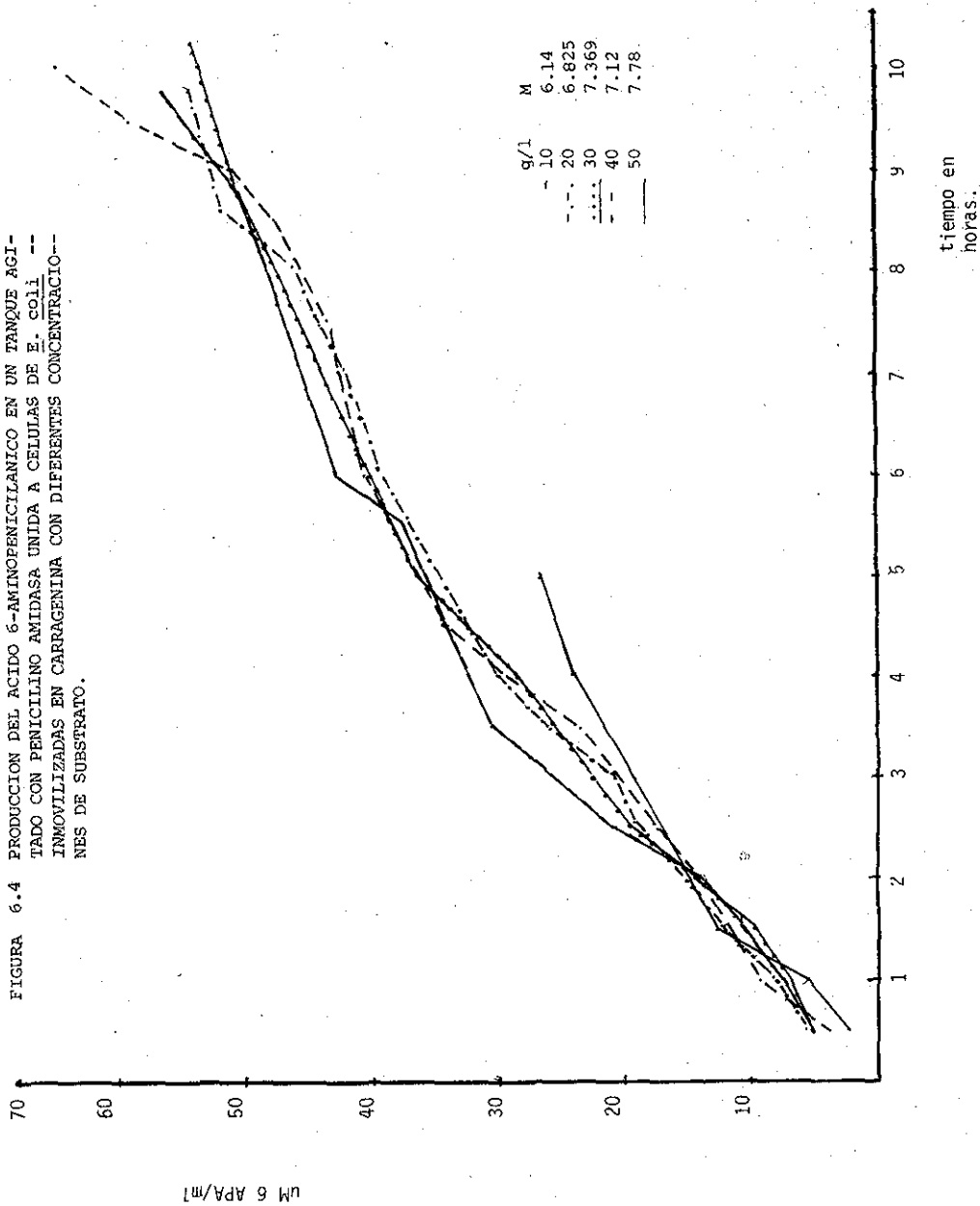
Se inmovilizó y se curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli en carragenina, como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de Ingeniería Enzimática. Se pesaron aproximadamente 0.54 g del catalizador (peso húmedo) y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 15 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH de 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina-G-K, con 18 g/l de penicilina a 40°C y agitación rotatoria de 100 rpm, durante 30 minutos y se determinó la producción de 6-APA. El experimento se realizó por duplicado, en la figura se muestra el promedio de los resultados.

FIGURA 6.3 PERFIL DE TEMPERATURA DE LA PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA



Se inmovilizó y curtió penicilino amidasa unida a células de E. coli en carragenina, como se describe en Materiales y Métodos en la Sección de -- Ingeniería enzimática. Se pesaron aproximadamente 0.7 g (peso húmedo) -- del catalizador y se colocó en matraces Erlenmeyer de 135 ml con 15 ml de buffer de fosfato 0.03 M pH de 8.0. Se realizó la reacción de hidrólisis de la penicilina -G-K, con 18 g/l de penicilina, agitación rotatoria de 100 rpm, y temperatura de 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C durante 30 minutos. Se determinó la producción de 6-APA. El experimento se realizó por duplicado, en la figura se muestra el promedio de los resultados.

FIGURA 6.4 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UN TANQUE AGITADO CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. COLI INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUBSTRATO.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 6.5 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA COLUMNA CON RECIRCULACION, CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE E. coli INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA

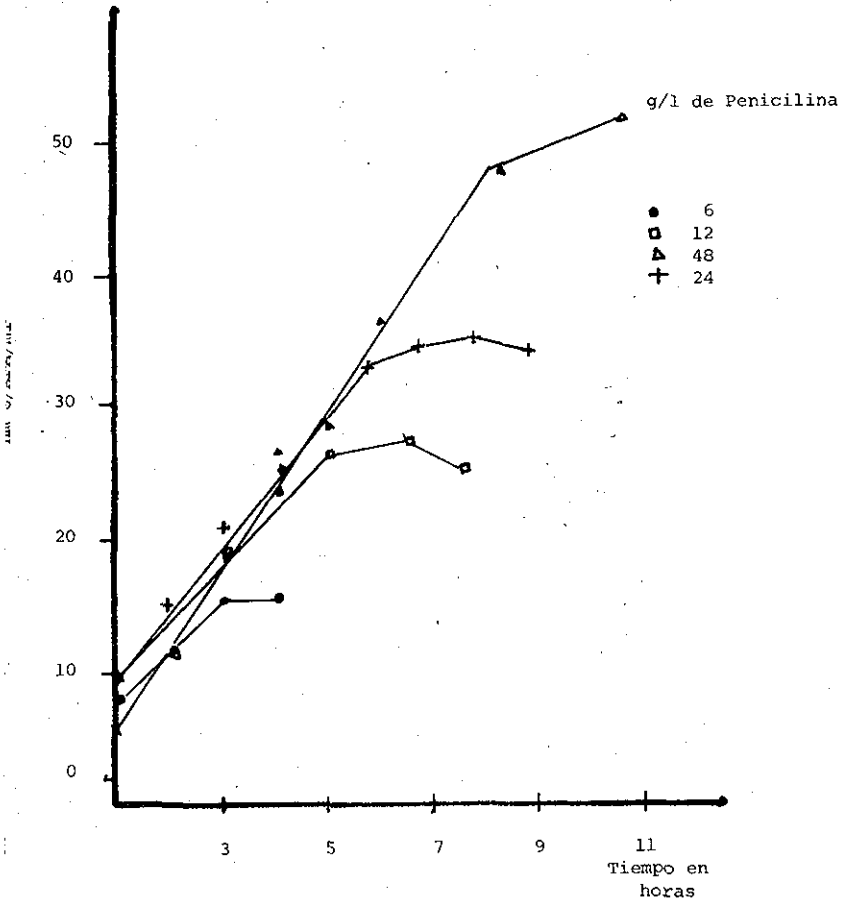


FIGURA 6.6 PRODUCCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO EN UNA COLUMNA CON RECIRCULACION, CON PENICILINO AMIDASA UNIDA A CELULAS DE *E. coli* INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA

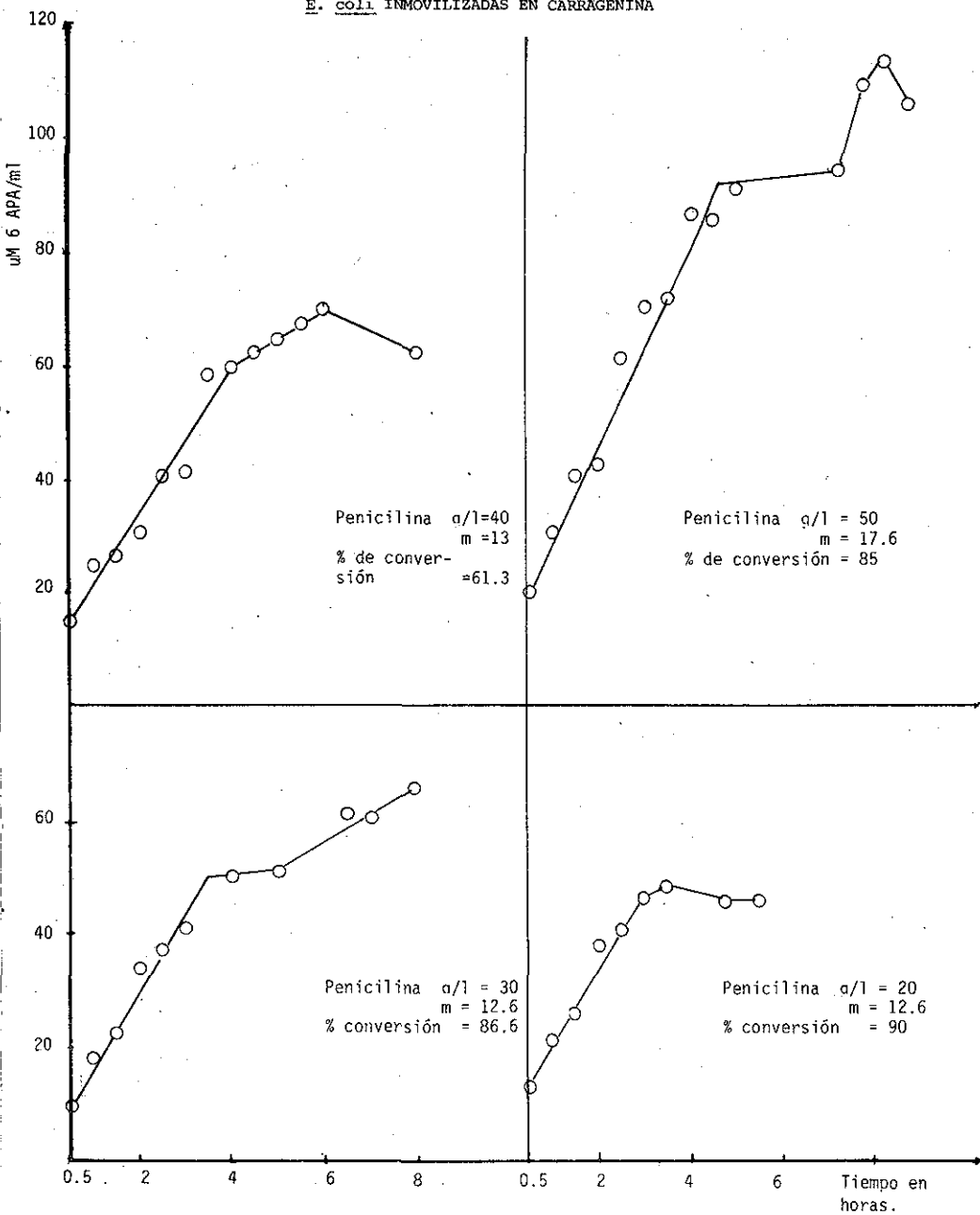


FIGURA 7.1 PRODUCCIÓN DE FENICILINDO AMIDASA EN CELULAS DE *E. coli* EN PLANTA PILOTO

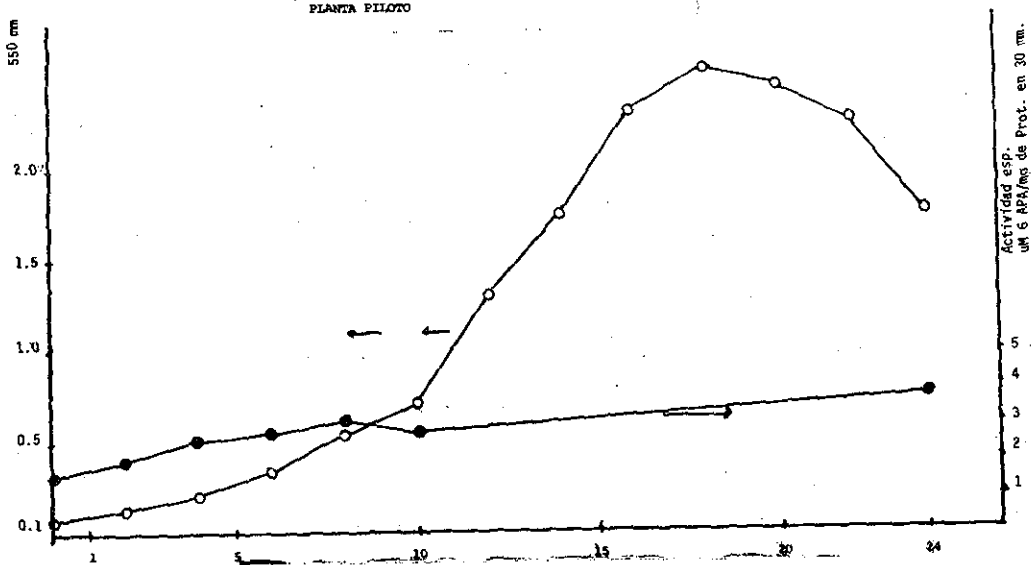
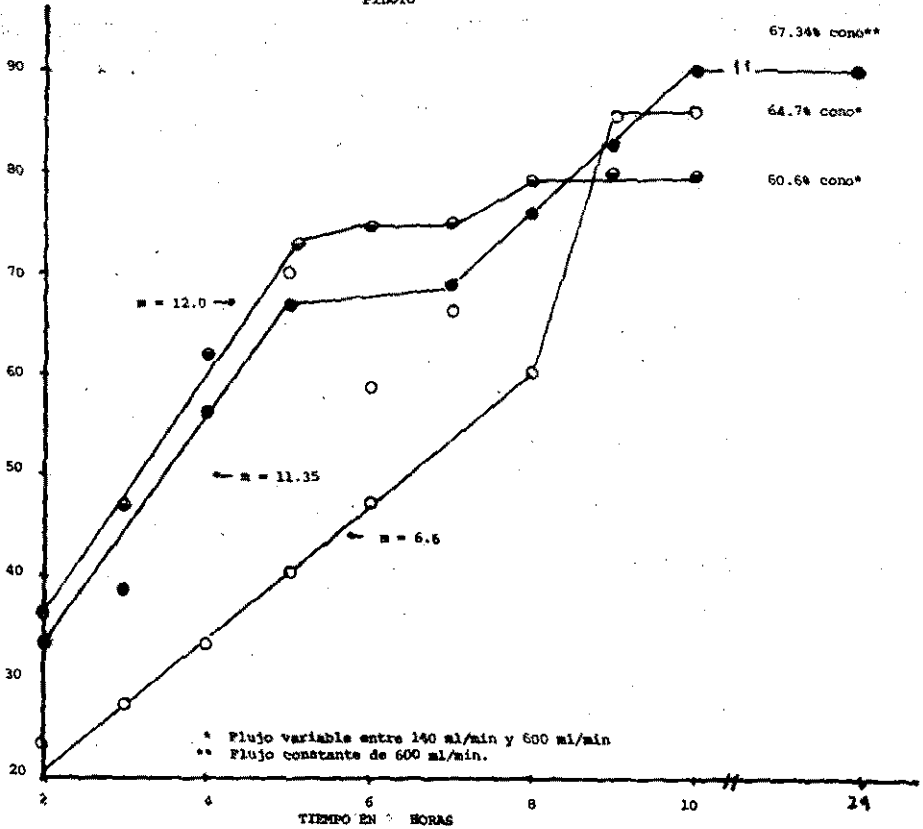


Figura 7.1. Se crecieron cepas de *E. coli*, ATCC 9637, en un fermentador de 250 l. con 160 l. de medio mínimo con 1.4 g de fosfato de potasio monobásico, 2 g/l de ácido fenilacético como fuente de carbono e inductor y 0.8 g/l de NH_4Cl como fuente de nitrógeno (ver Apéndice de medio de cultivo) a $27^\circ\text{--}29^\circ\text{C}$. con una aereación de 1 VVM. Se inoculó con 6.5l de *E. coli* ATCC 9637 crecidas en el mismo medio de cultivo durante toda la noche. Se muestreó cada dos horas durante 24 horas y se determinó D.O. a 550 nm. y actividad específica (durante las primeras 10 horas y al final de la fermentación).

FIGURA 7.2 PRODUCCION DE 6-APA EN UN REACTOR ENZIMATICO EN PLANTA PILOTO



Figuras 7.2 y 7.3. Se inmovilizó penicilino amidaso unida a células de *E. coli* ATCC 9637, en carragenina y se curtió. Se pesaron aproximadamente 1.3 Kg del catalizador y se empacó una columna de Pharmacia de 20 litros de capacidad (ver Metodología en Planta Piloto). Se realizó la reacción de hidrólisis con 25 y 50 g/l de penicilina, y con un flujo variable que osciló entre 140 ml/min. y 600 ml/min. Se tomaron muestras cada hora, y se hicieron determinaciones por duplicado de 6-APA. La operación del reactor se detuvo cuando no hubo mayor producción de 6-APA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 7.3

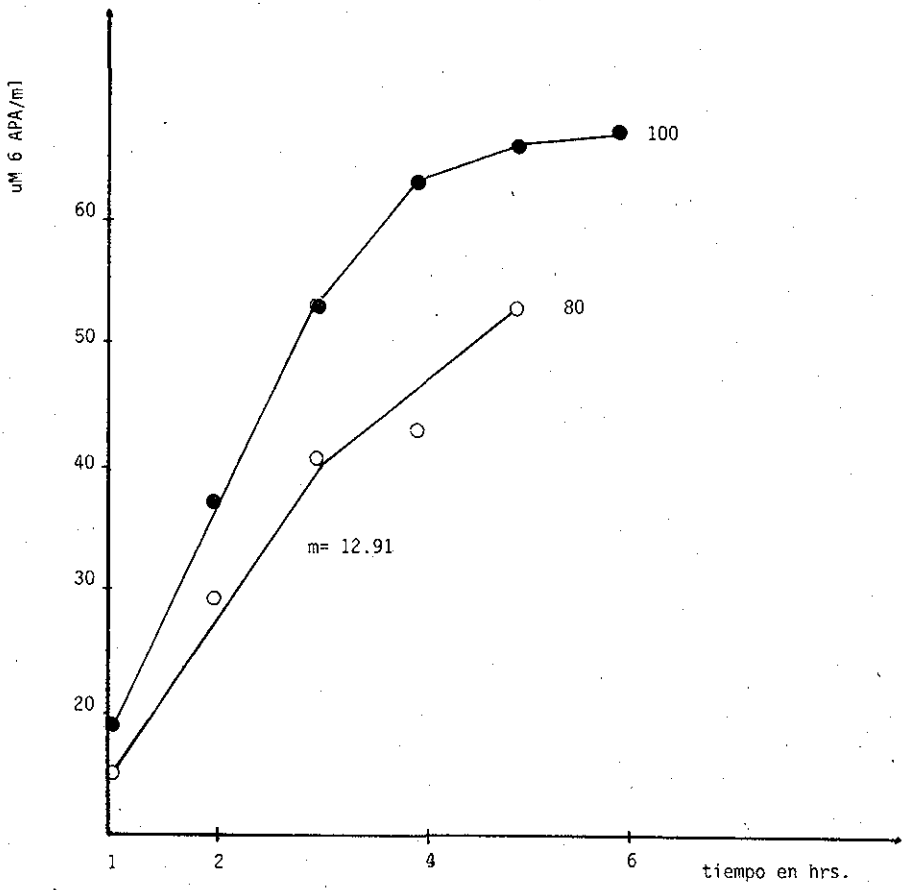
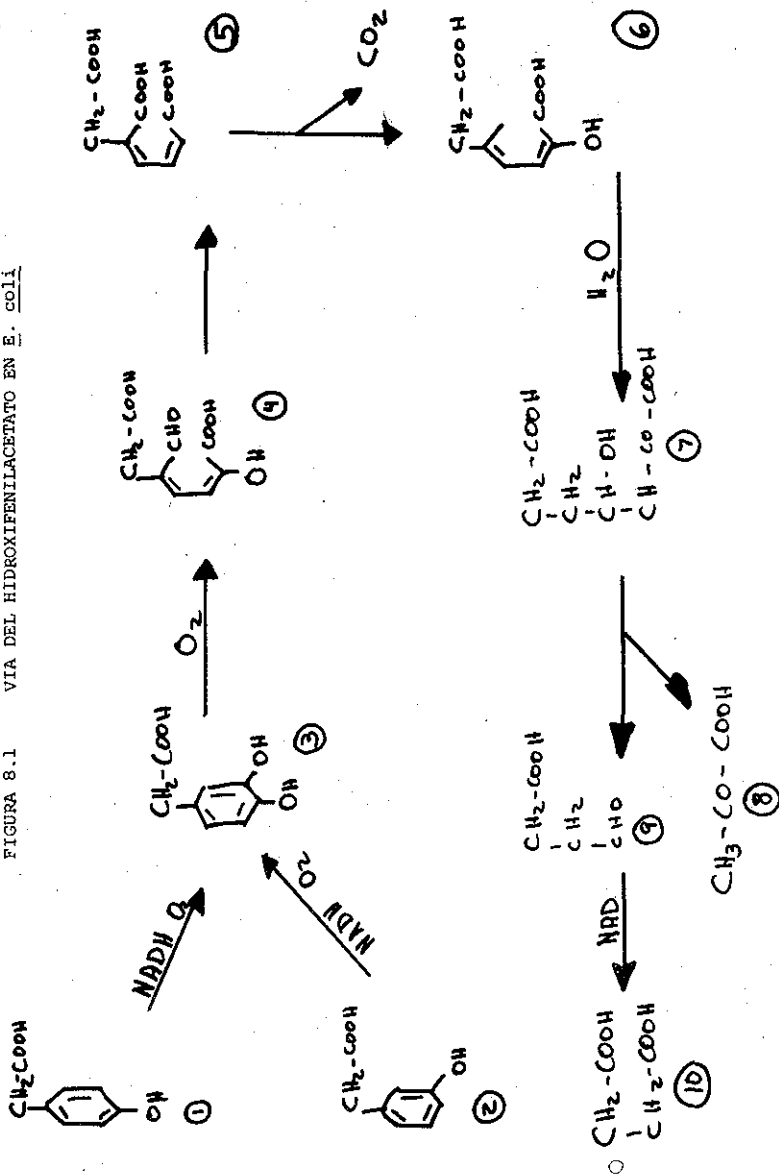
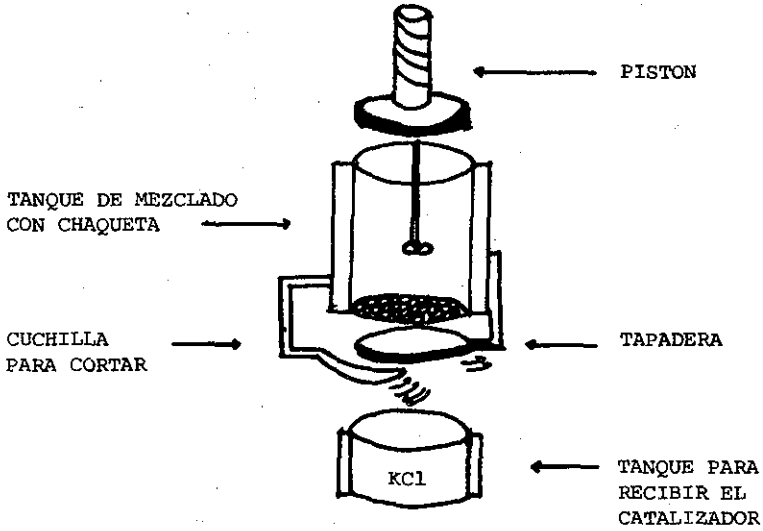


FIGURA 8.1 VIA DEL HIDROXIFENILACETATO EN *E. COLI*



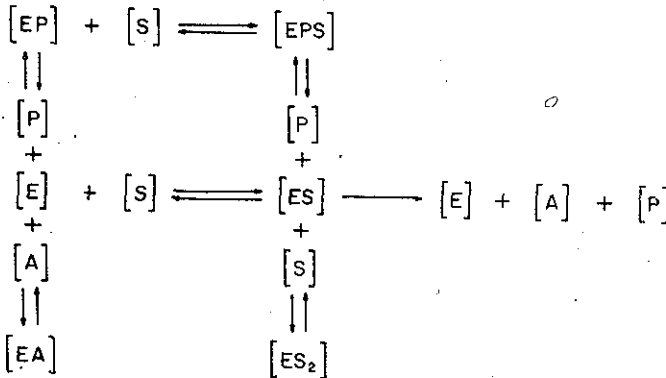
1. Acido 4-hidroxifenilacético
2. Acido 3-hidroxifenilacético
3. Acido 3,4-hidroxifenilacético
4. 5-carboximetil 2-hidroxiimucónico, semialdehído
5. Acido 5, carboximetil 2, hidroxiimucónico
6. Acido 2-hidroxihepta 2,4-dienol, 7 dióico
7. Acido 4-hidroxi 2,acetopimélico
8. Acido pirúvico
9. Acido semialdehído succínico
10. Acido succínico

FIGURA 8.2 EQUIPO PARA INMOVILIZAR CELULAS DE E. coli EN CARRAGENINA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURAS 8.3, 8.4 CINETICA DE LA HIDROISIS DE LA PENICILINA-G POR LA
PENICILINO AMIDASA



S = Penicilina-g
A = ácido fenilacético
P = ácido-6-aminopenicilánico

ECUACION DE VELOCIDAD Y SUS CONSTANTES EN LA HIDROLISIS ENZIMATICA
DE LA PENICILINA

$$v = \frac{V_{max} S_0 (1-x) K_{ia} K_{ip} K_{is} K_s}{S_0^2 x K_9 (K_{ip} K_{is} K_s + K_{ia} K_{is} K_s + S_0 (1-x) K_{ia} K_{is} - S_0 (1-x) K_{ia} K_{ip}) + S_0 (1-x) K_{ia} K_{ip} K_{is} K_s + K_s^2 K_{ia} K_{ip} K_{is} + S_0^2 (1-x) K_{ip} K_{ia} K_s}$$

EN DONDE

- V_{max} = 340 μ M 6-APA/g proteina/minuto
- K_s = 1.4×10^{-4} M
- K_{ia} = 1.1×10^{-4} M inhibición competitiva
- K_{ip} = 7.2×10^{-3} M inhibición no competitiva
- K_{is} = 0.468 M inhibición por sustrato
- S_0 = Concentración inicial de sustrato
- x = Conversión parcial del sustrato = $(S_0 - S)/S_0$

APENDICE

MEDIO DE CULTIVO

Medio Mínimo m 9

Na_2HPO_4	6 g.
KH_2PO_4	3 g.
NaCl	0.5 g.
NH_4Cl	0.008 g/l

Añadir 10 ml. de una solución de CaCl_2 0.01 M después de autoclavar más 1 ml. de una solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 M en un litro.

Glucosa	4 g/l
Glicerol	4 g/l

MEDIO, BASE (g/l)

NN + 4 g/l de medio completo sin leucina (Difco)

1 g/l de glucosa 0.008 g/l NH_4Cl

MEDIO MINIMO

KH_2PO_4	13.6 g.	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2 g.	
K_2SO_4	2.6 g.	
CaCl	0.1 g.	N.N.
$\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.005 g.	
Agua	1,000 ml.	
pH	7.4	

Fuente de Nitrógeno NH_4Cl 0.008 g/l por cada 100 ml. de medio.

Glucosa 2 g/l

REQUERIMIENTOS CEPA E. coli K12 (RR1)

L-leucina	0.05	g/l
L-isoleucina	0.05	g/l
L-valina	0.2	g/l
Vitamina B ₁	0.2	mg/ml.
Prolina	200	mg/ml.

MEDIO LB

Extracto de levadura	5	g.
Bacto triptona	10	g.
NaCl	10	g.
Agua	100	ml.
pH	7.0	

MEDIO L-Glu

Extracto de levadura	4	g.
Acido glutámico	15	g.
Agua	100	ml.
pH	7.0	

MEDIO L.C

Triptona	10	g.
NaCl	10	g.
Extracto de Levadura	5	g.
CaCl ₂	0.275	g.
Agar	7.5	g.
Agua	1000	ml.
pH	7.0	

MEDIO LCTG

LCT:

Glucosa	2 g.
Tiamina	0.025 gr.
Agar	15 gr.
Agua	1000 ml.

MEDIO DE ABSORCION

MgSO ₄	1.2 g
CaCl ₂	0.55 g.
Agua	1000 ml.

BIBLIOGRAFIA

1. Vaz Rassele, C. E., Yokoya, F., Rodrigues, N. S. e Cipola, L. E.: Comportamento reologica domeio de fermentacao De Escherichia coli para Producao de Penicilinamida-Hidrolase. Revista Brasileira de Tecnologia. Vol. 7, 1976.
2. Nam, D. H. and Ryu, D. D.: Biochemical properties of penicillin amidohydrolase from micrococcus luteus. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 38, No. 1 p. 35-38, Julio, 1979.
3. Self, D.A., Kay, G. and Lilly, M. D.: The conversion of benzyl penicillin to 6-aminopenicillanic acid using an insoluble derivative of penicillin amidase. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XI 337-348 (1969).
4. Cole, N., Savidge, T. and Vanderhaeghe, H.: Penicillin acylase (assay). Antibiotic Inactivation and Modification Vol. 45, 698-721, 1975.
5. Sato, T., Tosa, T. and Chibata, I.: Continuous production of 6-amino-penicillanic acid from penicillin by immobilized microbiol cells. Applied Microbiology, 1976.
6. Marconi, W., Cecere, F., Morisi, F., Della Penna, G. and Rappuoli, B.: The hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid by entrapped penicillin acylase. The Journal of Antibiotics, 228-232, Apr. 1973.
7. Process for producin 6-aminopenicillanic acid. United States Patent Office. Patented, May 29, 1973. 3,736,230.

8. Okachi, R., Misawa, M. and Taokashi, : Production of 6-aminopenicillanic acid by *Kluyvera citrophila* K y 3641. Agr. Biol. Chem. Vol. 36 No. 6 p. 925-930 (1972).
9. Acevedo, F. and Cooney, C.L.: Penicillin amidase and penicillinase production in nitrogen - and sulfur-limited chemostats. European J. Appl. Microbiology Vol. 2: 9-17 (1975).
10. Pruess, D.L. and Johnan, M.J.: Enzymatic deacylation of S³⁵-benzylpenicillini. Journal of Bacteriology. Vol. 90 No. 2, Aug. 1965.
11. Szentirmai, A.: Production of penicillin acylase. Applied Microbiology. Vol. 12 No. 3 (185-187) May, 1964.
12. Immobilized Microbial Cells. United States Patent. 3,957,580 - May 18, 1976.
13. Process for Preparing 6-aminopenicillanic Acid by Bacillus megaterium United States Patent Office 3,144,395, Aug. 11, 1964.
14. Park, Y. K., Marancebaum, E. and Moretti, R. H.: Producción de penicilino amidasa por una mutante E. coli. Campinas sp. Brasil. Abstract del 5o. Simposio Internacional de Fermentación. Berlin, - 1976.
15. Acevedo, F. and Cooney, C. L.: Penicillin amidase production by Bacillus megaterium. Biotechnology and Bioengineering Vol. XV 493-503 (1973).
16. Szewczur, A., Ziomek, E., Mordarski, M., Siewinski, M. and Wieczorek, J.: Properties of penicillin amidase immobilized by copolymerization with acrylamide. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXI pp. 1543-1552, 1979.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

17. Ryu, D. Y., Bruno, C. F., Lee, B. K. and Venkatasubramanian, K.: Microbial penicillin amidohydrolase and the performance of a continuous enzyme reactor system. Proc. IV FFS Ferment Technol. Today 307-314 (1972).
18. Marancenbananm, E. and Park, Y. K.: A mutant strain of isolated bacterium as patent producer of Penicillin amidase. J. Ferment. Technol. Vol. 57, No. 2, p. 137-140.
19. Fujii, T., Matsumoto, K. and Wantanabe, T.: Enzymatic synthesis of cephalixin. Process Biochemistry, October 1976.
20. Franz, K.: 6-aminopenicillanic acid production. Chemical Abstracts. Biochemistry Sections. Vol. 75 No. 4, August 16, 1971.
21. Mutantes de E. coli productoras de penicilinas. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 85, No. 9, October 25, 1976.
22. Takashi, N., Masayashy, M. and Makoto, I.: Manufacture of penicillin acylase. Chemical Abstracts. Biochemistry Sections. Vol. 85
23. Slezar, J. and Vojtisek, V.: Penicillinamidohydrolase in E. coli synthesis of the enzyme, kinetics and specificity of its induction and the effect of oxygen. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 85 No. 10, Nov. 8, 1976.
24. Vojtisek, V. and Slezak, J.: Penicillinamidohydrolase in E. coli III. Catabolite repression, diauxic effect of camp and nature of enzyme induction. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 85, No. 10. Nov. 8, 1976.
25. Rozhkos, K. J., Meshan'kin, B.N.: Study on Yersinia pestis penicillinase, the synthesis of which is determined by and R episome. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 85, No. 12, December, 1976.



26. Klein, J. and Wagner, F.: Immobilization of whole microbial cells for the production of 6-aminopenicillanic acid. Comunicación personal.
27. 6-Aminopenicillanic acid. VI Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzyme hydrolysis. Proc. Roy. Soc. Ser. B Vol. 154 p. 522-531, 1961.
28. Patent specification 893,418 Process for the production of penicillin splitting enzyme preparations. Patent Office, 25 Southampton Buildings, London W.C. 2. April 11, 1962.
29. Cole, M.: Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of Escherichia coli. Biochem. J. 115, 733-739, 1969.
30. Gang, D. M. and Shaikh, K.: Regulation of penicillin acylase in Escherichia coli by cyclic AMP. Biochimica et Biophysica Acta 425 110-114 (1976).
31. Nam, D. H. and Dewey, D. y Ryi, Y.: Preparation of 6-aminopenicillanic acid using penicillin amidohydrolase from micrococcus luteus. J. Ferment. Technol. Vol. 57 No. 2, p. 141-145, 1979.
32. Sikyta, B. and Slezak, J.: Continuous cultivation of E. coli Possessing high penicillin-acylase activity. Biotechnology and Bioengineering. Vol. VI, pages. 309-319 (1964).
33. Savitskaya, M., Mys, P.S., Levitov, M. B. and Shellenberg, E.N.: Application of immobilized microbial acylase for the synthesis of 6-aminopenicillanic acid. Advances in Enzyme Engineering. Vol. I, 1975.



34. Marconi, W., Cecere, F., Marisi, F., Della Penna, G. and Rappuoli, B.: The hydrolisis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid by intrapped penicillin acylase. The Journal of Antibiotics Vol. XXVI No. 4. 228-232, 1973.
35. Kutzbach, C. and Ravenbusch, E.: Preparation and general properties of cystalline penicillin acylase from Escherichia coli ATCC 11105 Z. Physiol. Chem. 354, 45-54, Januar, 1974.
36. Carley Smith, S. W. and Lilly, M. D.: Deacylation of benzylpenicillin by immobilized penicillin acylase in a continuos four-stage stirred tank reactor. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXI p. 1057-1073 (1979).
37. Cole, M.: Deacylation of acylamino compounds other than penicillins by the cell-bound penicillin acylase of Escherichia coli. Biochem. Journal Vol. 115, 741-745, 1969.
38. Warburton, D., Balansinghan, K., Dunnill, P. and Lilly, M. D.: The preparation and kinetics of immobilized penicillin amidase from Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta 284, 2780284, 1972.
39. Use of E. coli ATCC 9637 for the asymetric hydrolisis of aminoacid derivations. Brief Reports 15, VI, 1965. pag. 317.
40. Giacobbe, F. and Iosanna, A.: Novel developments for the production of 6-APA in the penicillin fermentation plant by using, Fiber-entrapped penicillin amidase. Journal of Solid-Phase Biochemistry Vol. 2 No. 3, 1977.
41. Drowk, J. Saudek, V., Svec, F. and Kalal, J.: Enzyme immobilization techniques on poly (Glycidylmethacry late-Co-Ethylene Dimetracrylate) carrier with penicillin amidase as model. Biotechnology and Bioeng. Bol. XXI p. 1317-1332 (1979).



42. Klein, J. and Eng, H.: Immobilization of microbial cells in epoxy carrier systems. Comunicación personal.
43. Douglas, M., Lilly, D., Kay, G., John, R., Wilson, R. and Kimball, A. Insolubilized enzymes and their preparation and use. Patent specification 1183260.
44. Fritz, H. and Bayer, A.C.: Water soluble, polymeric substrate covalently bound penicillin acylase for preparing 6-aminopenicillanic acid. Ger. Offen. 2,312,824, 19 Sept. 1974.
45. Smith, R. A. G.: Ger Oppen. 2,435,951 (Beecham Group Ltd.). 26 Feb. 1976.
46. Mandely, M., Lepp, E., Masing, T., Sumer, E., Kestner, A.: Study on the inactivation of immobilized penicillin amidase. Chemical Abstracts Biochemistry Sections. Vol. 86, No. 7 Sept. 27, 1976. 85: 89270 p.
47. Coonube, R. G., and George, A. M.: An alternative coupling procedure for preparing activated sepharose for affinity chromatography of penicillinase. Chemical Abstracts Biochemistry Sections.
48. Morr, C.V. Conformation and Functionality of Milk Proteins, en Functionality and Protein Structure. Pour-El, A. (Ed). American Chemical Society, Washington, 1979.
49. Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T.: Process for preparing 6-aminopenicillanic acid. United States Patent. 3,953,29. Apr. 27, 1976.
50. Method for the production of 6-amino-penicillanic acid. United States Patent Office. 3,446,705 May 27, 1969.
51. Giovenco, S., Maimone, A.: Immobilized penicillin acylase in cellulose acetate beads. Laboratorio Processi microbiologici. 20. Congreso Internacional de Biotecnología. Abril 5-10, 1981.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 195 -

52. Cole, M.: Microbial synthesis of penicillins and 6-APA. *Process Biochemistry* (2), 35-46, 1967.
53. Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takato, I., Nishida, Y. and Chibata, I.: Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. XXI pag. 1697-1709, 1979.
54. Balasingham, et. al. Método para medir 6-APA. *Biochim. Biophys. Act.* 276, p. 250-256, 1951.
55. Lowry et. al.: Lowry method. *Biol. Chem.* 143, p. 265-275, 1951.
56. Vieth, W. R., Gilbert, S. G., Wang, S. S. and Venkatasubramanian, K. U. S. Patent No. 2,809,613 (1974).
57. Prescott and Dunn. *Producción Penicilina*. Industrial Microbiology McGrawgran-Hill Third Edition. Capt. 50 pag. 772.
58. Batchelor, et al.: A method for isolating bacteria capable of producing 6-aminopenicillamic acid from benzylpenicillin. *Nature* Vol. 191, Sep. 9, 1961.
59. Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F.: Cloning of the penicillin-G acylase gene of *E. coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. *Eng. Found. Conference*, Henniker, N. Y., U.S.A., 1979.
60. Cooper, R. A. and Skinner, M. A.: Catabolism of 3 and 4 hydroxyphenyl acetate by 3,4-dihydroxyphenylacetate pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, July 1980 p. 302-306.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

61. Chibata, I., T. Tosa, T. Sato y T. Mori. Immobilized Enzymes. John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto, - pag. 157,158, 1978.
62. Sandoval, H.: Cinética que rige la reacción de hidrólisis de la penicilina-G por la penicilina amidasa. Trabajo de Tesis para obtener el Grado de Licenciado. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México, 1980.
63. Casas, L., Galindo, E., Carranco, D., Giral, C., Bastarrachea, F. y Quintero, R.: Producción de ácido 6-aminopenicilánico, vía hidrólisis enzimática. II. Evaluación técnico económica a nivel de planta piloto. Congreso Nacional de Microbiología 16-20 Febrero, 1981. -- Mérida, Yucatán, México.