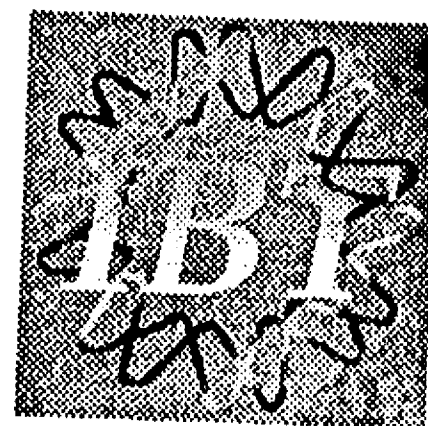


03088



4
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**ESTUDIO DE UN BIOCATALIZADOR DE CELULAS DE *E. coli*
RECOMBINANTES CON ACTIVIDAD PENICILINO AMIDASA EN
LA SINTESIS DE AMPICILINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA:

SONIA AMPARO OSPINA SANCHEZ

CUERNAVACA, MORELOS

1995

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DEL DR. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, EN CUERNAVACA, MORELOS.

EL COMITE TUTORIAL ESTUVO INTEGRADO POR:

DR. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES
DR. EDUARDO BARZANA GARCIA
DR. O. TONATIUH RAMIREZ

EL JURADO ASIGNADO PARA EL EXAMEN DOCTORAL FUE EL SIGUIENTE:

PRESIDENTE:	Dr. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA C.
SECRETARIO:	Dr. ENRIQUE MERINO P.
VOCAL:	Dr. RODOLFO QUINTERO R.
VOCAL:	Dr. EDUARDO BARZANA G.
VOCAL:	Dr. ALEJANDRO ALAGON C.
SUPLENTE:	Dr. JOEL OSUNA Q.
SUPLENTE:	Dr. TOHATIUH RAMIREZ R.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primera instancia y de manera muy especial al Dr. Agustín López Munguía C. tanto por su excelente asesoría y apoyo académico como por su valiosa amistad.

A María Elena, Alfredo, Mónica y Alfonso por su valiosa amistad y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. José Manuel Mendez Stivalet por su apoyo técnico en la síntesis de la fenilglicinametilester.

Al T.L. Fernando González, tanto por su apoyo técnico como por su amistad.

A todos aquellos que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.

A Lupe, Elisa y Pablo por su amistad y apoyo.

A Jairo por haber logrado juntos este objetivo.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	6
III. ANTECEDENTES	10
IV. MATERIALES Y METODOS	13
V. RESULTADOS	15
V.1. PRODUCCION DE BIOCATALIZADORES DE PENICILINO AMIDASA	15
V.2. ESTRATEGIAS EN LA SINTESIS DE AMPICILINA	21
VI. CONCLUSIONES	35
VII. BIBLIOGRAFIA	38

RESUMEN

Este trabajo consistió primeramente en la preparación de un biocatalizador de penicilino amidasa por inmovilización de células recombinantes de *E. coli* con alta actividad penicilino amidasa. Esta cepa posee el gen de la penicilino amidasa bajo la regulación del promotor del gen *lacZ*, lo que permite su sobreexpresión mediante fermentación en presencia de un inductor. Se desarrolló un sistema de fermentación en lote exponencialmente alimentado para controlar la velocidad específica de crecimiento del microorganismo a valores muy bajos, logrando obtener células con una elevada actividad específica, correspondiente hasta 7 veces la actividad obtenida en sistema en lote. Con estas células se produjo un biocatalizador de células inmovilizadas, que a diferencia de los obtenidos con células silvestres, presenta actividades específicas del mismo orden de magnitud que los obtenidos a partir de enzimas purificadas. El catalizador presenta un factor de efectividad mayor de 0.8 y un tiempo de vida media que le permite competir con los catalizadores industriales.

La penicilino amidasa es una enzima capaz de catalizar la reacción de síntesis de ampicilina a partir de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y fenilglicina metilester (FGME). Esta enzima también cataliza la reacción de hidrólisis de FGME y de ampicilina, por lo cual es necesario el uso de altas concentraciones de FGME para lograr altos rendimientos. Se emplearon varias estrategias para incrementar el rendimiento de la reacción. La primera consistió en el uso de cosolventes con el objeto de disminuir la actividad de agua e inhibir las reacciones de hidrólisis. Sin embargo estos solventes afectan la actividad, inhibiendo en la misma proporción la reacción de síntesis y la de hidrólisis, por lo cual solo se incrementa el tiempo de reacción sin mejoras al rendimiento. La segunda estrategia consistió en el uso de solventes inmiscibles con el objeto de extraer la ampicilina e incrementar la conversión. Sin embargo, la alta polaridad de la ampicilina no permitió encontrar un solvente en el cual el coeficiente de partición fuera adecuado para promover una rápida extracción. La tercera estrategia consistió en el uso de metanol como inhibidor, ya que el metanol es un producto de una de las reacciones laterales que afectan negativamente el rendimiento. Con esta estrategia se logró incrementar en un 5% la conversión mediante la inhibición de la reacción de hidrólisis. Finalmente, una última estrategia consistió en el control del pH. Se encontró que el pH inhibe selectivamente la reacción de hidrólisis de FGME, por lo cual a pH 6.0 la relación de velocidades de síntesis/hidrólisis es 1.25, mientras que a pH 7.0 disminuye a 0.25. Esto permite lograr un incremento en el rendimiento de la reacción de 50 a 60% con una relación de sustratos (6-APA:FGME) de 1:3. Así mismo, al incrementar la relación de sustratos, la conversión se incrementó hasta 75%, misma que se mantuvo cuando la concentración de 6-APA se incrementa hasta 200 mM. Esta conversión es la más alta reportada en la literatura. De esta forma se logró una

productividad de 17 mg de ampicilina/unidad de enzima por lote (5 veces mayor a la que se reporta en la literatura).

La parte final del trabajo consistió en un estudio sobre la cinética de la reacción de síntesis de ampicilina, hasta ahora no reportada en la literatura. Esta reacción sigue una cinética de tipo ordenado, habiéndose calculado las constantes de afinidad de 6-APA y FGME. Simultáneamente la enzima cataliza la reacción de hidrólisis de ampicilina, inhibida competitivamente por fenilglicina y no competitivamente por 6-APA, y la hidrólisis de FGME, la cual es inhibida no competitivamente por metanol. El modelo cinético de las reacciones de hidrólisis siguen los mismos tipos de inhibición que se presentan en la hidrólisis de penicilina. Todas las constantes cinéticas fueron calculadas. A partir de éstas se propone un modelo cinético que fué confrontado con los resultados experimentales, encontrándose una buena correlación entre los resultados del modelamiento y los experimentales, con desviación solamente a concentraciones altas de sustrato.

Con los resultados de este trabajo ha sido publicado un artículo y otro más aparecerá en las memorias *in extenso* de un congreso internacional. Un tercero será enviado a publicación próximamente. Los artículos referidos son los siguientes:

1. Ospina, S., Merino, E., Ramírez, O.T. and López-Munguía, A. Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: production, characterization and use in the synthesis and hydrolysis of antibiotics. *Biotechnology Letters*, 1995, 17, 6, 615-620
2. Ospina, S., Barzana, E., Ramírez, T. and López-Munguía, A. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin. A whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst. En revisión para su publicación por Elsevier en los proceedings del Congreso: Immobilized cells: basics and applications, que se llevará a cabo en Holanda en noviembre/95.
3. Ospina, S., Barzana, E., Ramírez, T. and López-Munguía, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. Una versión más corta será enviada para su publicación en la revista *Enzyme & Microbial Technology*.

ABSTRACT

This work consisted in the preparation of a penicillin amidase biocatalyst by immobilization of *E. coli* recombinant cells with high penicillin acylase (PA) activity. This strain have the PA gene under the regulation of the lacZ gene promotor, which allows its overexpression by fermentation with an inducer.

An exponentially fed-batch fermentation system was developed to control the microorganism specific growth rate to very low values, obtaining cells with high specific activity (7 times the activity obtained in batch systems). The recombinant cells were used for the production of a biocatalyst with a high specific activity, similar to the one obtained from purified enzyme, with an effectiveness factor higher than 0.8 and a half life adequate for an industrial biocatalysts.

Penicillin amidase is able to catalyze the ampicillin synthesis reaction from 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenylglycine methylester (PGME). The enzyme also catalyzes the ampicillin and PGME hydrolysis reactions, so high PGME concentrations are necessary to get high yields of ampicillin. Several strategies to increase the synthesis yield were employed. First, cosolvents were used to decrease water activity and to inhibit hydrolysis reactions. Nevertheless the solvents inhibited in the same proportion the synthesis and therefore the hydrolysis reactions, inhibiting the overall activity increasing the time required to obtain the same yield. A second strategy consisted in using immiscible solvents to extract ampicillin. However, due to the high ampicillin polarity, we were not able to find a solvent with an adequate partition coefficient to promote a good extraction. The third strategy consisted in the use of methanol as an inhibitor of the PGME hydrolysis. With this strategy we were able to increase in 5% the yield of ampicillin formation. Finally, the last strategy consisted in controlling the pH. It was found that pH inhibited the PGME hydrolysis selectively, so at pH 6.0, the ratio of the rates of synthesis/hydrolysis was 1.25, while at pH 7.0 it decreased to 0.25. Therefore, conducting the reaction at an appropriated pH increased the yield from 50% to 60% with a substrate ratio (6-APA:PGME) 1:3. In the same context, an increase in the substrate ratio, resulted in a yield increase to 75%, up to a 6-APA concentration of 200 mM. This is the highest yield reported in the literature. As a conclusion, the productivity was increased to 17 mg of ampicillin/U per batch (5 times higher than the productivity reported in the literature).

Finally, the kinetics of ampicillin synthesis was studied. This kinetic model has not been reported. The reaction follows a second order model. The kinetic affinity constants for 6-APA and

PGME were calculated. Simultaneously, the enzyme catalyze the ampicillin hydrolysis, reaction inhibited competitively by phenylglycine and non-competitive by 6-APA, and the PGME hydrolysis, which is non-competitively inhibited by methanol. The model of the hydrolysis reactions follows the same type of inhibition that penicillin hydrolysis. All kinetic constants were calculated and used in a proposed model to describe the experimental results. A good correlation was found for this model, with deviations at high substrate concentrations.

With the results of this work a paper was published, another will appear in the proceedings of an international congress and a third article will be submitted for publication soon. The articles refereed, are the following:

1. Ospina, S., Merino, E., Ramírez, O.T. and López-Munguía, A. Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: production, characterization and use in the synthesis and hydrolysis of antibiotics. *Biotechnology Letters*, 1995, 17, 6, 615-620
2. Ospina, S., Barzana, E., Ramírez, T. and López-Munguía, A. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin. A whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst. Accepted for publication by Elsevier in the proceedings of the congress: Immobilized cells: basics and applications, that will be carried out in November/95.
3. Ospina, S., Barzana, E., Ramírez, T. and López-Munguía, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. A shorter version will be sent for publication to *Enzyme & Microbial Technology*.

I. INTRODUCCION

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones biológicas *in vivo*. También catalizan reacciones que involucren tanto sustratos naturales como no naturales *in vitro*. Las características de las enzimas que más frecuentemente se mencionan son: su capacidad para acelerar la velocidad de la reacción, operando bajo condiciones suaves; el ser altamente selectivas para los sustratos y estereoselectivas, siendo esta selectividad desde muy específica hasta muy amplia; el estar sujetas a regulación, es decir que la actividad catalítica puede estar fuertemente influenciada por la concentración de sustratos, productos u otras especies presentes en solución; el que generalmente son inestables (en relación con catalizadores químicos) y finalmente que pueden mostrar alta enantioselectividad.

Las características de disponibilidad, inestabilidad, alto costo y baja especificidad han sido consideradas los mayores problemas en el uso de enzimas como catalizadores. Sin embargo, se han hecho avances importantes en tecnología enzimática para aumentar la estabilidad y disminuir el costo de las enzimas empleando técnicas de inmovilización que permiten su reutilización (Katchalzki, 1993; Messing, 1975). La ingeniería genética y la ingeniería de proteínas lo han hecho a través de mutaciones sitio dirigidas con el objeto de sobreexpresar la enzima, facilitar su procesamiento, aumentar su estabilidad o modificar su especificidad (Hwang and Arnold, 1991).

El uso de microorganismos recombinantes para la producción de enzimas ha permitido avances importantes en el área. Por ejemplo, se ha logrado que una enzima se sobreproduzca mediante la sobreexpresión de genes provenientes de cepas silvestres, de tal forma que su recuperación sea más fácil, o se produzca en otro microorganismo que antes no producía la enzima. Así mismo, se ha logrado que la expresión de enzimas esté controlada para que su producción no afecte la viabilidad de las células que la producen, que se expresen a voluntad, sin requerir factores que induzcan su producción, y que proteínas que anteriormente se producían intracelularmente sean excretadas al medio de cultivo facilitando su purificación. Por otra parte, el uso de enzimas modificadas por técnicas de ingeniería de proteínas ha permitido la obtención de enzimas más

estables a las condiciones de reacción, como son el pH (por cambios en aminoácidos cargados en la superficie), la temperatura (por introducción de puentes de hidrógeno, que influyen en el plegamiento de la proteína) (Leatherbarrow and Fersht, 1986; Petersen and Martel, 1994), y presencia de solventes orgánicos (induciendo entrecruzamientos internos, incrementando interacciones electrostáticas o aumentando la compatibilidad de la superficie con el solvente por remoción de cargas superficiales o puentes de hidrógeno superficiales) (Hwang and Arnold, 1991; Ulmer, 1983). La ingeniería de proteínas también ha permitido obtener cambios en la especificidad, ya sea haciendo la enzima más específica para su sustrato o confiriéndole actividad por sustratos sobre los cuales antes no actuaba (por cambio de aminoácidos en el sitio activo) o cambiando el perfil de pH (modificando las cargas en la superficie de la proteína). Por otra parte, la ingeniería de proteínas es ahora aplicada para mejorar los procesos de purificación. La adición de colas específicamente diseñadas que se unen a compuestos determinados, como secuencias afines a estreptavidina o colas de polihistidina, permiten la purificación de la enzima por cromatografía de afinidad o de intercambio iónico (Nigren *et al*, 1994).

Hasta hace tan solo un lustro, el principal uso industrial de las enzimas había sido en reacciones de tipo hidrolítico. Sin embargo, el descubrimiento de que las enzimas pueden ser utilizadas en solventes no acuosos, ha expandido el uso potencial y el impacto económico de la biocatálisis (Zaks and Klivanov, 1988), de tal suerte que con el desarrollo de las áreas de ingeniería de proteínas e ingeniería enzimática, actualmente se vive un desarrollo acelerado en el estudio de las enzimas en reacciones de síntesis (Wong and Whitesides, 1994). La catálisis enzimática en medios no acuosos ofrece la posibilidad de nuevos usos de las enzimas empleando sustratos en reacciones que no son viables en medios acuosos debido a impedimentos cinéticos o termodinámicos. Por otra parte, la alta especificidad de las enzimas hace que sea posible su uso en reacciones de alta selectividad, prácticamente imposibles por métodos químicos, como es el caso de reacciones estereoespecíficas.

La penicilino acilasa (E.C.3.5.1.11) de *E. coli* es una enzima tipo serin-proteasa, que cataliza la hidrólisis de bencilpenicilina a 6-APA (Figura 1), el cual es de importancia industrial al ser fácilmente transformado en diferentes derivados acilados. En esta reacción se produce también ácido fenilacético (AFA), lo que ocasiona una disminución en el pH, el cual debe ser controlado por adición de una base neutralizante, lo que puede ocasionar puntos de pH elevado, capaces de desactivar la enzima. Este es el principio de procesos utilizados en la industria farmacéutica para la síntesis de penicilinas semisintéticas. Sin embargo su especificidad es amplia, ya que la enzima también cataliza la ruptura de grupos protectores N- u O-fenilacetilo de α -, β -, γ - aminoácidos, ácido L-aminoetilfosfónico, α -metil aminoácidos, péptidos, aminas, alcoholes o azúcares. En general la penicilino amidasa acepta sustratos con estereoestructuras relacionadas con L-aminoácidos. En síntesis de péptidos, el uso de grupos fenilacetilo como un grupo N-protector puede causar racemización. Sin embargo, el acoplamiento de N-fenilacetilo aminoácidos, seguido por desprotección enzimática del grupo fenilacetilo con acilasa, evita el problema de racemización (Wong and Whitesides, 1994)

Dentro de las aplicaciones más importantes de las enzimas en la industria, se encuentra el uso de la penicilino amidasa en la producción de antibióticos, a través de la producción de 6-APA, núcleo básico de la producción de penicilinas semisintéticas. Desde el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929, cientos de antibióticos han sido descubiertos o generados por vías semisintéticas. Para 1981 se habían desarrollado cerca de 20,000 penicilinas, 4,000 cefalosporinas, 1,000 rifampicinas, entre otros, y la producción de antibióticos alcanzó cerca de 25,000 toneladas, de las cuales cerca de 12,000 correspondieron a las penicilinas y cefalosporinas (Merino, 1992; Demain, 1985; Savidge, 1984). Las penicilinas producidas por vía semisintética, son en la actualidad los antibióticos que dominan el mercado por ser, no solo los más baratos, sino también los menos tóxicos. Desde el comienzo de su uso como medicamento contra las infecciones, se encontró que los microorganismos creaban resistencia a las penicilinas, a través de la ruptura del enlace amídico del anillo β -lactámico, mediante las enzimas β -lactamasas.

Posteriormente, se descubrió el ácido clavulánico, potente inhibidor de estas enzimas, el cual permitió volver a emplear β -lactámicos pues una combinación del antibiótico β -lactámico con este compuesto inhibe las β -lactamasas de microorganismos resistentes (Bush, 1988). De los antibióticos β -lactámicos, la ampicilina, producto de condensación de la D- α -aminofenilglicina y 6-APA, es uno de los antibióticos más utilizados a nivel mundial. El volumen de ventas es de 5,600 toneladas anuales, con un mercado de 1,500 millones de dólares (Barber, 1994). La ampicilina se produce a nivel industrial por síntesis química, proceso que requiere condiciones de baja temperatura, ausencia de agua, y utiliza compuestos altamente tóxicos. Puede ser obtenida por vía enzimática, a partir de 6-APA y un derivado activado de la fenilglicina, el metil ester, en condiciones de reacción que podríamos definir como suaves (Figura 1).

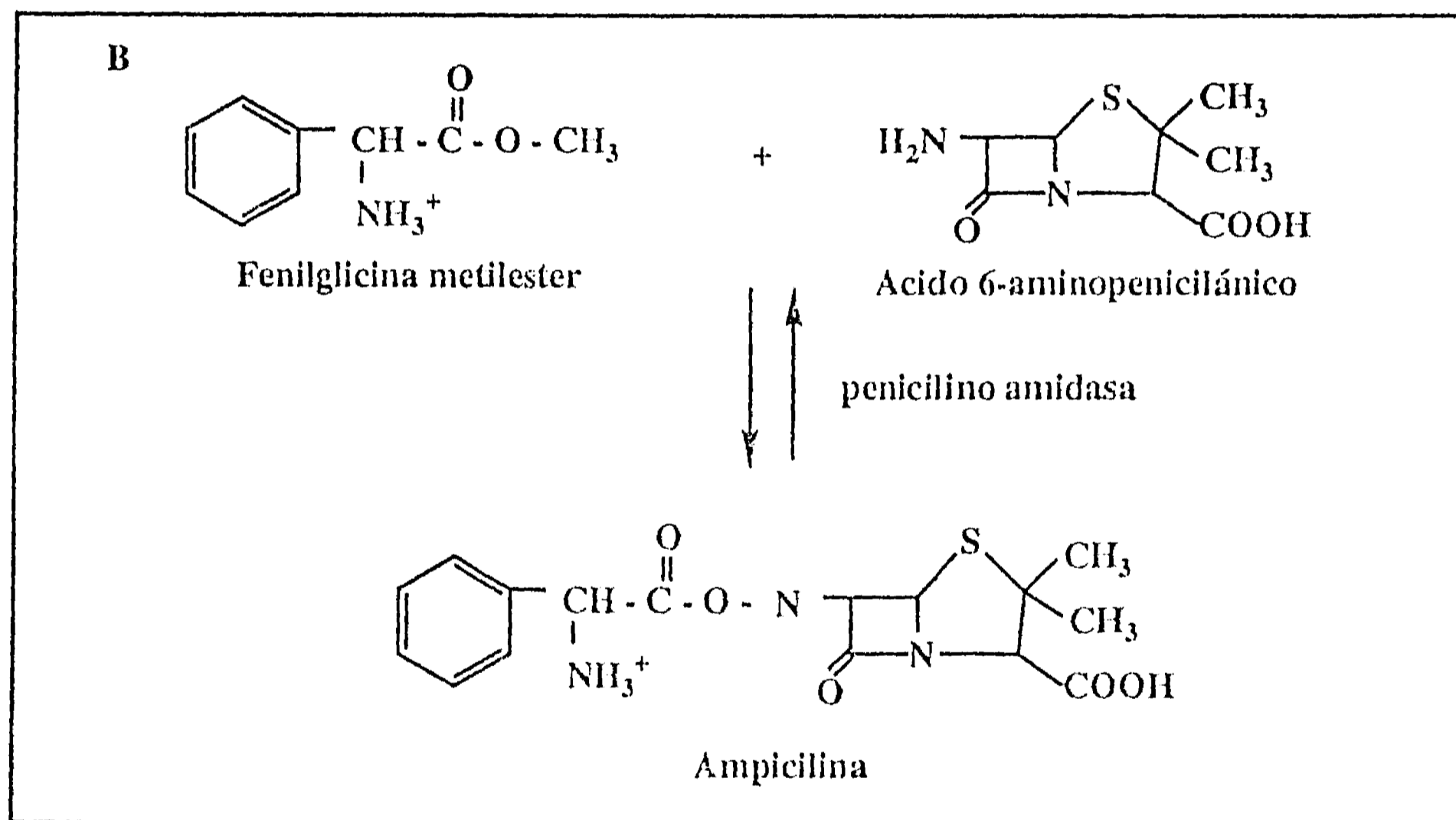
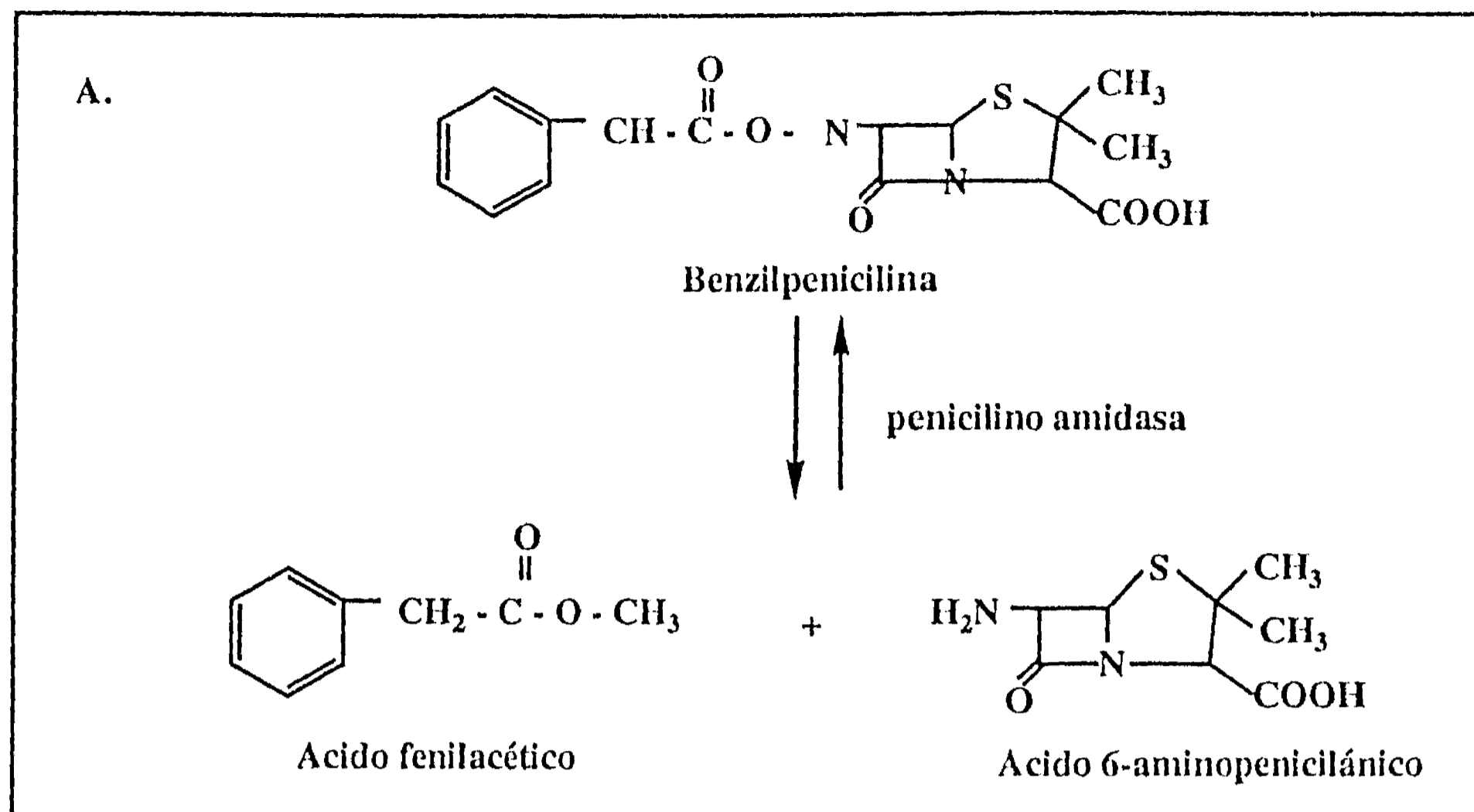


Figura 1. A. Hidrólisis de penicilina G catalizada por penicilino amidasa
 B. Síntesis de ampicilina catalizada por penicilino amidasa.

II. OBJETIVO

En el Instituto de Biotecnología de la UNAM se ha trabajado en el Proyecto de producción de 6-APA con penicilino amidasa de *E. coli*, habiéndose logrado varios aportes importantes en las áreas de ingeniería bioquímica, ingeniería genética, ingeniería enzimática e ingeniería de proteínas.

Inicialmente se desarrolló un biocatalizador con la enzima semipurificada e inmovilizada, con alta actividad específica (130 U/g) y un tiempo de vida media operacional de 1100 horas (Ospina *et al*, 1992), características que lo colocan al nivel de los biocatalizadores empleados industrialmente. Sin embargo, este biocatalizador tiene un alto costo, debido al proceso de purificación y al soporte empleado en su inmovilización. Así mismo su principal problema es la alta sensibilidad al pH. Con el fin de obtener biocatalizadores igualmente eficientes pero más económicos y menos sensibles al pH, se desarrolló un proceso para la producción de un biocatalizador a partir de células inmovilizadas por atrapamiento en agar, utilizando células de *E. coli* ATCC 9637 (Rodríguez *et al*, 1994). Este biocatalizador presenta la ventaja de ser más estable al pH que el biocatalizador de enzima inmovilizada, pero tiene el inconveniente de una baja actividad específica (7-12 U/g), lo cual dificulta su uso a nivel industrial. En el trabajo antes mencionado se demostró que para que un biocatalizador de penicilino amidasa de células pueda ser empleado en la producción de 6-APA se requiere de una cepa que presente al menos una actividad de 0.5 U/mg de proteína. De acuerdo con la estimación de estos autores se lograría entonces producir un biocatalizador con 40 u/g de biocatalizador peso húmedo, con un costo de US\$300/Kg, que podría ser empleado por lo menos durante 150 ciclos de reacción.

Paralelamente, se han realizado estudios de ingeniería genética habiéndose logrado obtener una cepa hiperproductora de penicilino amidasa mediante la construcción del plásmido pPA102, clonando el gen *pic* en un plásmido multicopia, cuya transcripción está bajo el control del promotor del gen *lacZ*. Esto le permite ser inducido por lactosa como única fuente de carbono o por el inductor químico isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Merino, 1992). Con este plásmido se transformó la cepa de *E. coli* JM101, obteniéndose una cepa con una actividad de 0.3 U/mg de

proteína, es decir, aproximadamente 2 veces la obtenida con la cepa silvestre. Este plásmido proviene del plásmido pPAC101, en el cual se expresa la penicilino amidasa como un péptido de fusión con el gen *lacZ*, por lo que su actividad específica es muy baja. Se modificó entonces este plásmido, añadiéndose 4 pares de bases para evitar que los dos genes se expresen en la misma fase de lectura, dando origen al plásmido pPA102. Esta modificación incrementó la actividad al evitar el péptido de fusión.

Por otra parte, Del Rio *et al* (1995), mediante técnicas de ingeniería de proteínas realizaron mutaciones sitio dirigidas al gen *pac*, en el plásmido pPAC101, con el objeto de obtener una enzima más estable al pH alcalino. Para ello realizaron un análisis de secuencias con el fin de establecer los sitios del gen que produjeran mutaciones en la superficie de la proteína para modificar su punto isoelectrico y consecuentemente su pH de estabilidad óptima. Se obtuvo una cepa con mayor estabilidad a pH alcalino, pero con una actividad específica muy baja.

Con el objeto de obtener células con alta actividad penicilino amidasa, Ramírez *et al* (1994,a) trabajando en el área de bioingeniería, desarrollaron un sistema de fermentación por lote exponencialmente alimentado (FLEA), con el cual se logró incrementar 7 veces la actividad de la cepa de *E. coli* recombinante transformada con el plásmido pPA102. El motivo de emplear una FLEA fue el de mantener la velocidad de crecimiento del microorganismo constante a valores muy bajos como 0.01 h^{-1} , sin tener que usar un quimiostato. Así mismo, Ramírez *et al* (1994,b) han establecido las condiciones óptimas de tiempo de inducción y concentración de inductor para la cepa de *E. coli* recombinante mencionada.

Con base en estos antecedentes se plantearon las preguntas:

1. Es posible obtener un biocatalizador de células recombinantes con alta actividad penicilino amidasa utilizando las cepas y metodologías disponibles, y
2. Empleando este biocatalizador es posible realizar la reacción de síntesis de ampicilina obteniendo altos rendimientos.

Para responder estas preguntas nos planteamos el siguiente objetivo: Producción de un biocatalizador de células recombinantes con alta actividad penicilino amidasa y su uso en el estudio de la reacción de síntesis de ampicilina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Producción del biocatalizador

En una primera etapa del trabajo se realizó la selección de la cepa a utilizar, ya que se disponía para el proyecto de varias cepas con potencial. Una primera cepa, *E. coli* JM 101 pPAC102, mencionada con anterioridad, fue producida por ingeniería genética y presenta una actividad alta. La segunda cepa, *E. coli* ATCC 9637, porta el gen de la penicilino amidasa en forma nativa y la tercera cepa, *E. coli* JM101 pPAC101 modificada por ingeniería de proteínas, presenta la ventaja de ser más estable al pH, pero tiene una baja actividad específica. El plásmido pPAC101 mutado se procesó en la misma forma que la primera para obtener el plásmido pPAC102 mutado. Este procesamiento consistió en la digestión del plásmido pPAC101 mutado, con *Hind*III, la cual produce extremos cohesivos, polimerización para interrumpir la fase de lectura entre *lacZ* y *pxc* y posterior ligación. De esta forma se obtuvo el plásmido pPAC102 mutado, el cual posee 4 pares de bases más que el plásmido pPAC101 mutado, pierde el sitio de restricción *Hind*III y adquiere un sitio para *Nhe*I, por lo cual es posible su diferenciación. Esta metodología está descrita en forma detallada por Merino (1992). Con este plásmido se transformó la cepa JM101, aumentando su actividad respecto a la cepa con el plásmido pPAC101 mutado. Sin embargo, aún con esta modificación, la actividad obtenida con esta cepa fué menor a la actividad presentada por la cepa no mutada. Por otra parte, la cepa *E. coli* ATCC 9637, fué transformada con el plásmido pPAC102, intentando obtener una mayor expresión de la actividad, pues en varios reportes se ha comprobado que las cepas que poseen el gen en forma nativa, al tener la maquinaria de procesamiento y transporte, presentan mayor actividad que las que carecen del mismo. Sin embargo, con esta cepa se obtuvieron actividades similares a las obtenidas con la primera, la cual

ya había sido ensayada en fermentación por lote alimentado, por lo cual se decidió realizar el trabajo con esta primera cepa, *E. coli* JM101 pPAC102. Las cepas se compararon en sistema de fermentación en lote alimentado.

Con la cepa seleccionada se realizaron fermentaciones en lote alimentado a nivel de 10L y se inmovilizaron por atrapamiento en agar con el objeto de producir el biocatalizador. El biocatalizador se caracterizó en términos de actividad y estabilidad y se comprobó su uso en reacciones de síntesis de ampicilina e hidrólisis de penicilina.

2. Síntesis de ampicilina

Se plantearon 4 estrategias para obtener altos rendimientos de la reacción de síntesis de ampicilina:

- a) Disminución de la actividad de agua mediante el empleo de cosolventes solubles en medio acuoso, con el objeto de inhibir las reacciones laterales de hidrólisis.
- b) Desplazamiento del equilibrio de la reacción mediante la extracción del producto empleando solventes orgánicos inmiscibles en agua.
- c) Inhibición de la hidrólisis de FGME utilizando metanol como un producto de la reacción.
- d) Inhibición de la hidrólisis de FGME modificando las condiciones de la reacción: pH

III. ANTECEDENTES

CARACTERÍSTICAS DE LA PENICILINO AMIDASA

La penicilino amidasa (E.C.3.5.1.11) es la segunda enzima inmovilizada utilizada a nivel industrial, desde el punto de vista del volumen de enzima empleada. Cataliza la reacción de hidrólisis de penicilina G o V en ácido fenilacético o fenoxiacético y ácido 6-amino penicilánico (6-APA). También se conoce como penicilino amidohidrolasa, penicilino acil transferasa, penicilino acilasa (Hamilton, 1966). Este grupo de enzimas se clasifican con base en el sustrato que hidrolizan preferencialmente (Vandamme and Voets, 1974) en:

- I. Fenoximetilpenicilino (penicilino V) amidasas, que hidrolizan preferencialmente penicilina V.
- II. Bencilpenicilino (penicilino G) amidasas, que hidrolizan preferencialmente penicilina G y
- III. D- α -aminobencilpenicilino (ampicilino) amidasas, que hidrolizan preferentemente ampicilina.

La penicilino amidasa empleada en este trabajo pertenece a las penicilino amidasas del tipo II. Las penicilino G amidasas son producidas principalmente por bacterias, de las cuales las más empleadas según los reportes de la literatura son *E. coli* y *B. megaterium*.

Como se mencionó anteriormente, la penicilino amidasa se ha empleado en un gran número de reacciones de hidrólisis. Margolin *et al* (1980), estudiaron la actividad de la penicilino amidasa de *E. coli* sobre diferentes sustratos, con un grupo fenilacético en la parte acilo. Este estudio se realizó básicamente para caracterizar la enzima y estudiar su espectro de actividad frente a diferentes sustratos. Se encontró que la enzima solo se une a la forma no protonada del sustrato y que los valores de las constantes cinéticas se alejaban de los obtenidos con el sustrato original en la medida que la estructura del grupo donador de acilo era diferente. Shewale and Sivaraman (1989), realizaron una revisión de los diferentes tipos de reacción en los cuales participa la penicilino amidasa. Las reacciones catalizadas por la enzima son reversibles: la reacción hidrolítica es catalizada a pH alcalino (7.5-8.5), mientras que a pH ácido o neutro (4.0-7.0) se promueven las reacciones de acilación. Por esta razón, ha sido reportado el uso de la penicilino amidasa para la transacilación de un gran número de antibióticos β -lactámicos, compuestos fisiológicamente activos

y sus intermediarios. Algunos de estos compuestos tienen elevado potencial de aplicación, como bloqueo y desbloqueo de grupos funcionales de péptidos (aspartame) (Fuganti and Graseli, 1986), resolución de fenilglicina ópticamente activa y otros. En la Tabla 1 se resumen algunos sustratos sobre los cuales puede actuar la penicilino amidasa, en reacciones de hidrólisis, síntesis y resolución de mezclas racémicas.

El papel de la penicilino amidasa *in vivo* permanece sin esclarecer, aunque se ha propuesto que la enzima puede estar involucrada en la asimilación de compuestos aromáticos como fuentes de carbono en organismos de vida libre (Valle *et al*, 1991; Merino *et al*, 1992b). Es una enzima muy interesante, pues es uno de los pocos ejemplos de enzimas de origen proeariote que sufre un procesamiento postransduccional. Es una enzima periplásmica cuya forma activa es un heterodímero de 80 KDaltons. Consiste de dos subunidades heterólogas: la cadena A y la cadena B, que están formadas por 209 y 566 aminoácidos, respectivamente, como producto del procesamiento proteolítico de un precursor común (Böck *et al*, 1983 a,b). Dicho precursor contiene una secuencia señal de 26 aminoácidos para dirigir el transporte de la proteína hacia el citoplasma y un espaciador de 54 aminoácidos entre las cadenas A y B, que influencia el plegamiento final de las cadenas.

Recientemente se reportó la estructura tridimensional de la enzima, encontrándose que posee una serina catalítica en el extremo amino terminal de la cadena B. A diferencia de otras serin-proteasas no posee una histidina adyacente a la serina, por lo que se concluyó que es el grupo amino de la serina el involucrado en la reacción (Duggleby *et al*, 1995).

La producción de penicilino amidasa se encuentra modulada por varios elementos: inducción por ácido fenilacético (Swentirmai, 1964), regulación por fuente de carbono, ya que sufre represión catabólica por glucosa, lactosa, fructosa y glicerol (Vojtisek and Slezak, 1975) y termorregulación (Oh, 1987) obteniéndose la máxima actividad a 28°C.

Tabla 1. REACCIONES CATALIZADAS POR PENICILINO AMIDASA (Shewale, 1990)

MATERIA PRIMA	NUCLEO	MICROORGANISMO	PRODUCTO
HIDROLISIS			
Fenilacetil aspartame		<i>E. coli</i>	aspartame
Fenilacetil insulina		<i>E. coli</i>	insulina
N-e-Fenilacetil vasopresina		<i>E. coli</i>	vasopresina
Fenilacetil-asp- β -bencilester		<i>E. coli</i>	asp- β -bencilester
Fenilacetil. glicina		<i>E. coli</i>	glicina
Fenilacetil glutámico		<i>E. coli</i>	ac. glutámico
SINTESIS			
Fenilglicina metil ester	6-APA	<i>B. megaterium, E. coli</i> <i>K. citrophila</i>	ampicilina
p-hidroxifenilglicina metil ester	6-APA	<i>E. coli, K. citrophila,</i> <i>P. cruciviae</i>	amoxicilina
Acido fenilacético	6-APA	<i>B. circulans, E. coli</i>	bencilpenicilina
Ester α -metilfenoxiacetiltiofénico	6-APA	<i>E. coli</i>	α -fenoxietilpenicilina
Fenilglicina metil ester	7-ADCA	<i>B. megaterium</i>	cefalexina
Acido fenilacético	Gly-Gly	<i>E. coli</i>	fenilacetil gly-gly
RESOLUCION DE COMPUESTOS ORGANICOS			
Fenilacetil DL-fenilglicina		<i>E. coli</i>	L-fenilglicina
Fenilacetil DL-p-hidroxifenilglicina		<i>E. coli</i>	L-p-hidroxifenilglicina
Fenilacetil DL-tirosina		<i>E. coli</i>	L-tirosina

IV. MATERIALES Y METODOS

La mayor parte de la metodología empleada en este trabajo se encuentra descrita en los 3 artículos anexos. A continuación se describen los métodos que no se encuentran completamente desarrollados en dichos artículos.

IV.1. Selección de la cepa de trabajo.

Se realizó mediante comparación de la actividad específica de células obtenidas mediante fermentación en lote y en lote alimentado exponencialmente a una tasa de dilución de 0.1h^{-1} , en un volumen de 1 L, como se describe en Ramírez *et al* (1994a, b).

Se compararon las siguientes cepas:

a) *E. coli* JM101 pPAC102, descrita en Ramírez *et al* (1994a).

b) *E. coli* JM101 pPAC101 mutada por ingeniería de proteínas, descrita en Del Rio *et al* (1995). Esta cepa fue modificada para eliminar un péptido de fusión entre el gen *pac* y *lacZ*. Este procesamiento consistió en la digestión del plásmido pPAC101 mutado con *Hind*III, la cual produce extremos cohesivos, polimerización para eliminar estos extremos y posterior ligación. De esta forma se obtuvo el plásmido pPAC102 mutado, el cual posee 4 pares de bases más que el plásmido pPAC101 mutado, pierde el sitio de restricción *Hind*III y adquiere un sitio para *Nhe*I, por lo cual es posible su diferenciación. Esta metodología está descrita en forma detallada por Merino (1992).

c) *E. coli* ATCC9637, la cual porta el gen de la penicilino amidasa, transformada con el plásmido pPAC102.

IV.2. Síntesis de clorhidrato de FGME.

A la mezcla de fenilglicina (27.5 g, 0.82 mol) en metanol absoluto (800 ml) se añade gota a gota 32.5 (0.273 mol) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 3.5 horas a aproximadamente 50°C. La solución amarillo pálida se deja toda la noche a temperatura

ambiente y se elimina el metanol al vacío para obtener los cristales incoloros de clorhidrato, los cuales son agitados con eter seco, filtrados y secados al vacío. Se determina la pureza por HPLC. Este método produce ester con más de 98% de pureza.

IV.3. Método de HPLC para determinación de FGME y ampicilina.

Columna Novapack C18 de 3.9x150 mm

Fase móvil: metanol al 20% en fosfato de amonio monobásico 50 mM pH 4.3

Flujo de la fase móvil: 0.9 ml/min

Longitud de onda: 220 nm

Tiempos de retención: FGME: 2 min. Ampicilina: 3 min. 6-APA y FG: 1 min.

Curvas de calibración: FGME: 0.2 mg/ml, inyectar de 5 a 20 μ L.

Ampicilina: 0.1 mg/ml, inyectar de 5 a 20 μ L.

IV.4. Determinación de la estabilidad del biocatalizador.

Se colocaron muestras de 0.5 g del biocatalizador peso humedo en 50 ml de buffer fosfatos o acetatos 0.1 M del correspondiente pH, en un baño agitado, a 37 o 55°C y se tomaron muestras en intervalos de tiempo adecuados para determinar la actividad por el método descrito por Ospina *et al* (1992).

V. RESULTADOS

Dado que los resultados del presente trabajo se encuentran consignados en los 3 artículos anexos, en esta parte del trabajo se realizará la presentación de dichos artículos, incluyendo antecedentes que permiten visualizar la importancia de los resultados obtenidos, así como un resumen de los principales resultados discutidos en cada uno de ellos.

V. 1. PRODUCCION DE BIOCATALIZADORES DE PENICILINO AMIDASA

PRESENTACION DEL ARTICULO: Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: production, characterization and use in the synthesis and hydrolysis of antibiotics.

Células o enzima inmovilizada

Para que un biocatalizador sea competitivo con los existentes en el mercado, en general debe ser reutilizable por un alto número de veces de tal forma que tenga una productividad elevada. En particular este hecho se vuelve importante en el caso de la penicilino amidasa por los altos costos de la penicilina con respecto al precio de venta del 6-APA. Esta situación genera un margen de utilidad pequeño, por lo que el costo de la enzima debe incidir lo menos posible en el costo de producción para poder hacer el proceso rentable, lo que solo se logra si el biocatalizador tiene un alto grado de reutilización. Se han realizado varias revisiones acerca de los biocatalizadores de penicilino amidasa empleados a nivel industrial (Shewale and Sivaraman, 1989; Ospina *et al*, 1992). En estos estudios se observa que los biocatalizadores empleados a nivel industrial tienen productividades entre 100 y 2000 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, con actividades que oscilan entre 100 y 300 U/g de biocatalizador y tiempos de vida media de 1000 a 2000 horas, cuando son empleados entre 1 y 2 tiempos de vida media. La mayor parte de ellos se producen a base de enzima purificada e inmovilizada por métodos químicos (enlace covalente, entrecruzamiento) y físicos (atrapamiento, adsorción) a diversos soportes y solo una pequeña parte se produce por inmovilización de células completas.

La producción de biocatalizadores de enzima purificada e inmovilizada en general es un proceso costoso y conlleva muchos pasos. La purificación parcial de una enzima puede constar en promedio de 4 a 8 pasos, algunos de los cuales requieren equipos especializados. Por otro lado, para la inmovilización se requiere de soportes que tienen un alto costo. Por estas razones, el proceso de producción de los catalizadores es costoso y para que el biocatalizador pueda ser empleado a nivel industrial debe tener un tiempo de vida media elevado. De poder contar con un biocatalizador de células inmovilizadas, se disminuirían los costos en alto grado y en general el proceso de producción resultaría mucho más sencillo. Sin embargo, para que un biocatalizador de células inmovilizadas pueda ser empleado a nivel industrial es necesario contar con una cepa de alta actividad específica.

Klyosov (1989), reporta dos biocatalizadores industriales producidos a partir de células inmovilizadas: el producido por Tanabe Seiyaku Co. con células de *E. coli* atrapadas en poliacrilamida y el producido por una industria china, también con células de *E. coli* atrapadas en agar. Rodríguez (1992), llevó a cabo una extensa revisión de los biocatalizadores de penicilino amidasa producidos a partir de células completas, reportados en la literatura. En la mayoría de los casos se utilizan métodos de atrapamiento en diferentes materiales: poliacrilamida, carragenina, Eudragit®, quitosano, gelatina y agar, lográndose biocatalizadores con actividad baja (10-40 U/g) y tiempos de vida de 10-15 días. El hecho de que pocos procesos utilicen células inmovilizadas con actividad penicilino amidasa como catalizador es debido básicamente a la baja actividad de las cepas silvestres, la cual oscila entre 0.1 y 0.2 U/mg de proteína. Rodríguez *et al* (1994) realizaron un estudio de tipo económico de los requerimientos de una cepa con actividad penicilino amidasa encontrando que se requiere una cepa con actividad de al menos 0.5 U/mg de proteína para producir un biocatalizador apto para ser empleado a nivel industrial en este proceso. Este nivel de actividad no se ha logrado obtener con las cepas silvestres conocidas.

Sobreproducción de penicilino amidasa

Dada la importancia de contar con una cepa que presente alta actividad de penicilino amidasa, se han hecho varios intentos por obtener cepas hiperproductoras. En la Tabla 2 se presenta una revisión de los trabajos reportados al respecto, los cuales incluyen técnicas de genética clásica, biología molecular, así como de bioingeniería. En resumen, se ha logrado incrementar hasta 57 veces la actividad de la cepa silvestre. Sin embargo, los niveles de incremento de actividad se refieren a la cepa nativa que en muchos de los casos carecen de actividad, por lo que, a pesar del fuerte incremento, la actividad específica alcanzada en general sigue siendo baja (entre 0.01 y 0.2 U/mg).

Mediante técnicas de genética clásica se ha realizado mutagénesis generalizada con agentes químicos o físicos, logrando incrementar hasta 2-3 veces la actividad de cepas nativas (Merino et al, 1992). Los mejores resultados se han obtenido con mutaciones que producen cepas con expresión constitutiva del gen, reportándose así incrementos hasta de 20 veces en la actividad. Mediante la tecnología de DNA recombinante ha sido posible aislar el gen *pac*, clonarlo en plásmidos multicopia, determinar su secuencia nucleotídica, modificar sus señales de regulación e incluso sustituirlas por las de otros genes. Sin embargo, las actividades obtenidas con estas modificaciones no han sido tan altas como las esperadas, debido principalmente a factores tales como la inestabilidad del plásmido recombinante, la saturación de los mecanismos de transporte y el procesamiento del precursor (Merino, 1992a). Lee and Chang (1988), utilizaron un sistema de fermentación continua con recirculación de células, el cual permite obtener alta densidad celular, logrando una concentración de células de hasta 95 g/l, con actividades de 0.1 U/g. Son realmente escasos los estudios de bioingeniería en los cuales se reporta un incremento en la actividad de penicilino amidasa empleando cepas recombinantes. Recientemente, Robas *et al* (1993) reportan la obtención de una cepa hiperproductora utilizando una mezcla de métodos de genética clásica e ingeniería genética, consistente en la mutación con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina de la cepa *E. coli* ATCC11105 y posterior transformación de esta cepa con el plásmido pXL20, que porta el

Tabla 2. SOBREPDUCCION DE PENICILINO AMIDASA

METODO DE MODIFICACION Cepa	Plásmido o tratamiento de mutación	Actividad	Actividad Veces de incremento	Biomasa	Referencia
GENETICA CLASICA					
<i>E. coli</i> ATCC11105	Nitrosoguanidina No represión glucosa		8	DO:10	Robas <i>et al</i> , 1993
<i>B. megaterium</i> ATCC14945	UV Constitutiva	0.76U/ml 0.076U/mg	4		Son <i>et al</i> , 1982
<i>E. coli</i> ATCC 9637	Constitutiva		20		Sikyta, 1981
INGENIERIA GENETICA					
<i>E. coli</i> ATCC11105	Derivado de pBR322 Nitrosoguanidina No represión glucosa	0.08U NIPAB/mg	13	DO:10	Robas <i>et al</i> , 1993
<i>E. coli</i> HB101	pGA611	0.06 U/ml	6	4,6 g/l	Zhang <i>et al</i> , 1990
<i>E. coli</i> C600	pGA611	0.185 U/ml	18.5	7.6 g/l	
<i>E. coli</i> AS1.76	pGA611	0.895U/ml	5	11.1 g/l	
<i>E. coli</i> E110	pGA611	1.25U/ml	6	12.5 g/l	
<i>E. coli</i> HB101	pPGA1		4.5		García and Buesa, 1986
<i>E. coli</i> SE5000	pKA3		57		
BIOINGENIERIA					
<i>E. coli</i>	Recirculación células	0.1U/mg		95 g/l	Lee and Shang, 1988
<i>E. coli</i> JM101, lote	pPA102	1.96 u/mg	1.5	6 g/l	Ramírez <i>et al</i> , 1994a
<i>E. coli</i> JM101, lote expon. alimentado	pPA102	0.29 u/mg	10	6 g/l	Ramírez <i>et al</i> , 1994b

gen *pxc*. Se obtiene así un incremento de 13 veces en la actividad. Como se puede apreciar, los avances obtenidos para incrementar la actividad de las cepas mediante técnicas de ingeniería genética no han sido tan espectaculares, razón por la cual el uso de catalizadores de células con actividad penicilino amidasa sigue siendo poco viable. La inestabilidad de los plásmidos y la saturación de los mecanismos de exportación (procesamiento) son dos posibles causas de esta situación.

Atrapamiento de las células

Una vez que se cuenta con una cepa de actividad elevada, el proceso de inmovilización debe permitir una eficiente expresión de la actividad, para lo cual se debe controlar el tamaño de partícula de tal forma que se eviten los problemas difusionales. Por otro lado, la metodología de producción deberá tener factibilidad técnica, es decir, sencilla de realizar y fácil de escalar. La técnica más factible para llevar a cabo la inmovilización de células completas es el atrapamiento en gel, ya que es relativamente sencilla y de bajo costo. No obstante, entre sus principales desventajas está su difícil escalamiento y el control del tamaño de partícula. Sin embargo, esta técnica ha logrado superar en parte, algunas de estas desventajas (Rodríguez *et al* , 1994; Castillo *et al*, 1991). Los métodos de inmovilización por atrapamiento desarrollados hasta la fecha, permiten obtener partículas de diversos tamaños y formas, con la posibilidad de su manipulación. Se pueden dividir en dos categorías: extrusión (manual o automática) y dispersión líquido-líquido o líquido-gas.

La extrusión manual es la más utilizada. Consiste en alimentar la suspensión células-polímero a través de tubos capilares a soluciones gelificantes (soluciones de calcio para alginato de sodio o potasio para carragenina, o soluciones curtientes a temperatura baja). Con esta técnica el flujo de alimentación de la suspensión células/biopolímero es baja y la productividad depende ampliamente del número de capilares empleados y el tamaño de partícula obtenido varía entre 2 y 4 mm.

Audet y Lacroix (1989) y Castillo *et al* (1991), reportan la producción de biocatalizadores esféricos por dispersión de la suspensión células-gel en aceite. Después de cierto tiempo de mezclado, se enfría el sistema para inducir la gelificación. La dispersión y tamaño de partícula dependen de las condiciones hidrodinámicas y temperaturas del sistema, relación fase acuosa/fase oleosa, y velocidad de mezclado, entre otras.

Como ya se mencionó, el alto costo de los biocatalizadores de penicilino amidasa semipurificada, junto con el bajo límite de utilidades en el proceso indican que los biocatalizadores de penicilino amidasa deben tender a ser producidos a partir de células completas, para lograr los menores costos y facilidad en los procesos de producción. Para ello es condición *sine qua non* disponer cepas que tengan alta actividad específica, con el objeto de obtener biocatalizadores con la mayor actividad posible.

En la primera parte de este trabajo, se desarrolló la producción de un biocatalizador de penicilino amidasa por inmovilización de células de *E. coli* recombinantes, las cuales portan el gen de la penicilino amidasa bajo la regulación del promotor del gen *lacZ*. Con esta cepa se realizaron fermentaciones en lote exponencialmente alimentado, controlando la velocidad de crecimiento a valores muy bajos (0.01h^{-1}), habiéndose alcanzado una actividad específica de 2U/mg , que resulta muy alta comparada con las reportadas en la literatura. Las células fueron inmovilizadas por atrapamiento en agar, obteniendo un biocatalizador con una actividad de 100 U/g (empleando penicilina a pH 7.8 y 37°C) y un tamaño de partícula entre 0.17 y 0.3 mm, con un factor de efectividad mayor de 0.75. La enzima en este catalizador presenta un tiempo de vida media de 1100 horas a pH entre 5 y 7.0 a 37°C , lo que resulta comparable con los biocatalizadores de enzima purificada reportados (Ospina *et al*, 1992). Tiene la ventaja de que su costo es reducido pues se evita la purificación de la enzima y el uso de soportes costosos. El catalizador fue probado en reacciones de hidrólisis de penicilina, alcanzando un 95% de conversión en un tiempo de 1.5 horas con una carga de enzima similar a la empleada con el biocatalizador de enzima purificada (100 U/g PGK). Así mismo, se comprobó su uso en reacciones de síntesis de ampicilina, en las

condiciones citadas en la literatura, alcanzando un rendimiento de 50% en 2 horas. El resultado de este trabajo fué publicado en *Biotechnology Letters*, 1995, 17,6, 615-620, con el título: Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: production, characterization and use in the synthesis and hydrolisis of antibiotics. Ospina, S., Merino, E., Ramírez, O.T. and López-Munguía, A.

V. 2. ESTRATEGIAS EN LA SINTESIS DE AMPICILINA

PRESENTACION DE LOS ARTICULOS:

1. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin. A whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst.
2. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase.

La síntesis de ampicilina a nivel industrial se lleva a cabo por procesos químicos en los cuales se requiere de condiciones drásticas de temperatura, condiciones anhidras y uso de solventes tóxicos, así como de empleo de derivados activados de la fenilglicina, que por otro lado son muy inestables. En la Tabla 3 se muestra los diferentes métodos de síntesis química de ampicilina, especificando el número de pasos y los reactivos empleados. Como se aprecia en esta tabla, en general los métodos químicos son muy complejos, requiriendo entre 10 y 20 pasos, tienen rendimientos entre 15 y 80% y emplean solventes tóxicos, así como bajas temperaturas. Entre éstos, los más empleados a nivel industrial ya que resultan en altos rendimientos, son los que utilizan cloruro clorhidrato de fenilglicina.

Son pocos los trabajos publicados referentes a la síntesis enzimática de ampicilina. Se ha reportado el uso de dos enzimas para la síntesis de ampicilina: penicilino amidasa de *E. coli* (Cole, 1969; Kasche, 1985), de *Kluyvera citrophila* (Okachi, *et al*, 1983) y de *Pseudomonas melanogenum* (Okachi *et al*, 1973) y la D-fenilglicil- β -lactamido amidohidrolasa de *Xantomonas sp* (Blinkovsky *et al*, 1993). En la Tabla 4 se aprecian las características cinéticas de algunas de ellas en reacciones de hidrólisis de diferentes sustratos. Como puede observarse, la penicilino

Tabla 3. METODOS DE SINTESIS QUIMICA DE AMPICILINA

RUTA	No. DE PASOS	RENDIMIENTO (%)	TIEMPO (h)	REACTIVOS TOXICOS O CONDICIONES DRASTICAS
1. Condensación de 6-APA con α -fenilglicina protegida Doyle <i>et al</i> , 1962	23	50	18	Corriente de hidrógeno
2. Reducción por hidrogenación catalítica de bromuro de α -bromofenilacetilo. Kaufman, 1963	23	60	9	Azida de sodio, hidrógeno, 0°C.
3. Reducción con hexametilentetramina de bromuro de α -bromofenilacetilo. Soulal, 1964	19	15	10	Cloroformo, hexametilentetramina, 0°C.
4. Vía metil-N-(α -carboxibencil)- β -amino crotonato Florey, 1973	11	53	12	Acetona, acetato de metilo, diclorometano, atmósfera de CO ₂
5. Vía cloruro-clorhidrato de α -fenilglicina con cloruro de trimetilsilicio en diclorometano Johnson, 1964	14	80	13	0°C, cloroformo, diclorometano, acetona, isopropanol
6. Vía cloruro-clorhidrato de α -fenilglicina con trimetil silicio en dimetil anilina Novak, 1963	12	80	14	Diclorometano, dimetil-anilina
7. Vía cloruro-clorhidrato de α -fenilglicina en acetona Triana <i>et al</i> , 1992	14	43	8	-30°C, acetona, metil-isobutilcetona

Tabla 4. Características cinéticas de enzimas utilizadas en la síntesis de Ampicilina

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	Reacción	Referencia
Penicilino amidasa, <i>E. coli</i> ¹	48	4.6×10^{-3}	Hidrólisis PGK	Margolin <i>et al</i> , 1980
Penicilino amidasa, <i>E. coli</i> ¹	11	0.1	Hidrólisis Ampicilina	Margolin <i>et al</i> , 1980
D-fenilglicil- β -lactamido amidohidrolasa ²	1000	3.6	Hidrólisis FGME	Blinkosvsky and Markarian, 1993
D-fenilglicil- β -lactamido amidohidrolasa ²	17.5	0.6	Hidrólisis Ampicilina	Blinkosvsky and Markarian, 1993
α -aminoacido ester hidrolasa, <i>Xantomonas citri</i>	128 μ mol/min. mg prot.		Hidrólisis Ampicilina	Kato <i>et al</i> , 1980

¹ pH 7.5, 25°C

²pH 6.0, 25°C

amidasa de *E. coli* es más afin por su sustrato original (penicilina) que por la ampicilina, para la cual presenta un mayor valor de K_m y un menor valor de K_{cat} . La D-fenilglicil- β -lactamido amidohidrolasa de *Xantomonas sp.* tiene una mayor afinidad por la ampicilina que por la FGME, pero un K_{cat} inferior, es decir, que hidroliza con mucha mayor velocidad a la FGME. No han sido reportadas constantes cinéticas para la síntesis de ampicilina.

La baja solubilidad y bajo pK del grupo ácido de la fenilglicina hacen prácticamente imposible la síntesis de ampicilina con penicilino amidasa a partir de fenilglicina libre, por lo que los primeros trabajos tuvieron como objetivo la selección de un derivado activado de la fenilglicina. Varios autores (Cole, 1969; Kasche, 1986) han demostrado que el mejor grupo para realizar la transferencia de la fenilglicina al 6-APA es el derivado metil ester. Así mismo, han puesto de manifiesto que la enzima tiene una buena afinidad por este compuesto para la hidrólisis, por lo que el rendimiento de la reacción solo es elevado si se usa en exceso. Esta es la estrategia más utilizada en diversos reportes para aumentar el rendimiento de la reacción.

Otra estrategia que ha sido empleada para este fin, consiste en la inhibición de la reacción de hidrólisis mediante el uso de metanol. Kasche (1985), quien utiliza un biocatalizador de penicilino amidasa de *E. coli* inmovilizada en Eupergit C, realiza la síntesis de ampicilina a pH 7.5 y 25°C y logra un incremento de 9% en la conversión de la reacción cuando emplea metanol al 10%, a concentraciones de 6-APA y de FGME de 200 y 300 mM, respectivamente. De acuerdo con estos autores se regenera el sustrato activado por transferencia de la fenilglicina al metanol, la cual en ausencia de alcohol es deacilada en agua. Este es el único autor que reporta el uso de solventes como estrategia para aumentar el rendimiento de la reacción de síntesis de ampicilina. Existen pocos reportes referidos al uso de solventes en reacciones de síntesis de antibióticos: uno es el reportado por Hiung *et al* (1993), en la reacción de síntesis de cefalexina. Este autor reporta un incremento de 270% en la conversión de la síntesis de cefalexina con α -amino ácido ester hidrolasa de *Xantomonas citri* al emplear sorbitol al 20%, debido a una disminución de la actividad de agua a 0.97. Sin embargo, este incremento corresponde a un aumento de 20 a 60% de

conversión, es decir, el rendimiento en solución acuosa es muy bajo. El otro caso es el reportado por Fernandez Lafuente *et al* (1991), quienes estudian la reacción de síntesis de penicilina, a partir de 6-APA y ácido fenilacético. Esta reacción depende del pK del AFA, pues solo la forma disociada del compuesto es capaz de unirse a la enzima; el pK del AFA es 4.1, por lo cual la reacción solo puede ser llevada a cabo a pH bajo, cercano a 5, donde existe suficiente compuesto en forma no disociada y la enzima aún tiene actividad. Estos autores utilizan solventes como la dimetilformamida, el cual modifica el pK del AFA hasta 5.75 en presencia de 50% de solvente, lo que permite alcanzar rendimientos de hasta un 80% a pH 6.5, donde la velocidad de reacción es mayor. Sin embargo, esta estrategia no es posible para la síntesis de ampicilina a partir de fenilglicina y 6-APA debido a que el pK de la fenilglicina es de 2.1 y se incrementa solo hasta 3.1 en presencia de dimetilformamida al 50%.

Otra alternativa, no por obvia menos importante para incrementar el rendimiento de la reacción de síntesis, consiste en la optimización de las condiciones de la reacción: pH y temperatura. Los reportes en este aspecto se limitan a señalar las condiciones óptimas empleadas en cada trabajo. Estas condiciones coinciden en la temperatura, en un valor relativamente bajo (25°C), si lo comparamos con la temperatura empleada en la hidrólisis de penicilina (37°C). Esto se debe a que al incrementar la temperatura, se incrementa la relación hidrólisis/síntesis, disminuyendo el rendimiento. El único reporte referente a una optimización de la temperatura, así como del pH, es el publicado por Boccu *et al* (1991), quienes emplean un método estadístico, incluyendo además en el estudio la relación de concentración de sustratos. Estos autores encuentran que las condiciones óptimas son de una temperatura de 25°C, una relación 1:2 de 6-APA:FGME y concluyen además que no es necesario un control de pH pues entre 6 y 8 no se ve afectado el rendimiento. Los demás reportes sobre la síntesis de ampicilina son realizados a pH fijos y únicamente se reportan como los óptimos.

Isaka *et al* (1995), realizan un estudio donde se compara la transferencia de dos sustratos: metilfenilacetato y metilcloroacetato al ácido 7-amino-3-deacetil cefalosporánico (7-ACA) por la

penicilino amidasa de *Bacillus megaterium*. Estos autores encontraron que es posible obtener un alto rendimiento de la reacción de transferencia utilizando el metileloroacetato (95%) pues la enzima hidroliza muy poco a este compuesto, a diferencia del metilfenilacetato, cuyo máximo rendimiento es 45%, ya que es hidrolizado eficientemente. Las velocidades de hidrólisis corresponden a 2.6 y 44 mmol/min por mg de enzima, respectivamente, mientras que la velocidad de transferencia es muy parecida para los dos compuestos (40 y 60 mmol/min por mg de enzima, respectivamente). Este es un reporte novedoso de como, modificando el sustrato se puede incrementar el rendimiento por modificación de la especificidad hacia reacciones laterales.

En este trabajo se emplearon 3 estrategias con el objeto de incrementar el rendimiento de la síntesis de ampicilina, usando el biocatalizador de penicilino amidasa de *E. coli* reportado en la primera parte de esta tesis.

1. *Disminución de la actividad de agua.*

Se partió de las condiciones mencionadas en la literatura, es decir una temperatura de 25°C, un pH de 7.0 y una concentración de sustratos, 6-APA 50 mM y FGME 150 mM. En estas condiciones, se obtuvo un 50% de conversión en la reacción. Empleando este sistema se estudió el efecto de diferentes cosolventes con el objeto de disminuir la actividad de agua, empleando concentraciones de hasta 80% del cosolvente. Sin embargo, no fue posible lograr incrementar la conversión, e inclusive en algunos casos se ocasionó una disminución de la velocidad de reacción, por lo que el tiempo requerido para obtener esta conversión era mayor. Estos solventes que afectan la actividad enzimática disminuyen en igual proporción la velocidad de hidrólisis del sustrato (FGME) que la de síntesis de ampicilina.

2. Cinética de la reacción de síntesis de ampicilina.

Efecto del metanol como inhibidor de la hidrólisis.

Como se ha mencionado, la reacción de síntesis de ampicilina por transferencia de la fenilglicina de FGME al 6-APA con penicilino amidasa, está acompañada por reacción de hidrólisis del sustrato (FGME), la cual tiene como producto el metanol. Se estudió el efecto del metanol como inhibidor en las reacciones de síntesis de ampicilina e hidrólisis de FGME y se encontró que es un inhibidor no competitivo de la hidrólisis de FGME y que las mejores condiciones se obtienen a 20% de metanol, donde la inhibición de la hidrólisis en relación a la inhibición de la síntesis de ampicilina es óptima, lograndose un incremento del 5% en la conversión. Mayores concentraciones de metanol inhiben fuertemente la velocidad de síntesis y además tienen efecto sobre la estabilidad de la enzima.

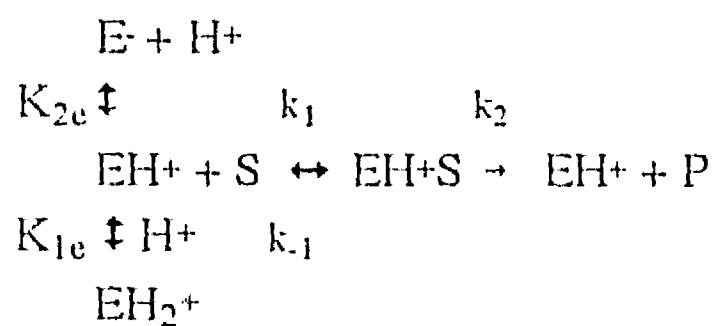
3. Reacción-extracción.

La tercera estrategia para incrementar el rendimiento de la reacción consistió en la extracción del producto con el objeto de evitar que la reacción alcance el equilibrio. El principal inconveniente de esta estrategia es la alta hidrofiliidad de la ampicilina, lo que hace difícil su extracción por un solvente; los solventes en que es soluble (butanol, metilisobutilectona) presentan un efecto muy drástico sobre la actividad y estabilidad de la enzima. Además, la ampicilina presenta coeficientes de partición menores a 1, por lo cual no solo la velocidad de la reacción en presencia de los solventes es muy baja, sino que conlleva a rendimientos muy bajos y una pobre extracción. Con el sistema polietilenglicol:fosfatos en el cual el coeficiente de partición de la ampicilina es mayor a 1 y la actividad del catalizador es igual a la que presenta en medio acuoso, se tiene el inconveniente de que los sustratos también tienen coeficientes de partición mayores a 1, lo cual hace que el sistema se comporte como de dos fases acuosas en las cuales se reparten de igual forma tanto sustratos como producto, obteniendo la misma conversión.

Los resultados de esta parte del trabajo se consignan en el artículo: "Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: A whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst" que ha sido aceptado para ser publicado por Elsevier en los Proceedings del Congreso: Immobilized cells: basics and applications, que se llevará a cabo en Holanda en noviembre/95.

4. Condiciones de la reacción. pH.

Se han propuesto varios modelos para explicar el efecto del pH en la actividad enzimática (Segel, 1975; Roberts, 1977). El más sencillo se refiere a la disociación de la enzima libre, planteando un mecanismo en el que la enzima se puede encontrar en tres estados de disociación, siendo solo uno de ellos capaz de unirse al sustrato para catalizar la reacción. La ecuación que describe este comportamiento es la siguiente:



De este mecanismo es posible obtener el siguiente modelo:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \quad (1)$$

$$v = \frac{k_2 [E_0] [S]}{[S] + K_s (1 + ([H^+]/K_{1e}) + (K_{2e}/[H^+]))} \quad (2)$$

$$\text{donde } V_{\max} = k_2[E_0] \quad (3)$$

con $K_s = k_{-1}/k_1$, E_0 la concentración total de enzima y K_{1e} y K_{2e} las constantes de equilibrio de dos formas inactivas de la enzima, función del pH (protonada y desprotonada)

$$y \quad K_m = K_s \left(1 + [H^+] / K_{1e} + K_{2e} / [H^+] \right) \quad (4)$$

A bajos valores de pH la concentración de protones es muy alta, haciendo muy pequeño al término que contiene a K_{2e} . Tomando logaritmos, se obtiene entonces la ecuación de una línea recta, cuya pendiente al graficar pK_m vs pH es igual a uno:

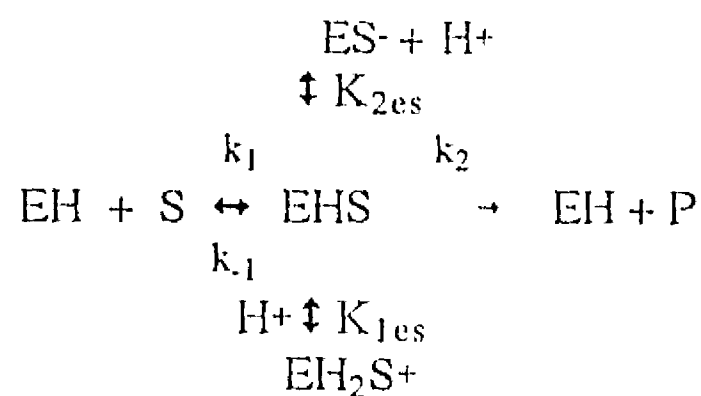
$$pK_m = pK_s + pH - pK_{1e} \quad (5)$$

Procediendo de igual forma a altos valores de pH, se elimina el término que contiene a la K_{1e} dando lugar a la ecuación:

$$pK_m = pK_s + pK_{2e} - pH \quad (6)$$

que presenta una línea recta de pendiente -1, al graficar pK_m vs pH.

Un segundo modelo contempla la ionización del complejo enzima-sustrato, representado por el mecanismo siguiente:



Este mecanismo da lugar al siguiente modelo:

$$v = \frac{V_{ap} [S]}{K_m + S} \quad (7)$$

o bien:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S] \left\{ 1 + ([H^+]/K_{1es}) + (K_{2es}/[H^+]) \right\}} \quad (8)$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s \{1 + (K_{2e}/[H^+]) + ([H^+]/K_{1e})\} + [S] \{1 + ([H^+]/K_{1es}) + (K_{2es}/[H^+])\}} \quad (16)$$

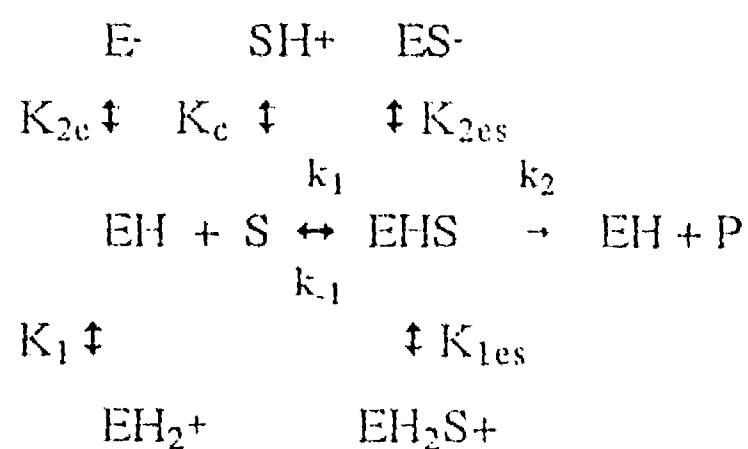
donde:

$$V_{ap} = \frac{V_{\max}}{1 + ([H^+]/K_{1es}) + (K_{2es}/[H^+])} \quad (17)$$

$$K_m = K_s \frac{1 + (K_{2e}/[H^+]) + ([H^+]/K_{1e})}{1 + ([H^+]/K_{1es}) + (K_{2es}/[H^+])} \quad (18)$$

En este caso, mientras que V_{ap} varía con el pH, la variación de K_m con el mismo parámetro depende de la diferencia entre las constantes de disociación de la enzima libre y las del complejo enzima-sustrato: entre más cercanos sean sus valores, menor será la dependencia del K_m con el pH.

Cuando tanto la enzima como el sustrato se disocian, se deben corregir las constantes por un término de pH que depende del estado de ionización del sustrato.



Por lo tanto, la ecuación que describe este mecanismo sería:

$$v = \frac{V_{ap} S'}{K_m + S'} \quad (19)$$

$$\text{donde } S' = S/(1 + [H^+]/K_c) \quad (20)$$

Por lo tanto, la ecuación que toma en consideración a las constantes de disociación de la enzima libre, del complejo enzima-sustrato y del sustrato, sería la siguiente:

$$v = \frac{V_{\max}S'}{K_s (1 + (K_{2e}/[H^+]) + ([H^+]/K_{1e})) + S'(1 + ([H^+]/K_{1es}) + (K_{2es}/[H^+]))} \quad (21)$$

Es decir:

$$v = \frac{V_{\max} S f_s}{K_s f_e + S f_{es} f_s} \quad (22)$$

donde:

$$f_s = (1 + [H^+]/K_c)$$

$$V_{ap} = V_{\max}/f_{es}$$

$$f_e = (1 + (K_{2e}/[H^+]) + ([H^+]/K_{1e}))$$

$$K_m = K_s (f_e f_s / f_{es})$$

$$f_{es} = (1 + ([H^+]/K_{1es}) + (K_{2es}/[H^+]))$$

$$V_{ap}/K_m = V_{\max}/K_s f_e f_s$$

De acuerdo a Blinkovsky (1993), la hidrólisis de FGME y de cefalexina con la D-fenilglicil- β -lactamida amidohidrolasa de *Xantomonas sp* siguen el cuarto modelo propuesto, en el cual la forma que reconoce la enzima es la forma disociada del sustrato. Por esta razón, la gráfica de V_{\max}/K_m presenta pendientes menores a 1 a valores de pH altos y bajos.

Se observó que existe un fuerte efecto del pH en la reacción de síntesis de ampicilina. Estos resultados se encuentran descritos en el tercer artículo: Effect of pH in the synthesis of ampicillin. Por esta razón se estudió el efecto del pH en las reacciones de hidrólisis de FGME y de síntesis de ampicilina, encontrando que la hidrólisis de FMGE depende de la forma de disociación tanto de la enzima libre como del complejo enzima-sustrato y que no depende de la disociación del sustrato, o sea que esta reacción sigue el tercer modelo propuesto, lo que se deduce de las gráficas de $\log V_{\max}$ vs pH y $\log V_{\max}/K_m$ vs pH, en las cuales la pendiente a valores de pH muy bajos y muy altos es igual a 1. Esto coincide con el mecanismo de acción propuesto para la hidrólisis de penicilina.

Además, se propone que la síntesis de ampicilina también depende de la forma de disociación de la enzima y del complejo enzima sustrato y que probablemente depende de la disociación del 6-APA, con base en el mecanismo propuesto. Esto implica que se puede aplicar el cuarto modelo, según el cual el 6-APA debe encontrarse en la forma no disociada para poder unirse a la enzima y reaccionar con el intermediario acilo enzima.

El hecho más importante en relación al pH es que afecta en forma distinta las dos reacciones que ocurren simultáneamente, lo que permite controlar en forma selectiva la reacción de hidrólisis, habiéndose logrado una conversión de 60%, con el solo hecho de controlar el pH a 6.0 en lugar de hacerlo a 7.0. Este hecho se ve realizado a mayores concentraciones de sustratos, lográndose un incremento hasta de 75% en el rendimiento de la reacción a este pH, como consecuencia de una menor hidrólisis del sustrato. Este hecho no ha sido publicado con anterioridad. Los resultados de esta parte del trabajo se publicarán en el artículo: Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase, que será enviado para su publicación en la revista *Enzyme & Microbial Technology*.

Cinética de la reacción de síntesis de ampicilina

En esta parte del trabajo se desarrolló un modelo cinético para la reacción de síntesis, encontrando, de las gráficas de inverso de velocidad inicial vs inverso de la concentración de los 2 sustrato, que esta reacción sigue un modelo de segundo orden, de tipo ordenado. Para la hidrólisis de la ampicilina producida, se propuso un modelo tipo Michaelis-Menten, con inhibición competitiva por fenilglicina y no competitiva por 6-APA. Finalmente para la hidrólisis de FGME, que también se describió por un modelo tipo Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por metanol. Se calcularon las constantes cinéticas y se integraron las ecuaciones diferenciales en el programa ISIM y mediante ajustes efectuados en el programa Sigma Plot, se calcularon las concentraciones de sustrato y producto que predice el modelo para diferentes condiciones de reacción. El modelo se ajusta a bajas concentraciones de sustrato, a mayores concentraciones existe

discrepancia entre los resultados experimentales y los que predice el modelo. Por medio de iteraciones se estableció cuál es el factor que influye en esas diferencias encontrando que se trata de las constantes de la hidrólisis de ampicilina. Los valores de K_m para la hidrólisis de ampicilina y FGME obtenidos en este trabajo son mayores que los reportados en la literatura, presentados en la Tabla 4, indicando una menor afinidad de la enzima por estos sustratos. Estos resultados se presentan en el artículo mencionado.

VI. CONCLUSIONES

Producción del biocatalizador

1. Se realizó la selección de la cepa de trabajo con base en la actividad de las cepas disponibles.
2. Se comprobó que el procesamiento del plásmido pPAC101 mutado, permite una mayor expresión de la actividad penicilino amidasa, sin embargo, esta actividad es menor a la lograda con el plásmido pPAC102 no mutado.
3. Se obtuvieron células de *E. coli* JM101 pPAC102 con una actividad de 2 U/mg por fermentación en lote exponencialmente alimentado, mediante el control de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo.
4. Se contestó la primera pregunta planteada ya que se desarrolló un biocatalizador de células recombinantes de *E. coli* con actividad penicilino amidasa, por atrapamiento en gel, comparable en actividad (100 U/g) y estabilidad (1,100 h) con los empleados industrialmente, con el cual es posible realizar la síntesis de ampicilina.

Síntesis de ampicilina

1. Se estudió la reacción de síntesis de ampicilina empleando dicho catalizador. La disminución de la actividad de agua por la presencia de cosolventes no inhibe en forma diferencial la velocidad de hidrólisis de FGME, por lo cual no es posible incrementar el rendimiento de la reacción de síntesis con el uso de estos compuestos.
2. No es posible lograr mayores rendimientos de la reacción debido a las características de polaridad de la ampicilina lo cual la hace difícilmente extractable en la mayoría de los solventes orgánicos, compatibles con la estabilidad de la enzima.
3. El metanol al ser utilizado al 20% actúa como inhibidor de la reacción de hidrólisis de FGME, lo que permite un incremento del 5% en la conversión obtenida en la reacción de síntesis de ampicilina. Mayores concentraciones de metanol producen una disminución muy drástica de la

velocidad de reacción de síntesis y tienen un efecto adverso en la estabilidad del biocatalizador.

4. El control del pH permite inhibir preferencialmente la reacción de hidrólisis de FGME, con lo cual es posible un incremento de 10% en el rendimiento de la reacción de síntesis de ampicilina, con solo modificar el pH de 7.0 a 6.0. Este efecto se observa más marcadamente al incrementar la concentración de sustratos, habiéndose logrado un incremento hasta de 25% a concentración de 200 mM de 6-APA.

5. La reacción de síntesis de ampicilina sigue una cinética de segundo orden, de tipo ordenado. La hidrólisis de FGME, sigue la cinética de Michaelis-Menten y es inhibida no competitivamente por metanol y la hidrólisis de ampicilina, la cual sigue una cinética de Michaelis-Menten y es inhibida no competitivamente por 6-APA y competitivamente por FGME.

6. Se respondió la segunda pregunta planteada ya que fué posible lograr altos rendimientos de la reacción de síntesis de ampicilina mediante las estrategias seleccionadas.

PERSPECTIVAS

En relación a la reacción de síntesis de ampicilina los esfuerzos se deberían dirigir a incrementar la productividad del proceso, mediante el desarrollo del sistema de reacción, para lo cual será de mucha utilidad el modelo desarrollado, pues dadas las características de la ampicilina, no es fácil incrementar el rendimiento de la reacción en lote a valores mayores a los obtenidos. En este sentido, con el conocimiento actual de la estructura tridimensional de la enzima, es posible realizar modificaciones por ingeniería de proteínas para producir una enzima con mayor especificidad hacia la reacción de síntesis para lograr rendimientos similares a menores relaciones de FGME.

En relación al uso de la enzima en la síntesis de otros compuestos, es posible seleccionar otras moléculas menos polares, que presenten mayores coeficientes de partición en solventes orgánicos para desarrollar la síntesis de otros antibióticos en presencia de estos solventes, pues el sistema enzimático elimina muchas reacciones laterales que se presentan en la síntesis por métodos químicos. En este sentido también la ingeniería de proteínas presenta grandes perspectivas en el sentido de desarrollar una enzima con mayor estabilidad a los solventes orgánicos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Audet, P. and Lacroix, C. 1989. Two-phase dispersion for the production of biopolymer gel beads: effect of various parameters on bead size and their distribution. *Proc. Biochem.* 1989, **24**, 217-226.
- Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomelí, H., Valle, F., Flores, N. and Bolívar, F. Plasmid vector, pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. *Gene* 1986, **50**: 3-40.
- Baldaro, E., Fuganti, C., Servi, S., Tagliani, A. and Terreni, M. The use of immobilized penicillin G acylase in organic synthesis. In: *Microbial Reagents in Organic Synthesis*. S. Servi ed. New York. 175-188.
- Barber, M. & Associates. *Chemical Useful Book*. Barber, M. & Associates ed. 1994.
- Barker, S.A. and Kay, I. Principles of immobilized-enzyme technology. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*. A. Wiseman, ed. John Wiley and Sons. 1975.
- Beecham, Group Ltd. Pat. Fr. 1 365220 June 1964. Via C.A. 61 133 16f (1964)
- Blinkovsky, A.M. and Markaryan, A.N. Synthesis of β -lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, **15**, 965-973.
- Boccu, E., Ebert, C., Gardossi, L., Gianferrara, T., Zacchigna, M. and Linda, P. Enzymatic synthesis of ampicillin: a chemometric optimization. *Farmaco* 1991, **46** (4), 565-577.
- Böck, A., Wirth, R.G., Schmid, G., Schumscher, G., Lang, G. and Buckel, P. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consist of two dissimilar subunits. *FEMS Microbiol. Lett.* 1983a, **20**, 135-139.
- Böck, A., Wirth, R.G., Schmid, G., Schumscher, G., Lang, G. and Buckel, P. The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. *FEMS Microbiol. Lett.* 1983b, **20**, 141-144.
- Bush, K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinical. *Microbiol. Rev.* 1988, **7**, 109-123.
- Castillo, E., Rodríguez, M., Casas, L., Quintero, R. and López-Munguía, A. Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects. *Enzyme Microb. Technol.* 1991, **13**, 127-133.
- Cole, M. Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxypenicillins by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem J.* 1969, **115**, 757-764.
- Del Rio, G., Rodríguez, M.E., Munguía, M.E., López-Munguía, A. and Soberón, X. Mutant *Escherichia coli* penicillin acylase with enhanced stability at alkaline pH. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, **48**. *In press*.
- Demain, L.A. Industrial Microbiology. *Science*, 1985, **214**, 987-995.

Doyle, F.P. Pat. Brit 902 703 Aug 1962. Via C.A. 58 S694h (1963).

Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G. and Moody, P. C. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature*. 1995, **373**, 264-268.

Fernandez Lafuente, R., Rosell, C.M., Alvaro, G, Blanco, R.M. and Guisan, J.M. Synthesis of antibiotics in the presence of organic cosolvents catalyzed by stabilized penicillin-acylase derivatives. *Med. Fac. Rijkuniv. Gent* 1991, **56** (4a),1751-1758.

Florey, C. Analytical profiles of drugs substances. Academic Press. New York. 1973, **2**, 1-61.

Fuganti, C. and Graselli, P. Immobilized penicillin acylase to the synthesis of the dipeptide aspartame. *Tetr. lett.* 1986, **27**: 27, 3191-3194.

García, J.L. and Buesa, J.M. An improved method to clone penicillin acylase genes: cloning and expression in *Escherichia coli* of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *J. Biotechnol.* 1986, **3**, 187-195.

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

Hwang J.Y. and Arnold, F.H. Enzyme design for nonaqueous solvents. In: *Applied Biocatalysis*. Harvey W. Blanch and D. Clark, D.S. eds. 1991, **1**, 53-86.

Hyun, C., Kim, J. and Ryu, D. Enhancement effect of water activity on enzymatic synthesis of cephalexin. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, **42**, 800-806.

Isaka, KI, Suga, N and Ishimura, F. Kinetics and mechanism of acyl transfer by penicillin G acylase comparing acyl donors methyl chloroacetate and methyl phenylacetate. *J. Ferm. Bioeng.* 1995, **79**:3, 224-228.

Johnson. D.A. and Wolfe, S. Pat. US 3 140 282 july 1964. Via C.A. 61 8315d (1964).

Kasche, V. Ampicillin- and cephalexin-synthesis catalized by *E. coli* penicillin amidase. Yield increase due to substrate recycling. *Biotechnol. Lett.* 1985, **7**:12, 877-882.

Kasche, V. Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme Microb. Technol.* 1986, **8**, 4-16.

Katchalski-Katzir, E. *TIBS* 1993, **11**, 471-478.

Kato, K., Kawahara, K., Takahashi, T. and Kakinuma, A. Substrate specificity of α -amino acid ester hydrolase from *Xantomonas citri*. *Agr. Biol. Chem.* 1980, **44**:5, 1075-1081.

Kaufman, W. Pat. US 3 140 282 February 26 1963. Via C.A. 58 13093h (1973).

Klyosov, A. Enzyme engineering at the industrial level. Present and future prospects. United Nations Industrial Development Organization. 1989.

Leatherbarrow, R. and Fersht, A. Review: Protein engineering. *Prot. Eng.* 1986, **1**: 1, 7-16.

- Lee, Y.L. and Chang, H.N. High cell density continuous culture of *Escherichia coli* producing penicillin acylase. 1988, **10**:11, 787-792.
- Margolin, A., Svedas, V. and Berezin, I. Substrate specificity of penicillin amidase from *E. coli*. *Biochi. Biophys. Acta.* 1980, **616**, 283-289.
- Merino, E., Balbás, P, Recillas, F., Becerril, B., Valle, F. and Bolivar, F. Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (*pac*) gene. *Mol. Microbiol.* 1992, **6** (15), 2175-2182.
- Merino, E. Caracterización, manipulación y posible papel en la naturaleza del gen *pac* y su producto, la enzima penicilino acilasa de *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado, Instituto de Biotecnología, UNAM, México, 1992.
- Messing, R. Immobilized enzymes for industrial reactors. Academic Press. New York. 1975.
- Nigren, P., Stahl, S. and Uhlen, M. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends in Biotechnol.* 1994, **12**, 184-188
- Novak, L. and Weichet, J. Pat. Belg 626 175 december 1963. Via C.A. 61 1467r (1964).
- Oh, J., Kim, Y., Park, Y., Min, S. and Kang, H. Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase gene and the flanking regions, and its expression in *E. coli*. *Gene* 1987, **56**, 87-97.
- Okachi, R., Hashimoto, Y, Kawamori, M, Katsumata, R., Takayama, K. and Nara, T. Enzymatic synthesis of penicillins and cephalosporins by penicillin acylase. In: *Enzyme Engineering*. Chibata, I, Saburo, Fukui, S. and Li. eds. Plenum Press, New York. 1983, **6**, 81-89
- Okachi, R., Kato, F. Miyamura, Y and Nara, T. Selection of *Pseudomonas meganogenum* KY 3987 as a new ampicillin-producing bacteria. *Agr. Bio. Chem.* 1973, **37**:8, 1953-1957.
- Ospina, S., López-Munguía, A., Gonzalez, R.L. and Quintero, R. Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1992, **53**, 205-214.
- Petersen, S. and Martel, P. Protein engineering new or improved proteins for mankind. In: *Applied Biocatalysis*. J. Cabral, D. Best, L. Boross and J. Tramper eds. Harwood Academic Publishers. Switzerland. 1994.
- Ramírez, O.T, Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. and Quintero, R. Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. *Proc. Biochem.* 1994a, **29**, 197-206.
- Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 1994b, **16**, 895-903.
- Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G. and Branlant, C. Improved penicillin amidase production using a genetically engineering mutant of *Escherichia coli* ATCC11105. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, **41**, 14-24.

- Roberts, D.V. Enzyme kinetics. Elmore, D.T., Leadbetter, A.J. and Schofield, K eds. Cambridge University Press. London, 1977, 83-96.
- Rodriguez, M.E., Quintero, R. and López-Munguía, A. A design and kinetic characterization of a whole cell penicillin acylase biocatalyst using *E. coli*. *Proc. Biochem.* 1994, **29**, 213-218.
- Rodriguez, M.E. Diseño y caracterización de un biocatalizador de penicilino amidasa. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM, México. 1992.
- Savidge, T.A. Penicillin acylase (Bacterial). *Process Biochem.* 1980, **2**, 705-721.
- Savidge, A. T. Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. E.J. Vandame ed. Marcel Dekker. New York. 1994, 172-224.
- Segel, I. Enzyme kinetics. John Wiley & Sons. New York. 1975.
- Shewale, J.G. and Sivaraman, H. Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. *Proc. Biochem.* 1989, **24**, 146-154.
- Shewale, J.G., Deshpande, B.S., Sudhakaran, V.K. and Ambedkar, S.S. Penicillin acylases: applications and potentials. *Proc. Biochem. Intern.* 1990, 97-103
- Sikyta, B. and Kyslik, P. *Adv. Biotechnol.* 1981, **1**: 215.
- Son, J., Miheen, T., Seong, B. and Han, M.H. Studies on microbial penicillin amidase (IV) the production to penicillin amidase from a partially constitutive mutant of *Bacillus megaterium*. *J. Gen. App. Microbiol.* 1982, **28**, 281-291.
- Soulal, M.J. Pat. Brit. 975 379 Novem. 1964. Via C.A. 62 3890f (1965).
- Swentirmai, A. Production of penicillin acylase. *Appl. Microbiol.* 1964, **12**, 185-187.
- Triana, N. y Uribe E. Desarrollo de un proceso de semisíntesis para la obtención de ampicilina. Tesis de Químico Farmacéutico, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. 1992.
- Ulmer, K. Protein engineering. *Science.* 1983, **219**, 666-671.
- Valle, F., Balbás, P, Merino, E. and Bolivar, F. The role of penicillin amidase in nature and in industry. *Trends in Biotechnol.* TIBS. 1991, **16**, 36-40.
- Vandamme, E.J. and Voets, J.P. Microbial penicillin acylase. *Advances in Appl. Microbiol.* 1974, **17**, 311-369.
- Vojtisek, V. and Slezak, J. Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli*. III. Catabolite repression, diauxie, effect of cAMP and nature of the enzyme induction. *Folia Microbiol.* 1975, **20**, 298-306.
- Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, M.D. Conversion of benzylpenicillin to 6-amino penicillanic acid in batch reactor and continuous feed stirred tank reactor using immobilized penicillin amidase. *Biotechnol. Bioeng.* 1972, **15**, 13-25.

Wong, C-H. and Whitesides, G. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry Series. Baldwin, J.E., and Magnus, P.D. eds. Pergamon Press. 1994, **12**, 42-44.

Zaks, A. and Klivanov, A. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**: 7, 3194-3201.

Zhang, Q., Zhang, L., Liu, Q., Han, J. and Chen, L. Construction and hyperproductivity of engineered strain QE79 bearing recombinant plasmid containing penicillin G acylase gene from *Escherichia coli* strain AD1.76 *Biotechnol. Lett.* 1990, **12**:7, 493-498.

**RECOMBINANT WHOLE CELL PENICILLIN ACYLASE BIOCATALYST:
Production, Characterization and Use in the Synthesis and Hydrolysis of
Antibiotics**

**Sonia Ospina¹, Enrique Merino², Octavio T. Ramirez² and
Agustín López-Munguía^{2*}**

¹Departamento de Farmacia, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,
A. A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.510-3, Col.
Miraval, Cuernavaca, Mor., 62271, México

The production of a whole cell biocatalyst with high specific penicillin acylase activity using a recombinant strain is described. High activities were obtained using exponentially fed-batch fermentations to overproduce the enzyme. The cells were then entrapped in agar and the activity characterized in terms of particle size and stability. The technical feasibility of the catalyst in synthesis and hydrolysis reactions was demonstrated.

INTRODUCTION

Although most of the processes developed during the first two decades of the enzyme technology era were based on biocatalyst produced from purified microbial enzymes immobilized in solid supports, it soon became clear that biocatalyst prepared from whole cells were more attractive from the economic standpoint. However, one initial limitation was the low specific activity of the cells, first overcome by chemical strain mutations and later on by genetic engineering. Nowadays, genetic engineering has so strongly influenced enzyme technology, that more than 50% of bulk enzymes are being produced from recombinant strains (Stroh, 1994). Penicillin acylase (PA) EC.3.5.1.11, used mainly to produce 6-APA from penicillin, is the second largest enzyme used in an immobilized form and most of the industrial biocatalysts are prepared from purified PA from *E. coli* (Shewale and Sivaraman, 1989). This is mainly due to the low specific activities of wild and recombinant *E. coli* strains which usually fall in the range of 0.1-0.5 U/mg (Ramirez *et al.*, 1994b). In various economic analysis, it has been shown that due to the high cost of the enzyme, the biocatalyst cost can strongly affect the 6-APA production costs, unless it is used in a minimum number of batch reactions (Poulsen, 1984). This in turn becomes the bottle neck of the process, due to the relatively low stability of the enzyme when subjected to pH changes involved in the control of the penicillin hydrolysis process (Gomez, 1994). Two recent reports (Ramirez *et al.*, 1994a,b) have described the construction of a recombinant *E. coli* strain with PA activity induced with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), and its use in an exponentially fed-batch culture in order to obtain high levels of expression. The availability of such cells with high levels of PA activity makes attractive the production of a whole cell biocatalyst.

In this paper we describe a production method of a whole cell biocatalyst with high specific activity, based on a recombinant strain in which the PA gene is cloned and placed under control of a strong promoter, its overexpression at very low specific growth rates in an exponentially fed batch process and its immobilization by gel entrapment with high yields and low effectiveness factor. The catalyst was characterized and applied to the synthesis and hydrolysis of antibiotics. To our knowledge, this is the first study where the production, immobilization, characterization and application are simultaneously reported for a high-activity recombinant PA catalyst.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism. The strain *E. coli* JM101 was transformed with the pPA102 plasmid containing a gene for kanamycin resistance and the *E. coli* penicillin acylase (*pac*) gene whose transcription is under the control of the *lacZ* gene promoter. Details of the construction have been published elsewhere (Ramirez *et al.*, 1994a).

Culture conditions. The microorganism was maintained lyophilized and was activated in Luria medium with 35 µg/ml kanamycin, incubated overnight at 29°C and seeded into plates of Luria Agar. The medium composition has been described elsewhere (Ramirez *et al.*, 1994) and included 25 µM IPTG as inducer. The inoculum was prepared by selecting a few colonies from agar plates and cultivating them in Fernbach flasks, overnight at 29°C and 200 rpm. Glucose concentration was determined with a YSI 2700 analyzer (YSI Co., Yellow Springs, OH). Enzyme activity was determined, following the release of 6-APA with p-dimethyl aminobenzaldehyde (Shewale *et al.*, 1987)). One enzyme activity unit (U), is defined as the amount of enzyme producing 1 µmol of 6-APA per minute upon addition of penicillin G (Cibiossa, S.A. de C.V.). Specific enzyme activity is reported as enzyme activity units per mg of protein, as measured by the method of Lowry (Lowry, 1951). The biocatalyst activity is also reported as enzyme activity units per g of wet weight catalyst. All optical density measurements were performed in a Spectronic 601 spectrophotometer (Milton Roy).

Exponentially Fed-Batch Fermentations. The cells were produced using exponentially fed-batch fermentations as described elsewhere (Ramirez *et al.*, 1994b). *E. coli* JM101 pPA102 was inoculated into the bioreactor at a concentration between 0.1 and 0.2 g/L dry weight. The bioreactor was then operated in batch mode with an initial medium volume of 4.3 L. Upon glucose exhaustion, complete non-concentrated medium was fed at an exponentially increasing rate, designed to maintain a constant dilution rate (flow to volume ratio), D , equal to 0.01 h⁻¹ until the volume reached 10 L. The IPTG concentration was 25 µM, both, in the initial medium as well as in the feeding medium. Dissolved oxygen concentration was controlled at 40% with respect to air saturation by varying the aeration and agitation rates. The pH was controlled at 7.0 with a 2N NaOH solution.

Cell immobilization. Cells were immobilized by entrapment in agar using a two-phase procedure (Rodriguez *et al.*, 1994). The method is based on the dispersion of a mixture of cells/agar in vegetable oil. The distribution and average particle size obtained, depended on the hydrodynamic conditions during mixing. After agitation for 10 min, the mixture was separated by filtration and the residual oil washed from the biocatalyst. The cells were then treated with 2% v/v glutaraldehyde in 0.1 M, pH 7.5 phosphate buffer for 1 h at 25°C and with a 7% v/v tween 80 solution. In a typical experiment a batch of 60 ml of an agar/cell paste were treated in 140 ml of oil.

Biocatalyst characterization. The biocatalyst was characterized in terms of internal diffusional limitations. The effectiveness factor (η) was determined by measuring the ratio between the observed reaction rate and the rate determined with the same catalyst after mechanical disruption. The storage stability of the biocatalyst was studied at 37°C. Reactions of 10% penicillin G hydrolysis were carried out at 37°C with pH controlled at 7.5 with NH₄OH; ampicillin synthesis was carried out with phenylglycine methyl ester (FGME) and 6-APA (Glaxo) at 25°C and pH 7.0. Ampicillin was quantified by HPLC using a C₁₈ column

and methanol 20% in 50 mM pH 4.2 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ solution. Except where indicated, reagents were obtained from Sigma (St. Louis Mo).

RESULTS AND DISCUSSION

Cell production.

As a first step in the production of the PA biocatalyst, cells with high specific activity were produced using an exponentially fed-batch culture (EFBC). Figure 1 shows growth, PA production and glucose consumption kinetics in an EFBC. Maximum cell concentration was reached after 10h of culture. At this time glucose was depleted, resulting in an increase of dissolved oxygen

concentration and growth cessation. This event was used as a control signal to start the feeding program according to a preset D value. It can be observed, that after feeding was initiated, the biomass remained constant and the growth rate equaled D (0.01hr^{-1}), as would occur in a chemostat. Furthermore, the specific activity increased from 0.3 U/mg at the end of the batch period to 2 U/mg at the end of the exponentially fed-batch

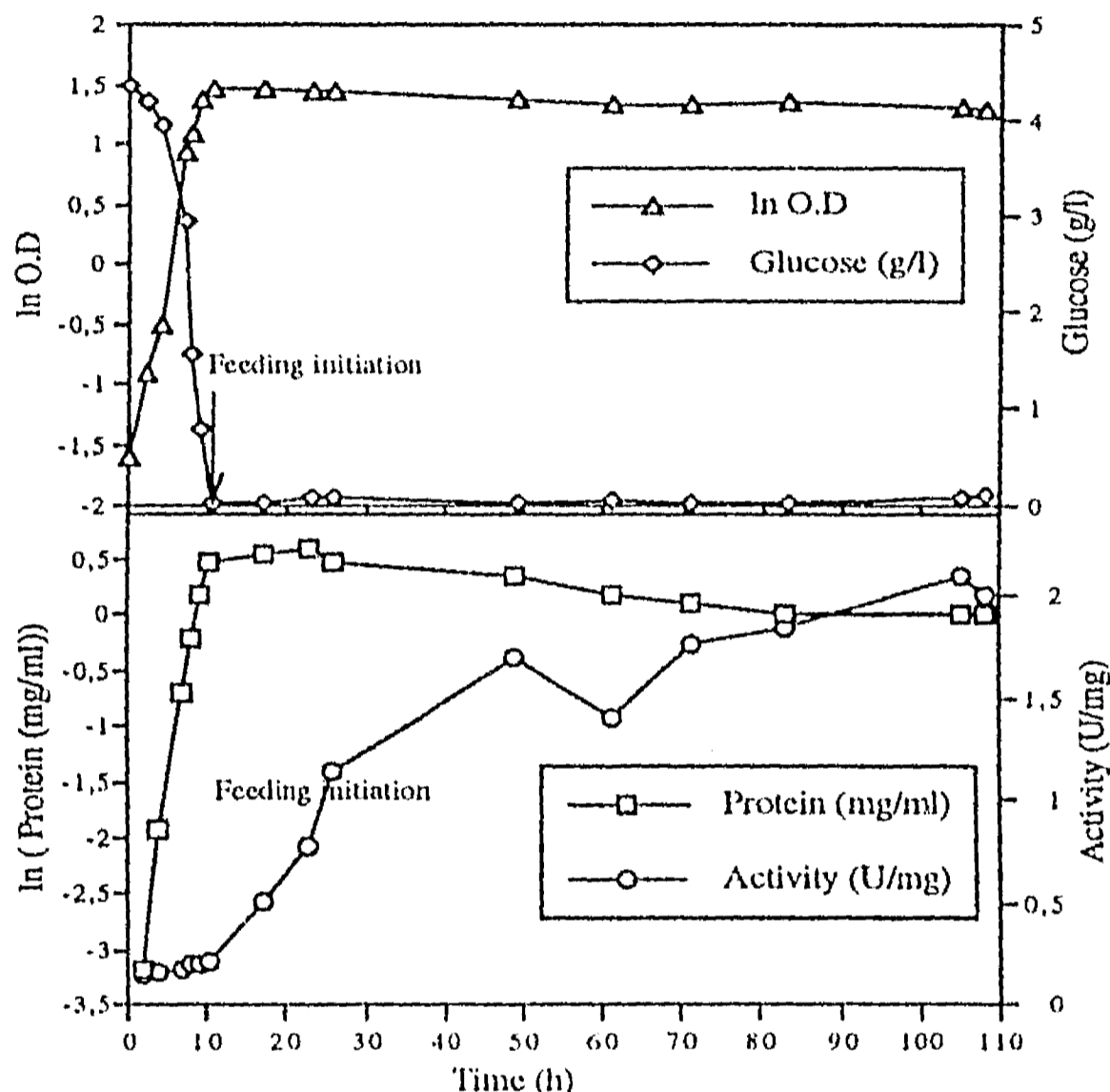


Figure 1. Penicillin acylase production in exponentially fed-batch cultures at a dilution rate of 0.01 h^{-1} . Medium addition starts upon glucose depletion (indicated by an arrow).

period. This considerable increase in activity may be due to a more efficient posttranslational processing of the PA precursor during reduced growth (Ramirez *et al.*, 1994b); alternatively, restricting growth rate can result in higher plasmid copy number and improved processing efficiencies (Seo and Bailey, 1985, Ramirez *et al.*, 1994b). Traditionally, productivity has been the criterium generally used to define enzyme production conditions. However, as mentioned before, if the final goal is the production of enzymes for a whole cell biocatalyst, high specific activity should be a preferable criterium (both in term of processing and economics) rather than only high productivity. Therefore, from the range of possible fermentation conditions studied, a D of 0.01 h^{-1} was selected for this process. Under such

conditions, an enzyme productivity of 20 U/gcell h was obtained. In contrast, during batch fermentation (data not shown), although the productivity increased to 40 U/gcell h as a consequence of a 12-fold reduction in culture time, the maximum specific activity attained was about 7 times lower than in the EFBC.

Biocatalyst production.

After preparing the biocatalyst, the wet particles were separated according to size by passing them through 5 meshes: 20, 30, 40, 50, 80. This resulted in 5 groups of biocatalysts with a mean diameter of 0.8, 0.59, 0.42, 0.297 and 0.177 mm and with total recovered weight of 0.9, 2, 15.6, 45.3 and 36.2%, respectively.

As expected, high enzyme activities were obtained with the highest cell loads and lowest particle size.

Accordingly, the highest activity obtained was 134 U/g biocatalyst, which corresponded to the 8% cells/agar load (the highest cell load supported) and a particle diameter of 0.177 mm (Figure 2).

Figure 2 also includes the results obtained with a wild strain provided by Genin (Mexico D.F.) (Rodriguez *et al.*, 1994). As seen, even for the same cell load, the recombinant biocatalyst yielded a 10- to 13-fold higher enzyme activity compared to the wild strain biocatalyst, emphasizing the importance of an initial cellular mass with high enzymatic activity. To our knowledge, this is the highest activity reported in the literature for a whole cell PA biocatalyst. Figure 2b shows that, as expected, kinetic control of the reaction rate was obtained at the lowest biocatalyst size. More than 80% of the biocatalyst prepared was retained in the fractions corresponding to the 50 to 80 meshes. These fractions were also those with the highest activity and effectiveness factor. Therefore, such fractions were selected for application in the synthesis of ampicillin and the hydrolysis of penicillin.

In Table 1, the stability of the biocatalyst at 37 and 55°C and at various pH, is shown in terms

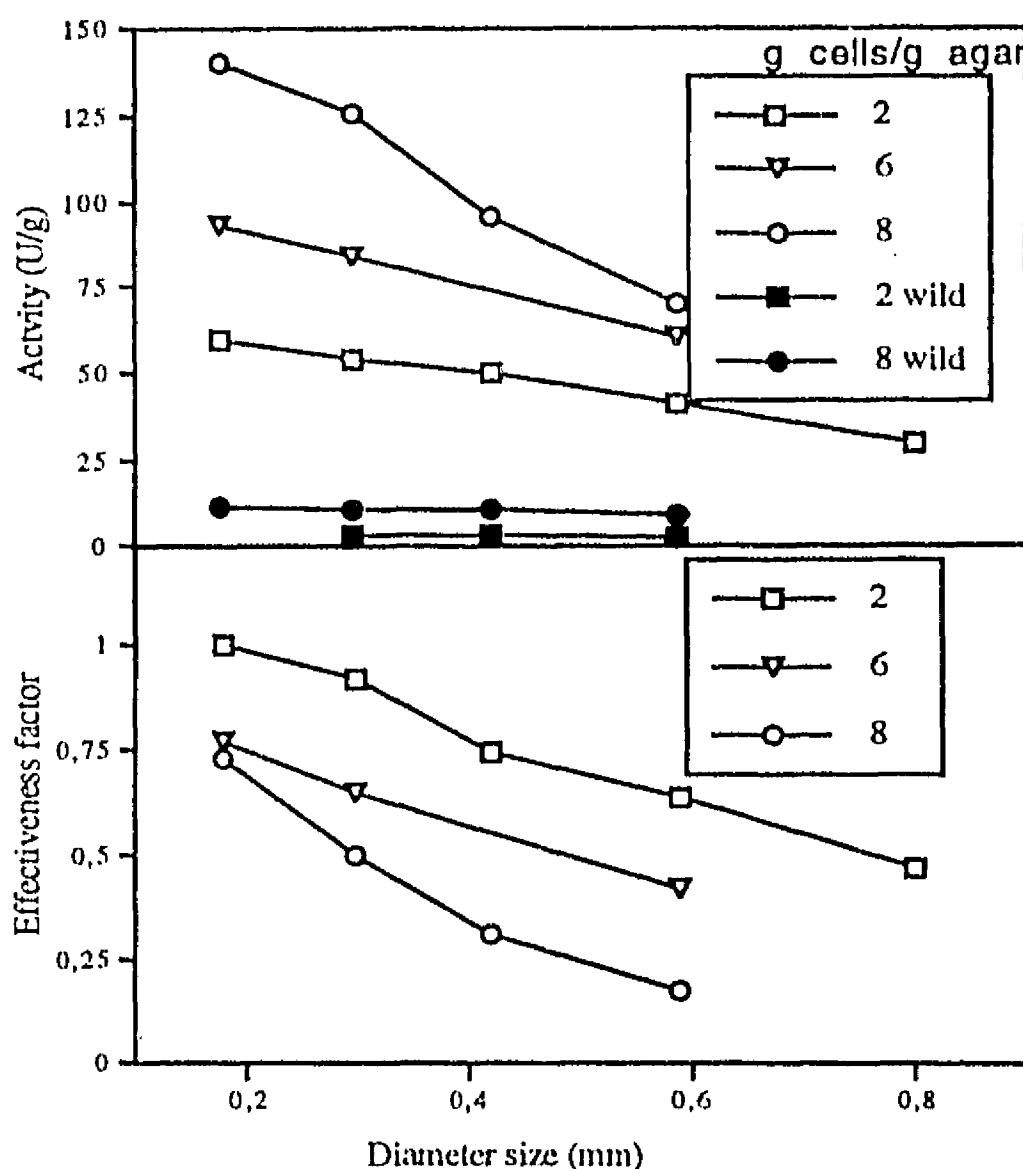


Figure 2. Enzyme activity, effectiveness factor and immobilization yield as a function of particle size and cells/agar load during manufacturing process of a wild and recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst (Diameter size were determined from the mesh number used).

of half-lives, and compared with the free enzyme and with a commercial enzyme immobilized by covalent linkage to an epoxiacrylic resin (Genin S.A. de C.V, México). It can be observed that, as expected, the cell catalyst had a considerably higher stability than the free enzyme at pH 7.0 in both 37 and 55°C, but was less stable than the immobilized enzyme. At a higher pH, the cell catalyst had a higher half life than the enzyme catalyst, probably due to the protective effect of the gel microenvironment. The stability of the catalyst produced is adequate for practical applications.

Table 1. Effect of temperature and pH on the half-life (h) of cells and enzyme catalysts.

Catalyst	Immobilized cells ₃		Immobilized enzyme ₂	Free enzyme ₁	
	37°C	55°C	37°C	37°C	55°C
pH					
5.0	1480	8.1			
6.0	1120	6.1	800		
7.0	1035	3.5	2400	115.2	1.6
8.0	758	1.6	250		

₁(Greco et al., 1983), ₂ (Ospina et al., 1992), ₃(this work)

Finally, the whole cell biocatalyst was applied to the hydrolysis of penicillin to obtain 6-APA (Figure 3a) and to the synthesis of ampicillin from 6-APA and FGME (Figure 3b).

In the first case, the reaction was carried out under conditions defined in most industrial processes while

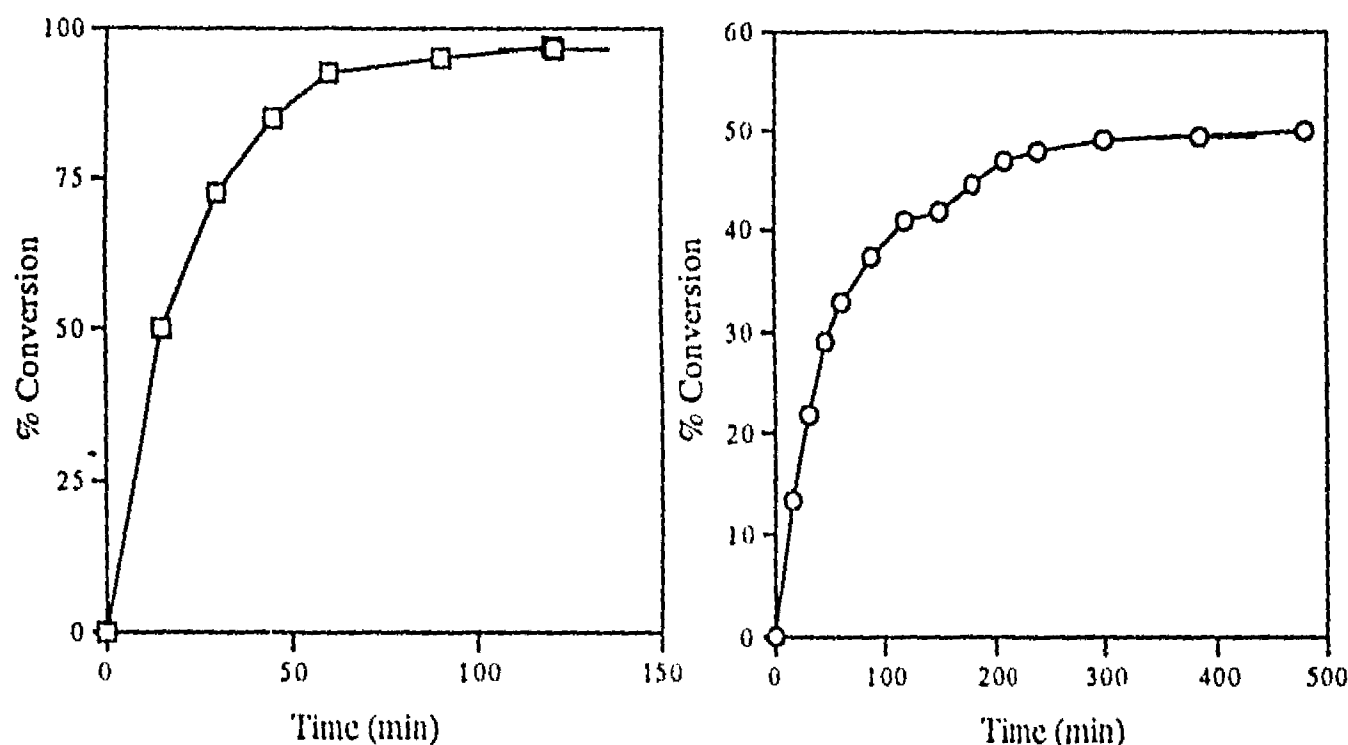


Figure 3. a. PGK hydrolysis, pH 7.5, 37°C, 10% PGK and b. Ampicillin synthesis, pH 7.0, 25°C, 6-APA:FGME 50:150 mM in a batch reactor with the cell catalyst.

in the second it was performed according to literature reports (Kasche, 1986). In the first case, more than 95% conversion was obtained in 90 min, while in the second, 50% conversion of 6-APA to ampicillin was reached in 180 min; these results are comparable with good catalysts reported in the literature. For hydrolysis, the feasibility of the biocatalyst was further demonstrated when the reaction kinetics and the stability were compared with economic requirements. In Figure 4, the production cost of 6-APA is plotted in terms of batch cycles of reuse and the biocatalyst production costs. The production cost was calculated in terms of raw materials, process services and biocatalyst (Rodriguez et al., 1994). It can be seen that for a

low cost biocatalyst such as the one shown here, after 300 cycles (around 600 hours of use) the biocatalyst cost no longer influences the 6-APA production cost. Such a time (600 hours) is well below the half life of the biocatalyst (Table 1). For higher cost catalyst, a longer use is necessary if its cost is to be neglected.

In conclusion, a high PA whole cell biocatalyst useful in the production of antibiotics was obtained as a result of a strain design by genetic engineering, its production in a novel fermentation system where the PA was overproduced, and finally by the adequate design of the biocatalyst. The key features considered were the high specific activity and high effectiveness factor, consequence of the particle size and a technique that may be readily applied at industrial scale in terms of cost and process feasibility.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by DGAPA and PADEP-UNAM. The authors wish to express their gratitude to M. E. Rodriguez, F. Gonzalez and R. Zamora for technical assistance. S. Ospina gratefully acknowledges Colciencias for her Ph.D. fellowship.

BIBLIOGRAPHY

- Greco, G., Veronese, F., Largajolli, R. and Gianfreda, L. (1983). *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **18**, 333-338.
- Gomez, A., Ospina, S., Queré, A., Quintero, R. and Lopez-Munguía, A. (1994). In: *Process Computations in Biotechnology*. Ed. Ghose, T.K. Tata McGraw-Hill Publ. Co. Ltd. New Delhi.
- Kasche, V. (1986). *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 4-16.
- Lowry, O.H., Rodrbrough, J.N, Farr, L.A. and Randall, J.R. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-272.
- Ospina, S. López-Munguía, A., Gonzalez, R.L. and Quintero, R. (1992). *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **53**, 205-214.
- Poulsen, P.B. (1984). *Biotech. and Gen. Eng. Rev.* **1**, 121-140.
- Ramirez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. (1994a). *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 895-903.
- Ramirez, O.T. Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolivar, F. and Quintero, R. (1994b). *Proc. Biochem.* **29**, 197-206.
- Rodriguez, M.E., Quintero, R. and López-Munguía, A. (1994). *Proc. Biochem.* **29**, 213-218.
- Shewale, J.G., Kumar, K.K. and Ambekar, G.R. (1987) *Biotechnol. Tech.* **1**, 69-72.
- Shewale, J.G. and Sivaraman, H. (1989). *Proc. Biochem.* **24**, 146-154.
- Stroh, W. (1994). *Gen. Eng. News.* **14**, 16, 10-12.

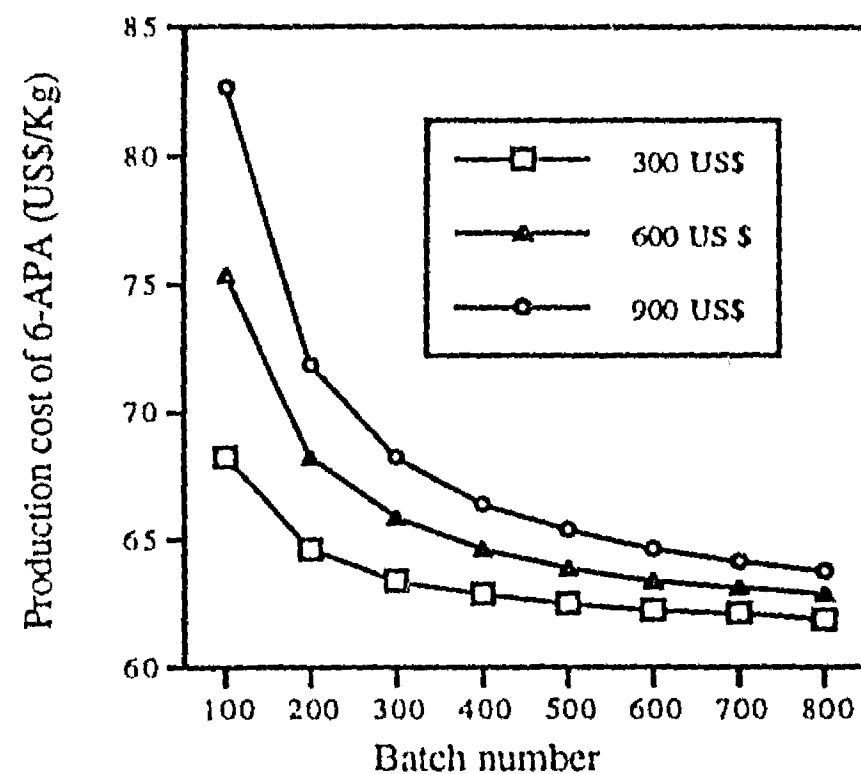


Figure 4. Effect of biocatalyst reuse and its cost on the 6-APA production cost.

Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: A whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst.

S. Ospina¹, E. Barzana², O. T. Ramírez³ and A. López-Munguía^{3*}

² Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 04510, México.

³ Instituto de Biotecnología, UNAM, A. Postal 510-3, Cuemavaca, Mor., México.

Abstract

A recombinant immobilized E. coli cell biocatalyst was used to design an enzymatic process for the synthesis of ampicillin. Reduction of water activity did not increase synthesis yield. Inhibition of PGME hydrolysis by methanol and pH optimization allowed synthesis reactions with 75% yields.

Introduction

Penicillin Amidase (PA) (E.C. 3.5.1.11) is the second largest enzyme used at industrial scale in an immobilized form. It is estimated that between 10 and 30 tons of immobilized enzyme are used all over the world in more than 10 different biocatalysts (1). The majority of PA biocatalysts are prepared from purified forms of the enzyme. There is however one industrial biocatalyst produced from *B. megaterium* entrapped in polyacrylamide (2). Probably the main limitation of whole cell PA biocatalysts is their low cells activity, particularly in *E. coli*, which results in biocatalysts with even lower specific activity.

PA hydrolyses penicillin producing phenylacetic acid (PAA) and 6-aminopenicillanic acid (6-APA) (3,4). The reaction is reversible and it has been demonstrated that penicillin can be obtained from its hydrolysis products (5,6). On the other hand, ampicillin is one of the most widely used β -lactam antibiotics, due to its high spectrum of activity, high solubility, high rate of absorption and its stability in acid conditions. It is produced by chemical synthesis following a complex procedure which requires protection of the α -amino group, use of highly reactive derivatives of phenylglycine (PG), drastic conditions (-30°C), anhydrous environment and toxic reactants (7,8). Therefore, the enzymatic alternative results attractive, but it is limited not only by the need of stable and economic biocatalysts but also from the kinetic and thermodynamic point of view (9).

As the specificity of PA is towards the phenyl group of PAA, it also recognizes ampicillin as substrate for hydrolysis. However, the synthesis of ampicillin in this case is difficult due to the low solubility of the substrate (PG) and its low pK value. At the pH of PA activity, the fraction of the non-dissociated form of PG is very low, a condition required for binding between the serine in the active site of the enzyme and PG. For this reason the synthesis of ampicillin with PA has been carried out only from active derivatives of PG, in particular phenylglycine methylester (PGME) (10, 11). Nevertheless, in the reaction carried out with kinetic control, the main disadvantage is that PGME is also readily hydrolyzed by the

¹ Present address : Departamento de Farmacia, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

*To whom correspondence should be addressed

enzyme, and so is ampicillin. This is the reason why an excess of PGME is frequently used in order to obtain high conversion yields from 6-APA, the most expensive substrate. Cole (5), compared various PG derivatives and found out that the highest yields (approx. 60%) were obtained when 50 mM of 6-APA and 200 mM of PGME were used. Kasche (9), using various PG esters also concluded that PGME was the most effective source of PG, reaching 47% yield when starting from 200 mM 6-APA and 300 mM PGME solutions. In fact, this is the only report in the literature in which solvents or cosolvents are used to increase the yield of ampicillin. It was found that methanol at 20% increased the yield to 56%, as methanol not only inhibits PGME hydrolysis, but also allows its synthesis from PG. Okachi (10), using *K. citrophila* cells, carried out reactions at pH 6.5 with PGME, obtaining a yield of 60% at 50 mM 6-APA and 200 mM PGME. Boccu *et al* (12) optimized the process by statistical methods. They reached an optimum of 50% conversion from 50 mM 6-APA and 100 mM PGME, nevertheless, they concluded that pH was not important in the range of 6.0 to 8.0. In general, no particular interest has been paid to the pH at which the synthesis of ampicillin is carried out.

In this article different strategies are proposed in order to increase the synthesis yield of ampicillin. In particular, the reduction of water activity, the extraction of ampicillin and the selective inhibition of the hydrolysis of PGME are presented.

Materials and Methods.

Enzyme. A recombinant *E. coli* cell biocatalyst with PA activity, immobilized by entrapment in agar was used. The strain *E. coli* JM101 was transformed with the pPA102 plasmid containing a gene for kanamycin resistance and the *E. coli* penicillin acylase (*pac*) gene whose transcription was under the control of the *lacZ* gene promoter. Detailed characterization of the molecular vehicle has been described elsewhere (13). Cells were produced using exponentially fed-batch fermentations, designed to maintain a constant dilution rate equal to 0.01 h⁻¹ until the volume reached 10 L, using isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) as inducer (14).

Cells were immobilized by entrapment in agar using a two-phase procedure. The method is based on the dispersion of a mixture of cells/agar in vegetable oil. The beads were then treated with 2% v/v glutaraldehyde in 0.1 M, pH 7.5 phosphate buffer, and with a 7% v/v tween 80 solution. The resultant biocatalyst had an average activity of 50 U/g wet weight and a size of 0.18-0.3 mm of diameter. Details of the catalyst production have been published elsewhere (15).

The enzymatic activity was determined following the release of 6-APA by the p-dimethylaminobenzaldehyde method (16). One enzyme activity unit (U) is defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol of 6-APA per minute upon addition of a 2% of penicillin G solution at pH 7.0 and 25°C. The biocatalyst activity is reported as enzyme activity units per g of wet weight catalyst.

Chemicals. PGME was synthesized from PG using thionyl chloride in methanol (17). Analytical reagents from Sigma and Baker were used. Penicillin G potassium was kindly provided by Orfaquim, S.A.

Analytical methods. Concentration of ampicillin and PGME were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters chromatograph Model 600E (Waters Associates Inc., Milford, MA) with an UV 486 detector (220 nm), using a NovaPak C18 column, 4 μ m (3.9x75 mm). Samples were eluted with methanol 20% in a 50 mM ammonium phosphate buffer.

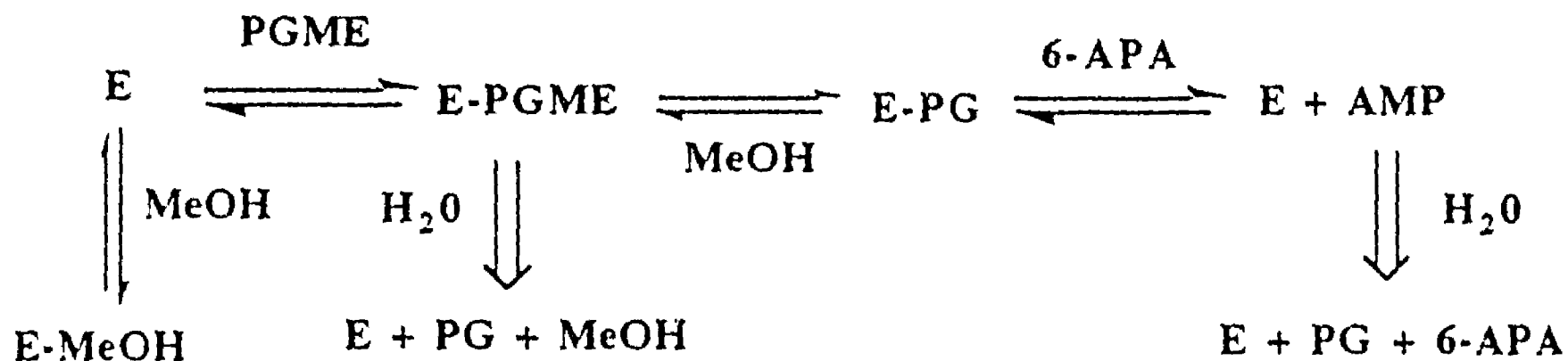
Kinetic studies. Kinetic parameters were determined measuring the initial reaction rate with different substrate concentrations. V_{max} and K_m values were obtained from the Lineweaver-Burk plots. Initial velocity of PGME hydrolysis and ampicillin synthesis were determined by HPLC. Ampicillin hydrolysis was determined following the release of 6-APA with p-DAB (16).

Synthesis reactions. Enzymatic synthesis were carried out in a stirred batch reactor with 10 mL of potassium phosphate or sodium acetate 0.1 M at 25°C, with pH control using 2 M ammonium hydroxide. The course of the reaction was monitored measuring the ampicillin and PGME concentration. Enzyme concentration was selected by studying the synthesis reaction in a range of 1 to 7 U/ml. 50% conversion was attained at 90 minutes with 3 U/ml (0.06g biocatalyst/ml) or more, with a 6-APA and PGME concentration of 50 and 150 mM respectively, at pH 7.0 and 25°C. Therefore, all the reactions were carried out with this enzyme concentration.

Results and Discussion

Reduction of water activity.

As mentioned earlier, the synthesis of ampicillin is affected by simultaneous reactions such as the hydrolysis of the substrate PGME and the product itself. The following reaction scheme describe the enzymatic reactions.



In order to inhibit the hydrolysis reactions, different cosolvents were employed in the reaction medium. In particular, polyols such as sorbitol were used at concentrations up to 80%. In Table 1 it may be observed that sorbitol had no effect on the reaction rate, and all three reactions proceeded with the same yield. Higher concentrations of sorbitol were difficult to handle. Under the same principle other polyols such as glycerol, and sugars like sucrose were tested with similar results.

Solvents such as acetonitrile and acetone, deactivate the enzyme. At concentrations at which some activity still remained (acetonitrile 20%, acetone 20%) there was no increase in the maximum conversion reached in aqueous medium. When 20% dimethylformamide or dimethylsulfoxide were used, a negative effect on conversion, due to the deactivation of the enzyme was observed.

Hiung *et al* (18), reported an increase in cephalixin synthesis yield using 50% glycerol. However, the aqueous yield in the synthesis was of only 20%, while for PA the yield of ampicillin synthesis in aqueous medium is 50%. For this reason the decrease in water activity is not enough to inhibit the hydrolysis, while the requirement of water to dissolve the substrates, an absolute requirement for this reaction, prevented a higher reduction of water activity.

Table 1. Effect of various cosolvents in the synthesis of Ampicillin with PA at pH 7.0 and 25°C.

Solvent	% v/v ¹	% Conversion
Buffer pH 7.0	100	50
Sorbitol 20%, 40%, 60% y 80%	100	50
Acetonitrile 20%	35	50
Acetone 20%	38	50
Dimethylformamide 20%	15.2	20
Dimethylsulfoxide 20%	41.5	35

¹ 6-APA and PGME 50 mM and 150 mM respectively. The initial rate (v_i) was calculated by measurements of ampicillin production during the first minutes of reaction and related to the observed rate in buffer.

Simultaneous reaction and extraction.

Another strategy to increase the yield consisted in the design of an extraction system. Using equal volumes of the reaction medium and an insoluble solvent, various systems were tested. In Table 2 it can be observed that the ampicillin synthesis yield decreased when methylisobutylketone and butanol were used as solvents. Eventhough ampicillin is soluble in such solvents, the partition coefficient favors the water phase, due to its high polarity. In addition, neither 6-APA nor PGME were extracted. On the other hand, both solvents strongly affected the stability of the enzyme causing a drastic decrease in activity. Another alternative is the use of the system PEG-phosphate, which has been proposed for the extraction of penicillin (19). However, after extraction there were no differences in substrates and product concentration between the PEG and the aqueous process due to similar partition coefficients (2 for PGME and 2.5 for 6-APA)

Inhibition of PGME hydrolysis.

From equation 1 it may be observed that methanol is a product of PGME in the synthesis of ampicillin. Although methanol is also an inhibitor of PA, when added to the reaction medium may direct the reaction to the synthesis of PGME. This argument has been used by Kasche (9) to increase the yield of ampicillin synthesis from 47 to 56% with 20% methanol at pH 7.5. The effect of methanol on the reaction synthesis was studied in detail. It was found that it behaved as a non-competitive inhibitor with an inhibition constant (K_i) of 2.7M. However, it was not possible to synthesize PGME from PG and methanol. This result has also been found in the synthesis of cephalixin with phenylglycil-β-lactamide amidohydrolase

Table 2. Effect of various reaction-extraction strategies in the synthesis of Ampicillin at pH 7.0 and 25°C

Solvent	%Initial rate ¹	Conversion (%)	Partition coefficient
Buffer pH 7.0 (control)	100	50	-
Methylisobutylketone	8	30	0.3
Butanol	5	15	0.22
PEG 1,500: potassium phosphate 40% pH 7.0 ²	100	50	3.5

¹ 6-APA and PGME 50 mM and 150 mM respectively. The initial rate (v_i) was calculated by measurement of ampicillin production during the first minutes of reaction and related to the observed rate in buffer.

² PEG (40%), potassium phosphate 40% w/w, pH 7.0

from PGME and 7-acetoxicephalosporanic acid (7-ADCA) (20). The effect of methanol is therefore only due to a specific inhibition of the PGME hydrolysis. The effect of methanol on the synthesis of ampicillin and on the hydrolysis of PGME is shown in Figure 1. It may be observed that at 20% methanol a conversion of 6-APA of 55% is obtained. At this methanol concentration the relation between the initial rate of ampicillin synthesis and PGME hydrolysis is twice the ratio obtained in aqueous medium. It is interesting also to observe that although higher concentrations of methanol increase the inhibition of PGME hydrolysis, it also deactivate the enzyme and result in lower overall reaction rates and lower conversions. In conclusion, a 5% increase in conversion was obtained with the addition of 20% methanol.

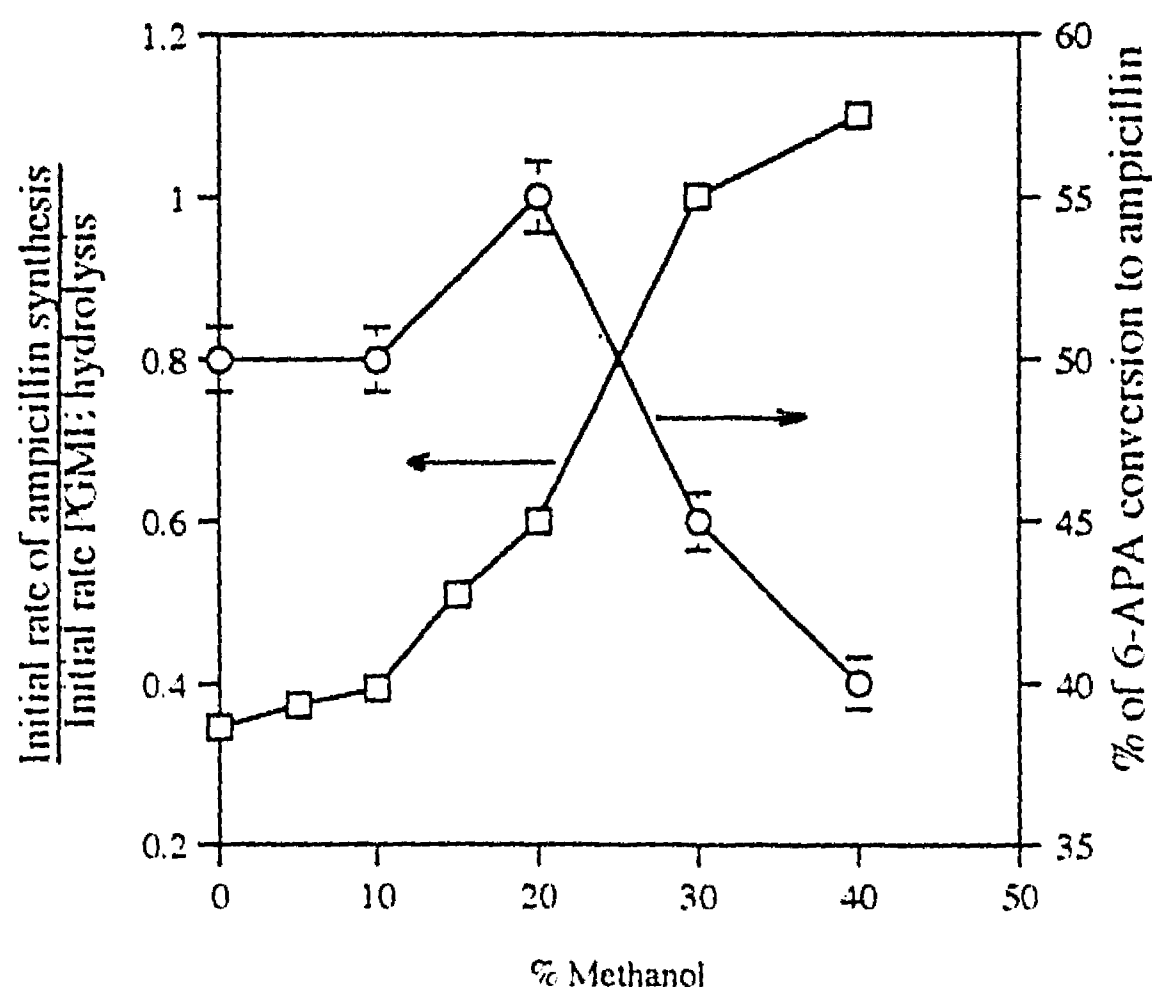


Figure 1 . Effect of methanol on the initial rate of ampicillin synthesis and PGME hydrolysis and in the final 6-APA conversion to ampicillin. Reaction conditions: pH 7.0, 25°C with 3 U/ml of PA, 6-APA: 50 mM and PGME: 150 mM.

Effect of pH on the synthesis of ampicillin.

Reports in the literature of ampicillin synthesis with 6-APA and PGME using *E. coli* PA, are either carried out at pH 6.0 and 7.0 (10) or pH 7.5 (9). The effect of pH on the initial rate of ampicillin synthesis and PGME hydrolysis is shown in Figure 2.

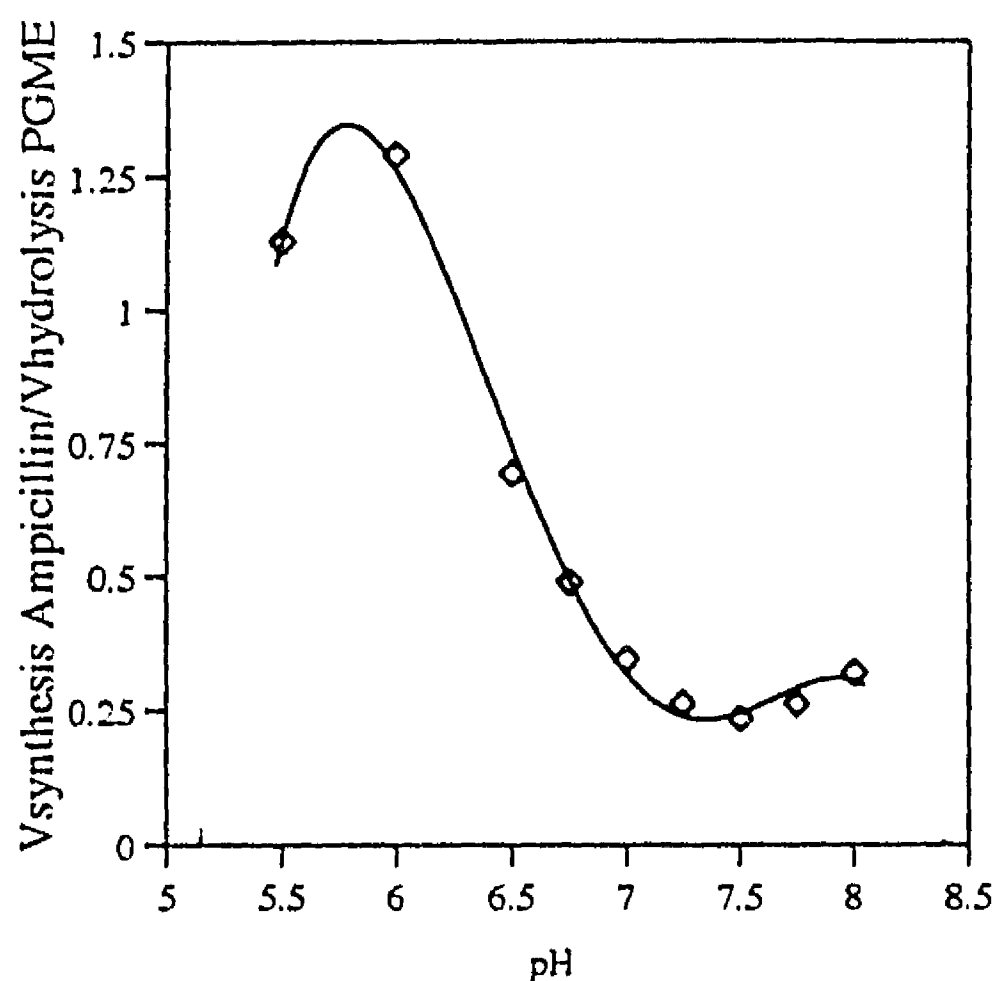


Figure 2 Effect of pH on the ratio of the ampicillin synthesis and PGME hydrolysis initial rates, 25°C, 50 mM 6-APA, 150 mM PGME, E=3 U/ml.

It can be observed that at pH 6.0 the synthesis rate is 30% higher than the hydrolysis rate, while at pH 7.0, the synthesis rate is only 25% of the hydrolysis rate. Therefore, the effect of pH is more important than those observed here when the water activity was reduced or by the inhibition of methanol. When the reaction takes place at pH 7.0 there is a rapid decrease in PGME concentration, mainly as a consequence of its hydrolysis (data not shown). When the pH is changed to 6.0, the decrease in the hydrolysis rate allows an increase in the synthesis yield to 60%.

It is also interesting to observe that this effect becomes more clear when the substrate concentration is increased as shown in Figure 3. At pH 7.0 with an optimum relation of [6-APA]:[PGME] of 1:3, a maximum conversion of 50% is reached after 90 minutes. After such a reaction time, ampicillin is rapidly hydrolyzed. The results obtained at pH 6.0 are shown in Figure 3b. The conversion was increased from 60% to 70% with concentrations of 6-APA:PGME of 50:200 and 50:250. On the other hand, the maximum ampicillin concentration obtained during the reaction remains constant for a longer period of time, before the hydrolysis rate exceed the synthesis. It is therefore shown that pH is an important control parameter in this process.

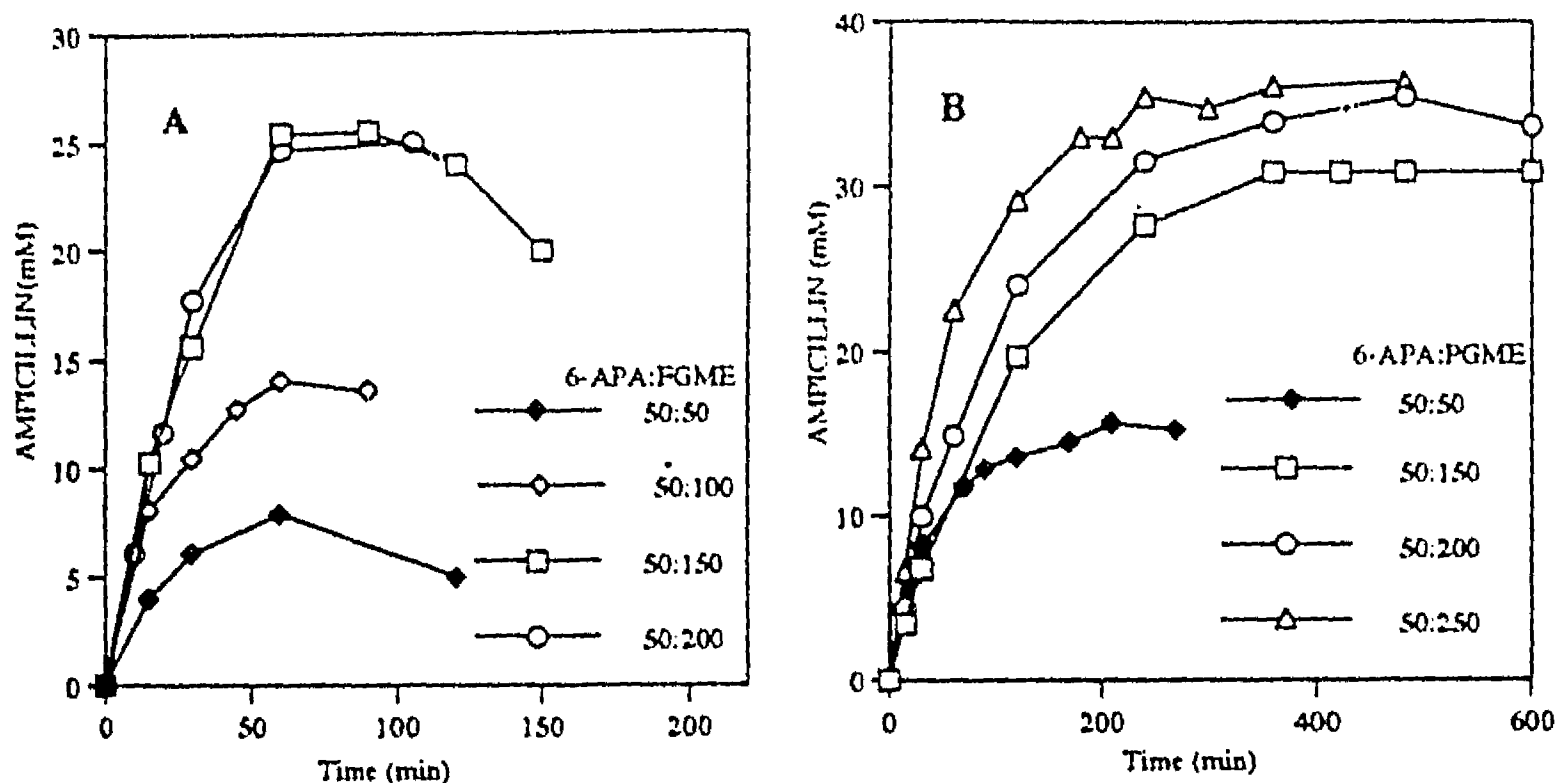


Figure 3 . Effect of the ratio of 6-APA to PGME concentration in the evolution of ampicillin synthesis with PA at 25°C. A. pH 7.0 B. pH 6.0

High productivity.

In order to increase the productivity of the process, higher concentrations of 6-APA were tested. Up to 200 mM 6-APA can be used, as shown in Figure 4, reaching 75% conversion with [6-APA]:[PGME] of 1:3. To our knowledge, as reviewed in Table 3, this is the highest yield reported for this reaction.

Table 3. Comparison between the ampicillin yields in synthesis reaction with PA under different reaction conditions (25°C).

pH	[6-APA]:[FMGE] (mM)	Máximo[Ampicillin] (mM)	% Conversion	Ref.
6.5	46:184	27.6	60	9,19
6	93:279	46.5	50	11
7	93:279	55.8	60	11
7.5	200:300	94	47	9
7.5	200:300+MeOH	112	56	9
6	50:150	30	60	*
6	50:200	35	70	*
6	100:300	75	75	*
6	200:600	150	75	*

* this work

Conclusions

The use of cosolvents to reduce the water activity in the synthesis of ampicillin with PA did not allow an increase in yield. The main obstacle being the high rates at which one of the substrates (PGME) and the product itself (ampicillin) are hydrolyzed by the same enzyme. However two alternatives were proven satisfactory: the use of methanol, already reported to inhibit the hydrolysis of

PGME, and most successfully the control of pH during the reaction. When the pH was controlled at 6.0, a 25% increase in yield was achieved. It was therefore possible to obtain 150 mM of ampicillin from 200 mM of 6-APA.

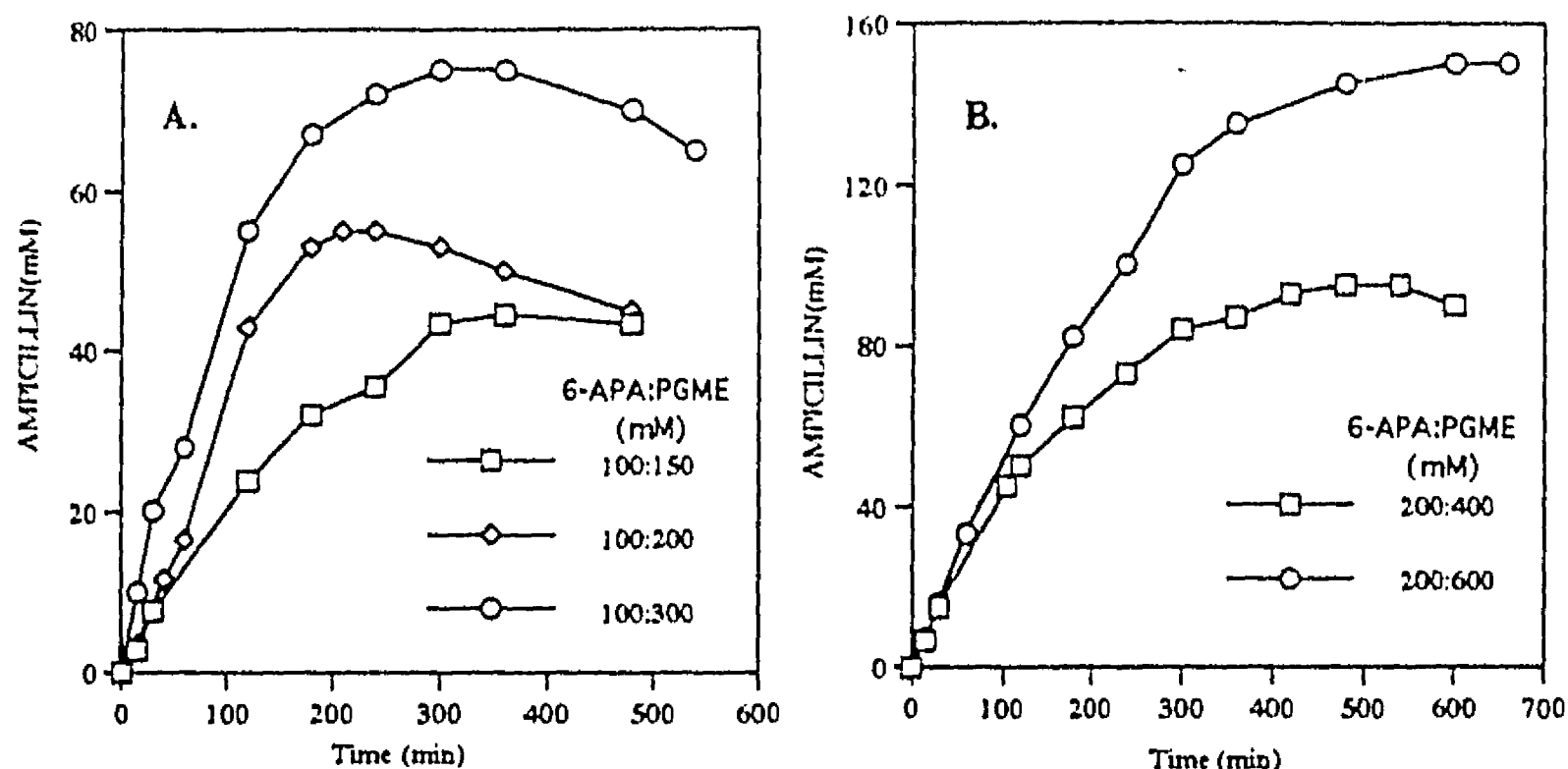


Figure 4 . Effect of 6-APA concentration on the synthesis of ampicillin:
A. 100 mM 6-APA. **B.** 200 mM 6-APA. Reaction conditions: pH 6.0, 25°C, E=3 U/ml

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by DGAPA and PADEP-UNAM. The authors wish to express their gratitude to M.E. Rodriguez and F. Gonzalez for technical assistance. S. Ospina gratefully acknowledge Colciencias for her Ph. D. fellowship.

References

1. Katchalski-Katzir, E. *Trends in Biotechnol.* 1993, 11, 471-478.
2. Klyosov, A. Enzyme engineering at industrial level. Present and future prospects. United Nations Industrial Development Organization. 1989.
3. Shewale, J.G. and Sivaraman, H. *Proc. Biochem.* 1989, 24, 146-154.
4. Vandamme, E.J. In: Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells. Fundamentals and Applications. Ed. Murray Moo-Young. Elsevier Applied Science. N.Y. 1988, 261-286.
5. Cole, M. *Biochem. J.* 1969, 115, 757-762.
6. Fernandez Lafuente, R., Rosell, C.M., Alvaro, G, Blanco, R.M. and Guisan, J.M. *Med. Fac. Rijkuniv. Gent* 1991, 56(4a), 1751-1758.
7. Doyle, F.P, Foster, G.R., Naylor, J.H. and Smith, H. *J. Chem. Soc.*, 1962, 1440.
8. Florey, C. Analytical profiles of drugs substances. Academic Press. New York. 1973, 1-61.
9. Kasche, V. *Biotechnol. Lett.* 1985, 7 (12), 877-882.
10. Okachi, R., Hashimoto, Y, Kawamori, M, Katsumata, R, Takayama, K and Nara, T. In: Chibata, I, Saburo, Fukui, S. and Li. L Winzard, B. Plenum Press, New York. 1983, 6, 81-89
11. Kasche, V., Galunsky, B., Haufler, U. and Zollner, R. In: *Enzyme Technology* (R.M. Lafferty). Springer Verlag. New York, 1983, 299-308.
12. Boccu, E., Ebert, C., Gardossi, L., Gianferrara, T., Zacchigna, M. and Linda, P. *Farmaco* 1991, 46(4), 565-577.
13. Ramirez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, 16, 895-903.
14. Ramirez, O.T., Zamora, R. Espinosa, G., Merino, E., Bolivar, F. and Quintero, R. *Proc. Biochem.* 1994, 29, 197-206.
15. Ospina, S., Merino, E., Ramirez, O.T. and Lopez-Munguía, A. *Biotechnol. Lett.* 1995, 17 (6), 615-620.
16. Shewale, J.G., Kumar, K.K. and Ambekar, G.R. *Biotechnol. Tech.* 1987, 1, 69-72.
17. Dictionary of organic compounds. Fifth Edition. Chapman and Hall. N.Y. 1982.
18. Hyun, C., Kim, J. and Ryu, D.. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 800-806.
19. Shimizu, M, Okachi, R and Kimura, K. *Agr. Biol. Chem.* 1975, 39 (8), 1655-1661.
20. Blinkovsky, A.M. and Markaryan, A.N. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, 15, 965-973.

EFFECT OF pH IN THE SYNTHESIS OF AMPICILLIN BY PENICILLIN ACYLASE

Sonia Ospina¹, Eduardo Barzana², Octavio T. Ramirez³ and Agustín López-Munguía^{3*}

² Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, México, D.F. 04510, México.

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, México.

ABSTRACT

Recombinant *E. coli* cells with high PA activity were immobilized by gel entrapment with agar. This biocatalyst was used to study the effect of pH on the synthesis of ampicillin from phenylglycinemethylester (PGME) and 6-aminopenicillanic acid (6-APA). The parallel hydrolysis reactions of PGME and ampicillin were also studied. A selective inhibition of the hydrolysis of the ester was possible by controlling the pH at 6.0. At such conditions, and using 6-APA solutions ranging from 50 to 200 mM, a 75% conversion to ampicillin was obtained. This increase was higher than obtained with other strategies as the use of solvents. The reaction kinetics was described by a second order model for ampicillin synthesis, with experimentally determined Michaelis-Menten constants of 27 and 25 mM for 6-APA and PGME respectively. In addition, ampicillin and PGME were hydrolyzed by the enzyme following Michaelis-Menten kinetics with K_m values of 40.5 and 30 mM, respectively. A good correlation was found between experimental results of synthesis reactions and the kinetic model derived from initial rate experiments, with only slight deviation at high substrate concentrations. This is the first report where the specific effect of pH on the synthesis of ampicillin was studied in detail. It is shown that, by controlling the pH it is possible to inhibit the lateral undesirable reactions increasing the yield of the main reaction.

Keywords: penicillin amidase, pH, ampicillin synthesis.

INTRODUCTION

Ampicillin is one of the most widely used β -lactam antibiotics, with an annual production of 5600 ton/year (1). It has the advantage of high water solubility, high absorption rate when orally administrated and high stability at acidic pH (2). It is also a high spectrum antibiotic, particularly when combined with clavulanic acid, an inhibitor of the β -lactamases produced by microorganisms

Present address.

¹ Departamento de Farmacia, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

* To whom correspondence should be addressed

as a resistance mechanism (3). Ampicillin is produced by chemical synthesis in a phenylglycine (PG), the use of highly reactive derivatives of PG (phenylglycine chloride hydrochloride, which is highly unstable), drastic temperature (-30°C), anhydrous conditions, and the use of highly toxic compounds (pyridine, dimethylaniline and dichlorometane) (4,5). Accordingly, an enzymatic process can be an attractive alternative for replacing the chemical synthesis process.

Although the enzymatic synthesis of ampicillin has been reported since 1969 (6), the low yields and concentrations of ampicillin obtained to date have prevented the enzymatic processes from reaching a commercial stage. Enzymatic synthesis of ampicillin has been attained with penicillin acylase (PA) (E.C.3.5.1.11), also known as penicillin amidase (PA), penicillin amidohydrolase and penicillin acyltransferase (6,7,8). From the various existing penicillin acylases (penicillin V, penicillin G and ampicillin amidase), penicillin G amidase is industrially used for the hydrolysis of penicillin G (9). This acylase is produced from various microorganisms mainly *E. coli* (10,11) and *Bacillus megaterium* (12,13). Although such an enzyme is used as an hydrolase for the production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenylacetic acid (PAA), it can also catalyze the reverse reaction if low pH values are maintained, a condition where most of the substrate (PAA) is present in the non-dissociated form. This enzyme has a wide specificity, as it also binds ampicillin, producing 6-APA and phenylglycine (PG). However, in this case, the reverse reaction will only occur if PG is present in its soluble non-dissociated form. Nevertheless, PG has a very low solubility and low pK. Accordingly, in the pH range of PA activity (5.0 to 8.0), the fraction of non-dissociated PG is very low, a condition required for binding between the serine in the active site of the enzyme and PG (14,15).

Fernandez Lafuente *et al* (16) have used cosolvents for increasing the fraction of non-dissociated PPA during the enzymatic synthesis of penicillin from 6-APA and PAA. They found that even at the neutral pH, where penicillin synthesis in aqueous medium is practically null, solvents such as dimethylformamide (DMF) increased the synthesis yields by modifying the pK of PAA from 4.3 to 5.75. Accordingly, a similar strategy could be used for overcoming the problem of increasing the fraction of its non-dissociated form. In fact, DMF increases also the pK of PG but only from 2.2 to 3.1, not enough to increase the fraction of the non-dissociated form of PG at the range where the enzyme is active and stable. One alternative to deal with this limitation is the use of activated derivatives of PG such as esters and amides, capable of transferring PG to 6-APA. From such compounds, PGME has resulted in the highest yields (6,17). However, PA can also hydrolyse the ester, and thus, high concentration ratios of 6-APA:PGME (i.e. 1:3) have been proposed to achieve high yields of 6-APA. For instance, Cole (6) compared various PG derivatives and reported a 60% 6-APA conversion yield when using 50 and 200 mM solutions of 6-APA and PGME, respectively, at pH 6.0 and 30°C . Kasche (7) reached the same conclusion, but with lower yield (47%), though a further increase to 56% was attained by addition of 20%

methanol. The alcohol inhibited the hydrolysis of PGME when using 200 and 300 mM of 6-APA and PGME respectively, at pH 7.5 and 25°C. Okachi *et al* (8) used *K. citrophila* cells for synthesis reactions at pH 6.5 and 35°C, obtaining 60% yield from 50 and 200 mM of 6-APA and PGME, respectively. In a recent report, Boccu *et al* (18), carried out an optimization of the synthesis reaction conditions by statistical procedures, including pH, temperature and substrate concentration as optimization parameters. By varying the pH from 6.2 to 7.3 they concluded that yields higher than 50% could only be obtained operating at 25°C, a concentration ratio of 6-APA:PGME of 1:2, without the need of pH control. Despite these reports, the effect of pH on the synthesis of ampicillin has not been analyzed in detail.

The effect of pH on enzyme activity has been described by a series of reaction mechanisms (19, 20) which are summarized in Figure 1. Model I is the simplest one, and considers that the enzyme may exist in three different forms of dissociation, only one capable of binding to the substrate. Model II considers the ionization of the complex enzyme-substrate. Model III combines models I and II as it considers the dissociation of both, the free enzyme and the substrate-enzyme complexes. When the substrate also dissociates, a correction to the model is made by using a term which is a function of its ionization state (model IV). As described by Segel (20) the models are characterized by particular behaviors of plots of $\log V_{max}$ vs pH or $\log V_{max}/K_m$ vs pH. According to Blinkovsky and Markarian (14), PGME hydrolysis using D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase of *Xanthomonas sp* is influenced by the dissociation of the ester amino group, and therefore a plot of $\log V_{max}/K_m$ results in straight lines with slopes lower than +1 or higher than -1 at low or high pH, respectively. According to these authors, the reaction follows model IV, but the enzyme binds to the dissociated form of the substrate. The same model has been proposed for the hydrolysis of the p-nitroaniline derivative of PG with PA (15). Their results are well described by the model, where the non-protonated form of the compound is the one that binds with the enzyme. These authors attribute the difficulty of synthesizing ampicillin from PG and 6-APA on the high pK of the amino group of PG, which is 9.1. However, the difficulty is most probably due to the dissociation of the acid group that also participates in the reaction. Blinkovsky and Markarian (13), carried out a thermodynamic study of the synthesis and hydrolysis reactions of ampicillin at pH 5.5, concluding that the difficulty of PA from *E. coli* to bind the protonated form of the substrate is not an obstacle for the direct synthesis of ampicillin from PG, and that the problem is due to the low solubility of both PG and 6-APA in acidic medium.

As described in Figure 2, the synthesis of ampicillin involves various simultaneous reactions. The mechanism proposed by Kasche (7) for this reaction involves the formation of an acyl-enzyme complex, although no kinetic model has been derived up to now. There are however various models proposed for the synthesis of β -lactam antibiotics from 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA), as well as for the synthesis of cephalexin from PGME using

D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase of *Xanthomonas sp.* Blinkovsky and Markarian (13) found that the synthesis of cephalexin follows an ordered second order reaction, after determining the kinetic constants and validating the model with experimental results. Nam *et al* (21), developed a model for the same reaction from the quasi-steady state. They found that the kinetics of cephalexin synthesis using α -amino- β -lactam acylhydrolase of *Xanthomonas citri* follows the acyl-enzyme intermediate model, and the enzyme catalyzes all three reactions, including PGME hydrolysis and cephalexin hydrolysis and synthesis. The integrated rate equations were used to describe batch reactions and a good agreement between predicted and experimental results was observed.

This article presents the effect of the pH on the reaction of ampicillin synthesis and its consequence on the yield of the reaction. The results are explained in terms of the models of dissociation of the enzyme and the substrate respect to the proposed mechanism of the reaction. A kinetic model for the ampicillin synthesis is proposed and validated with experimental results.

MATERIALS AND METHODS.

Enzyme

A recombinant *E. coli* cell biocatalyst with PA activity, immobilized by entrapment in agar was used. Construction of the recombinant *E. coli* strain and production of the biocatalyst has been described elsewhere (22). The enzymatic activity was determined following the release of 6-APA by the p-dimethylaminobenzaldehyde method (23). One enzyme activity unit (U) is defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol of 6-APA per minute upon addition of a 2% solution of penicillin G at pH 7.0 and 25°C. The biocatalyst used had an activity that ranged between 50 and 55 U/g wet weight of catalyst.

Chemicals.

PGME was synthesized from PG using thionyl chloride in methanol (24). Chemicals were obtained from Sigma and Baker. Potassium Penicillin G was kindly provided by Orfaquim, S.A. (México D.F.)

Analytical methods.

Concentration of ampicillin and PGME were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters chromatograph Model 600E (Waters Associates Inc., Milford, MA) with an UV 486 detector (220 nm), using a NovaPak C18 column, 4 μ m (3.9x75 mm). Samples were eluted with 20% methanol in a 50 mM ammonium phosphate buffer.

Kinetic studies.

Kinetic parameters were determined measuring the initial rates with different substrate concentrations. V_{max} and K_m values were obtained from Lineweaver-Burk plots. Initial velocity of PGME hydrolysis and ampicillin synthesis were determined by HPLC. Ampicillin hydrolysis

was determined following the release of 6-APA with the p-dimethylaminobenzaldehyde (17). Simultaneous differential equations, that describe the kinetic behavior of the synthesis and hydrolysis reactions, were resolved numerically with the simulation language ISIM, developed by the University Industrial Center of Salford, LTD, (Salford, England).

Synthesis reactions.

Enzymatic reactions were carried out in a stirred batch reactor (10 mL) in potassium phosphate or sodium acetate 0.1 M at 25°C, with pH control using 2 M ammonium hydroxide. The reaction was monitored by HPLC, measuring the ampicillin and PGME concentration. Enzyme concentration was selected by studying the synthesis reaction in a range of 1 to 7 U/ml. It was found that a 50% conversion was obtained within 90 minutes by using 3U/ml or more (0.06g biocatalyst/ml), with a 6-APA and PGME concentration of 50 and 150 mM respectively, at pH 7.0 and 25°C. Therefore, all the reactions were performed at this enzyme concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of pH on the synthesis of ampicillin and hydrolysis of PGME.

PA catalyses the synthesis of ampicillin from 6-APA and PGME. However PGME is also hydrolysed and so is the product ampicillin. In Table 1 the relative activity of the enzyme when acting upon these substrates is compared. It is evident that at pH 7.0, the slowest reaction is the synthesis of ampicillin; then, no ampicillin accumulation should be expected, given the highest rate of hydrolysis. Nevertheless, accumulation of ampicillin occurs probably due to a different behavior of the enzyme at low substrate concentration and to inhibition by products and other substrates (like the inhibition of ampicillin hydrolysis by 6-APA and PGME). In Table 1 can also be observed that PGME is a substrate readily hydrolysed by PA, particularly in the higher pH medium. The use of high concentrations of PGME attempted to overcome this problem. However, at pH 6.0 the situation is drastically modified: while the enzyme activity for penicillin hydrolysis remains almost constant, the rate of PGME and ampicillin hydrolysis are reduced 82 and 63% respectively. In consequence, ampicillin synthesis at pH 6.0 is dramatically improved (about 53%).

In order to study in more detail the effect of pH on both reactions, experiments were performed in a broader pH range, as shown in Figure 3. The plot of $\log V_{max}$ vs pH during PGME hydrolysis, resulted in a bell-shaped curve with slope of +1 and -1 at acid and basic conditions, respectively. Also, the slope of the plot $\log V_{max}/K_m$ at low and high pH values was equal to 1. Such a behavior is described by model III, where the dissociation of the substrate is not important for the reaction. As a consequence there is a variation of V_{max} with pH while K_m remains constant.

The three dimensional structure of PA, including a mechanism for penicillin hydrolysis, has recently been published (25). If it is assumed that PGME and penicillin hydrolysis follow the

same mechanism (Figure 4), the dissociation of the PGME amino group should not be involved in the process of enzyme binding with the substrate, as it is not involved in the reaction. Furthermore, Margolin *et al* (15), studied the hydrolysis of the p-nitroaniline derivative of PG and found that the enzyme binds to the non-dissociated form of the substrate, as described in model IV. Blinkovsky and Markarian (14), who studied the effect of pH on the hydrolysis of PGME and cephalixin with D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase, found that the enzyme also follows model IV, but that the enzyme binds to the dissociated form of the substrate. The slope of a plot of $\log V_{max}/K_m$ vs pH should then be lower than 1, due precisely to the substrate dissociation effect. The fact that 6-APA dissociates indicates that it also has an effect on ampicillin synthesis. According to the mechanism proposed in Figure 4, 6-APA should be undissociated in order to accept protons and direct a nucleophilic attack over the acid group of the acyl-enzyme intermediate. Thus, it can be concluded that the effect of the pH on the reaction synthesis is strongly linked to the dissociation of 6-APA. Accordingly, model IV should be employed, where the effect of pH on the reaction rate is influenced by non-dissociated 6-APA.

The effect of pH on the ratio of the synthesis of ampicillin and the hydrolysis of PGME is shown in Figure 5. At pH 6.0, the rate of ampicillin synthesis is 1.3 times larger than the rate of PGME hydrolysis. In contrast, at pH of 7.0, the rate of ampicillin synthesis is only 25% of the rate of PGME hydrolysis. This explains why, PGME is hydrolyzed with low synthesis yield at pH 7.0, while at pH 6.0 the phenomenon is the inverse. When ampicillin synthesis is carried out at various pH values, a 50% yield is reached at pH 7.0, whereas at pH 6.0 the yield increases to 60, even though the overall rate is slower (Figure 6). At lower pH values the yield decreases again, probably due to the decrease in the protonated form of the free enzyme.

Effect of substrate concentration on the synthesis of ampicillin

After determining the effect of pH on ampicillin synthesis, the effect of substrates concentration was investigated as shown in Figure 6. At pH 7.0 (Fig. 7a) with an optimum ratio of 6-APA:PGME of 1:3, a maximum conversion is reached (50%) after 90 minutes; ampicillin is rapidly hydrolyzed on further incubation. In Figure 7b (pH 6.0) the conversion is increased from 60 to 70% with substrate concentrations of 6-APA and PGME of 50:200 and 50:250 mM. Clearly, the maximum ampicillin concentration remains constant for a longer period, before the hydrolysis rate exceeds the synthesis. It is therefore shown that pH is an important parameter of control in this process.

In order to increase the productivity, higher substrate concentrations were studied. Figure 8 shows the results for reactions with 100 and 200 mM of 6-APA. A maximum conversion of 75% was reached with a 1:3 6-APA:PGME relation. To our knowledge, the maximum yield reported for this particular reaction is only 56%. In Table 2 the results of the present study are compared with

those of the literature, conducted at pH values from 6.0 to 7.5. Kasche (27) obtained only 50% conversion in 200 min at pH 6.0, this lower yield in the reaction can be due to two aspects: one is referred to the ionic strength used by this author, he doesn't mention which ionic strength used in this experiment, but he reported that it is very important due to the dependence of the pKa for amino group on 6-APA and its influence markedly in the ratio synthesis/hydrolysis, and he appears to use 0.2-1M buffers while we used 0.1 M buffer. Another important difference between our work and the report of Kasche is the support used. They used Eupergit C which is a support with positively charged and we are using a negatively charged support. This author mentioned that the deacylating form of 6-APA can be partitioning between the charged support and the solution, which can change the ratio synthesis/hydrolysis, so this can be the reason for our higher yield. The highest productivity, obtained in this study, is 1.21 g of ampicillin produced by g of 6-APA per batch. Most literature studies do not report the enzyme concentration and thus, the productivity can not be referred to enzyme units. However, in the present work, up to 17.45 mg of ampicillin were produced per unit of enzyme activity per batch. This allowed us to conclude, that under the new reaction conditions, the productivity may be increased up to 25%.

Kinetic model for the synthesis of ampicillin.

The mechanism of ampicillin synthesis with PA has been proposed elsewhere (17, 27) but no kinetic models have been derived to date. The model presented here is composed by three reactions: synthesis and hydrolysis of ampicillin, and hydrolysis of PGME.

In Figure 9a the effect of PGME concentration on the rate of hydrolysis is shown. The reaction follows the Michaelis-Menten behavior, with a K_m of 30 mM and a V_{max} of 0.32 mM/min at pH 6.0, 25°C. Methanol behaves as a non-competitive inhibitor, with $K_i=2.77M$. Accordingly, PGME hydrolysis can be described by the following equation:

$$r_0 = \frac{d[PGME]}{dt} = \frac{V_E [PGME]}{(K_E + [PGME])(1 + [MeOH]/K_{IE})} \quad (5)$$

where V_E is the maximum initial rate, K_E is the Michaelis-Menten constant and K_{IE} is the methanol inhibition constant.

Figure 9b shows the effect of ampicillin concentration on the rate of hydrolysis. This reaction is also described by the Michaelis-Menten kinetics, with a K_m value of 40.5 mM and a V_{max} of 0.4 mM/min. 6-APA behaves as a non competitive inhibitor with an inhibition constant of 30 mM. Blinkovsky and Markarian (14) found that PG behaves as competitive inhibitor in cephalixin hydrolysis, and that PAA is also a competitive inhibitor in penicillin hydrolysis. The hydrolysis of ampicillin including these two inhibitions are described by the following equation:

$$r_1 = \frac{d[\text{AMP}]}{dt} = \frac{V_A [\text{AMP}]}{(K_A) (1 + [\text{6-APA}]/K_{IA} + [\text{PG}]/K_{PG}) + [\text{AMP}] (1 + [\text{6-APA}]/K_{IA})} \quad (6)$$

where V_A is the maximum reaction rate, K_A is the Michaelis-Menten constant for ampicillin, and K_{IA} is the 6-APA non-competitive inhibition constant. Reported values for the kinetic constants for the hydrolysis of ampicillin and PGME are in general very low (between 0.001 and 10 mM) in comparison to our values of K_m (14, 15).

The effect of the concentration of the two substrates, PGME and 6-APA, in ampicillin synthesis was further investigated. Initial rates were measured by taking one of the substrates as constant and varying the concentration of other. The kinetic constant were determined as described by Segel (20). The form of the plots (Figure 10), indicate that the reaction is second order, but that the mechanism is not of the Ping Pong type (parallel lines). This result is unexpected considering the mechanism proposed in Figure 4, as methanol is released by the enzyme before 6-APA forms the amide linkage with the acyl-enzyme intermediate. Therefore, such result can only be explained if these three steps occur almost simultaneously. From these results, and applying non-linear regression, the kinetic constants were determined. Such mechanism can be described by equation 7.

$$r_2 = \frac{d[\text{AMP}]}{dt} = \frac{V_S [\text{6-APA}] [\text{PGME}]}{(K_{SA}K_{SE}) + (K_{SE}[\text{6-APA}] + K_{S6} [\text{PGME}]) + ([\text{PGME}][\text{6-APA}])} \quad (7)$$

where V_S is the maximum rate of synthesis, K_{S6} and K_{SE} are the Michaelis-Menten constant values for 6-APA and PGME (25 mM and 27.1 mM respectively), and K_{SA} represents the constant of 6-APA binding when the concentration of PGME is almost 0 and is equal to $k_1/k_{-1}=40$ mM.

Finally, the change in concentration of substrates and products during the course of a reaction is described by the following functions:

i) Decrease in PGME

$$\frac{d[\text{PGME}]}{dt} = [\text{PGME}]_0 - r_0 - r_2 \quad (8)$$

ii) Production of methanol

$$\frac{d[\text{ME}]}{dt} = r_0 + r_2 \quad (9)$$

iii) Production of ampicillin

$$\frac{d[\text{AMP}]}{dt} = r_2 - r_1 \quad (10)$$

iv) Production of PG

$$\frac{d[\text{PG}]}{dt} = r_0 - r_1 \quad (11)$$

v) Decrease in 6-APA

$$\frac{d[6\text{-APA}]}{dt} = [6\text{-APA}] + r_1 - r_2 \quad (12)$$

Figure 11 shows some results (as examples) when equations (8) to (12) are solved numerically. A good correlation between experimental results and the model is observed. Using this type of approach, the process can be optimized for maximum productivity.

CONCLUSIONS

A process for the synthesis of ampicillin is described where PGME hydrolysis is minimized by controlling the pH at a low value. Such a process resulted in yield increases of up to 75%, using 200 mM of 6-APA. This represents, to our knowledge, the highest value reported to date. A kinetic model was established considering Michaelis-Menten kinetic for the hydrolytic steps including inhibition by 6-APA and methanol, and a second order model for the synthesis. A good correlation between experimental results and the model was obtained.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by DGAPA and PADEP-UNAM. The authors wish to express their gratitude to Dr. Jose Manuel Mendez Stivalet for his assistance in the synthesis of PGME, to M.E. Rodriguez and F. Gonzalez for technical assistance. S. Ospina gratefully acknowledge Colciencias (Colombia) for her Ph. D. fellowship.

REFERENCES

1. Barber, M. & Associates. Chemical Useful Book. 1994.
2. Connors, K.A., Amidon, G. and Kennon, Ll. Chemical Stability of Pharmaceuticals. A handbook for pharmacists. John Wiley & Sons. New York. 1979, 129-137.
3. Bush, K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinical. *Microbial. Rev.* 1988, **7**, 109-123.
4. Flórey, C. Analytical profiles of drugs substances. Academic Press. New York. 1973, **2**, 1-61.
5. Doyle, F.P. Pat. Brit. 902 703. Aug 1962. Via C.A. 58 S694h (1963).
6. Cole, M. Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxipenicillins by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 1969, **115**, 757-762.
7. Kasche, V. Ampicillin- and cephalixin- synthesis catalyzed by *E. coli* penicillin amidase. Yield increase due to substrate recycling. *Biotechnol. Lett.* 1985, **7** (12), 877-882.
8. Okachi, R., Hashimoto, Y, Kawamori, M, Katsumata, R, Takayama, K and Nara, T. Enzymatic synthesis of penicillins and cephalosporins by penicillin acylase. In: *Enzyme Engineering*. Chibata, I, Saburo, Fukui, S. and Li. eds. Plenum Press, New York. 1983, **6**, 81-89.
9. Ospina, S., López-Munguía, A., Gonzalez, R.L. and Quintero, R. Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1992, **53**, 205-214.
10. Ramírez, O.T, Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. and Quintero, R. Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. *Proc. Biochem.* 1994a, **29**, 197-206.
11. Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 1994b, **16**, 895-903.
12. Illanes, A., Altamirano, C. and Cartagena, O. Enzyme reactor performance under thermal inactivation. In: *Advances in Bioprocess Engineering*. E. Galindo & O.T. Ramirez eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1994, 467-472.
13. Shewale, J.G. and Sivaraman, H. Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. *Proc. Biochem.* 1989, **24**, 146-154.
14. Blinkovsky, A.M. and Markaryan, A.N. Synthesis of β -lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, **15**, 965-973.

15. Margolin, A.L, Svedas, V.K. and Berezin, I.V. Substrate specificity of penicillin amidase from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1980, **616**, 283-289.
16. Fernandez Lafuente, R., Rosell, C.M., Alvaro, G, Blanco, R.M. and Guisan, J.M. Synthesis of antibiotics in the presence of organic cosolvents catalyzed by stabilized penicillin-acylase derivatives. *Med. Fac. Rijkuniv. Gent* 1991, **56** (4a), 1751-1758.
17. Kasche, V. Mechanism and yields in enzyme catalyzed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme Microb. Technol.* 1986, **8**, 4-16.
18. Boccu, E., Ebert, C., Gardossi, L., Gianferrara, T., Zacchigna, M. and Linda, P. Enzymatic synthesis of ampicillin: a chemometric optimization. *Farmaco* 1991, **46** (4), 565-577.
19. Roberts, D.V. Enzyme Kinetics. Elmore, D.T., Leadbetter, A.J. and Schofield, K. eds. Cambridge University Press. London. 1977, 83-96.
20. Segel, I. Enzyme kinetics. John Wiley & Sons. New York. 1975.
21. Nam, D.F., Kim, C. and Ryu, D.D. Reaction kinetics of cephalixin synthesizing enzyme from *Xanthomonas citri*. *Biotechnol. Bioeng.* 1985, **27**, 953-960.
22. Ospina, S., Merino, E., Ramírez, O.T. and Lopez-Munguía, A. Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: Production, characterization and use in the synthesis and hydrolysis of antibiotics. *Biotechnol. Lett.* 1995, **17** (6), 615-620.
23. Shewale, J.G., Kumar, K.K. and Ambekar, G.R. Evaluation of 6-aminopenicillanic acid by p-dimethylaminobenzaldehyde. *Biotechnol. Tech.* 1987, **1**, 69-72.
24. Dictionary of organic compounds. Fifth Edition. Chapman and Hall. New York. 1982.
25. Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P, Dodson, E.J., Dodson, G. and Moody, P.C. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* 1995, **373**, 264-268.
26. Shimizu, M, Okachi, R and Kimura, K. Purification and properties of penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*. *Agr. Biol. Chem.* 1975, **39** (8), 1655-1661.
27. Kasche, V., Galunsky, B., Hauffler, U. and Zollner, R. Kinetically vs. equilibrium-controlled synthesis of C-N bonds in β -lactams and peptides with free and immobilized biocatalysts. In: *Enzyme Technology*. R.M. Lafferty ed. Springer Verlag. New York, 1983, 299-308.

Table 1. Activity of PA from *E. coli* compared with various substrates, at 25°C.

Reaction	Vmax (mM/min) pH 7.0	% Vmax pH 7.0	Vmax (mM/min) pH 6.0	% Vmax pH 6.0
Penicillin G hydrolysis ^{1,2}	3	100	3	100
FGME hydrolysis ²	1.86	62	0.32	10.6
Ampicillin hydrolysis ²	1.16	38.7	0.42	14
Ampicillin synthesis ³	0.75	25	0.4	13.3

(1) Taken as reference, as it is the reaction with the highest rate.

(2) Measured under substrate saturating conditions (60 mM PGK; 100 mM FGME and 100 mM ampicillin).

(3) Measured under optimal conditions proposed by Cole (6) (50 mM 6-APA, 150 mM PGME).

Table 2. Comparison between the ampicillin yields in synthesis reaction with PA under different reaction conditions (25°C).

pH	[6-APA]:[PMGE] (mM:mM)	[Ampicillin] mM	% Conversion	Productivity (g Amp/g 6-APA-batch)	Productivity (mg Amp/Uenz-batch)	Ref
6.5	46:184	27.6	60	0.969	3.03	7,26
6	93:300	46.5	50	0.807	n.r.	27
7	93:300	55.8	60	0.968	n.r.	27
7.5	200:300	94	47	0.758	n.r.	7
7.5	200:300+MeOH	112	56	0.904	n.r.	7
6	50:150	30	60	0.969	3.5	*
6	50:200	35	70	1.129	4.07	*
6	100:300	75	75	1.212	8.72	*
6	200:600	150	75	1.210	17.45	*

* this work n.r. = not reported

Figure 1. Models proposed to describe the effect of pH on enzyme activity

<p>Model I</p> $ \begin{array}{c} E + H^+ \\ \text{K}_{2e} \updownarrow \\ EH + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EHS \xrightarrow{k_2} EH + P \\ \text{K}_{1e} \updownarrow H^+ \\ EH_2^+ \end{array} $	$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_S \left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_{1e}} + \frac{K_{2e}}{[H^+]} \right\}} \quad (1)$
<p>Model II</p> $ \begin{array}{c} ES + H^+ \\ \text{K}_{2es} \updownarrow \\ EH + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EHS \xrightarrow{k_2} EH + P \\ \text{K}_{1es} \updownarrow H^+ \\ EH_2S^+ \end{array} $	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S] \left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_{1e}} + \frac{K_{2e}}{[H^+]} \right\}} \quad (2)$
<p>Model III</p> $ \begin{array}{c} E + H^+ \\ \text{K}_{2e} \updownarrow \\ EH + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EHS \xrightarrow{k_2} EH + P \\ \text{K}_{1e} \updownarrow \\ EH_2^+ \end{array} \quad \begin{array}{c} ES + H^+ \\ \text{K}_{2es} \updownarrow \\ \text{K}_{1es} \updownarrow H^+ \\ EH_2S^+ \end{array} $	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_S \left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_{1e}} + \frac{K_{2e}}{[H^+]} \right\} + [S] \left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_{1es}} + \frac{K_{2es}}{[H^+]} \right\}} \quad (3)$
<p>Model IV</p> $ \begin{array}{c} E + H^+ \quad SH^+ \quad ES + H^+ \\ \text{K}_{2e} \updownarrow \text{K}_c \updownarrow \text{K}_{2es} \updownarrow \\ EH + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EHS \xrightarrow{k_2} EH + P \\ \text{K}_{1e} \updownarrow \text{K}_{1es} \updownarrow \\ EH_2^+ \quad EH_2S^+ \end{array} $	$v = \frac{V_{max}[S]}{\left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_c} \right\} \left[K_S \left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_{1e}} + \frac{K_{2e}}{[H^+]} \right\} + [S] \frac{\left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_{1es}} + \frac{K_{2es}}{[H^+]} \right\}}{\left\{ 1 + \frac{[H^+]}{K_c} \right\}} \right]} \quad (4)$

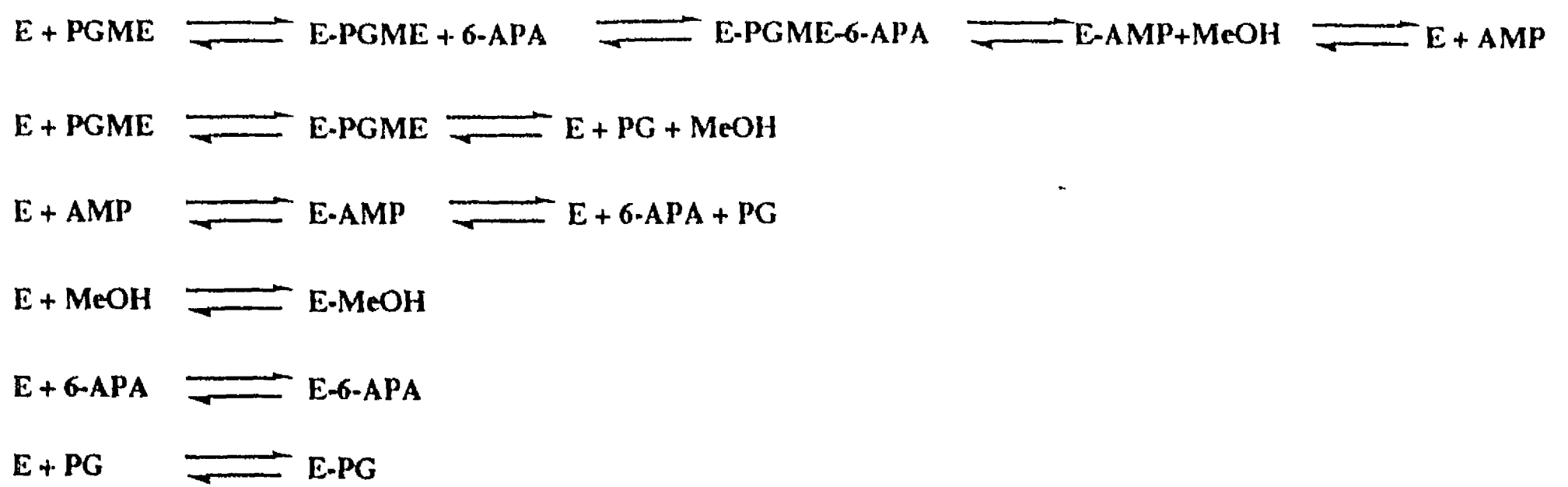


Figure 2. Proposed mechanism for the enzymatic synthesis of ampicillin and hydrolysis of PGME and ampicillin.

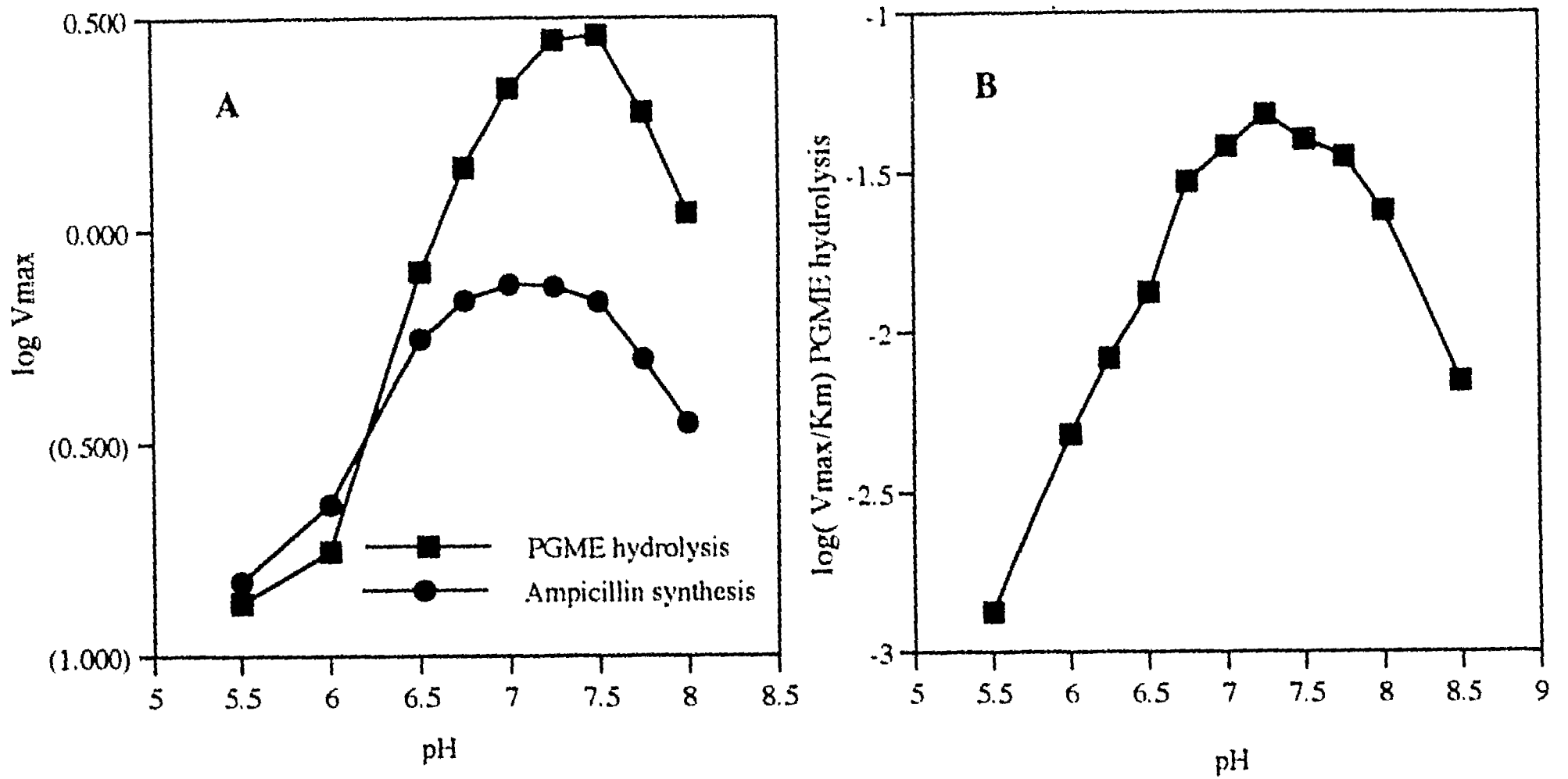


Figure 3 . Effect of pH on the maximum reaction rate of PGME hydrolysis and ampicillin synthesis using PA from *E. coli*, 25°C, E=3U/ml A. 50 mM 6-APA, 150 mM FGME B. 5 mM FGME

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

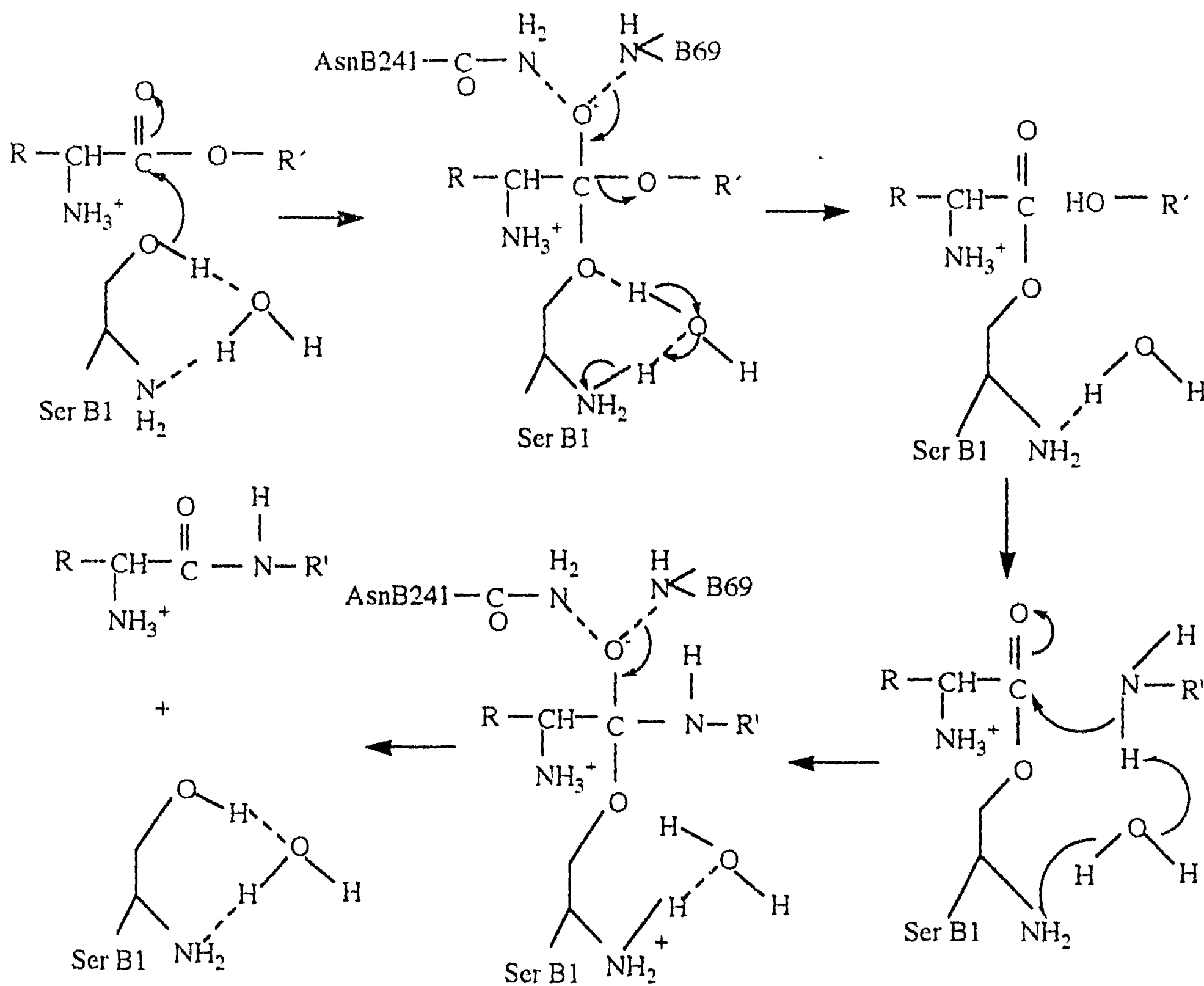


Figure 4. Catalytic activity of PA from *E. coli*.

Steps in the catalytic mechanism showing the role of water bound and the α -amino group to increase the nucleophilicity in serine B1 and showing the interactions that form the cavity of the oxyanion by the tetrahedral intermediate.

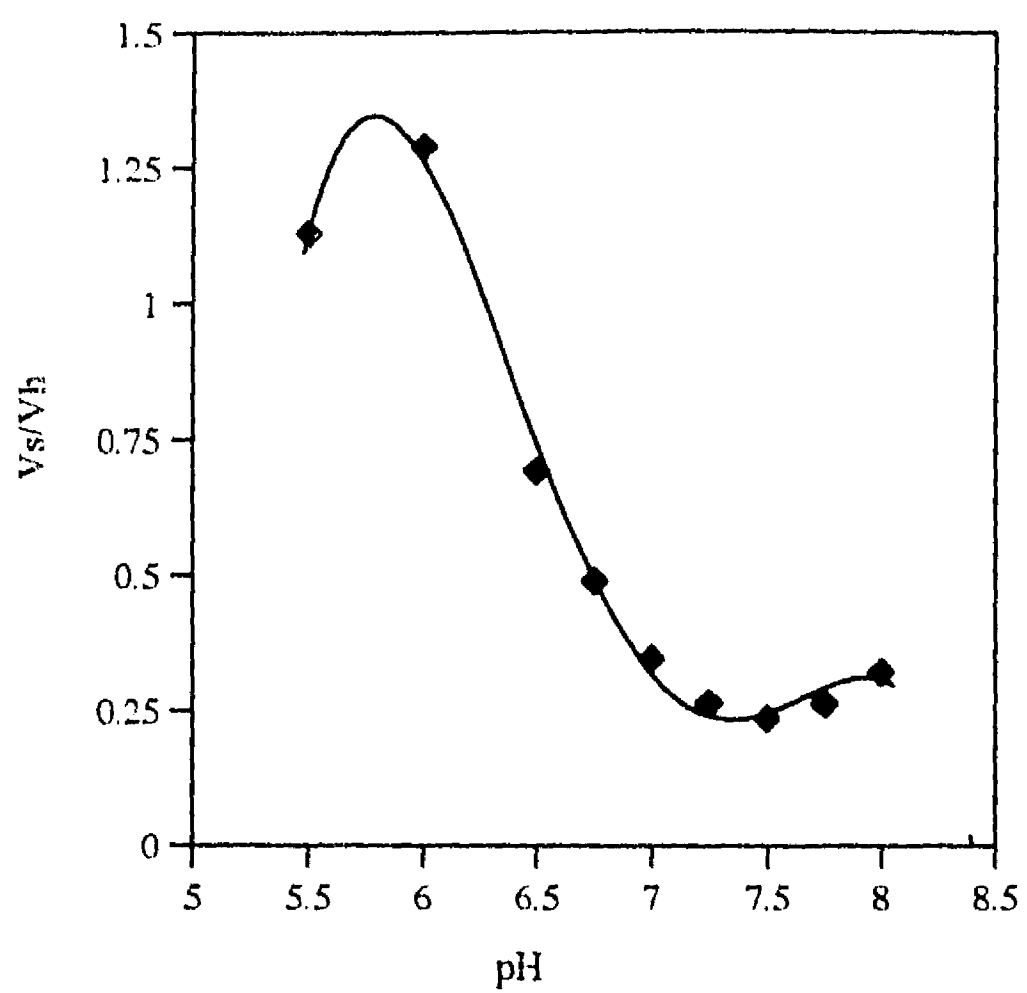


Figure 5 . Effect of pH on the ratio of the initial rate of ampicillin synthesis to the initial rate PGME hydrolysis. Reaction conditions: 25°C, 50 mM 6-APA, 150 mM FGME, E = 3U/ml

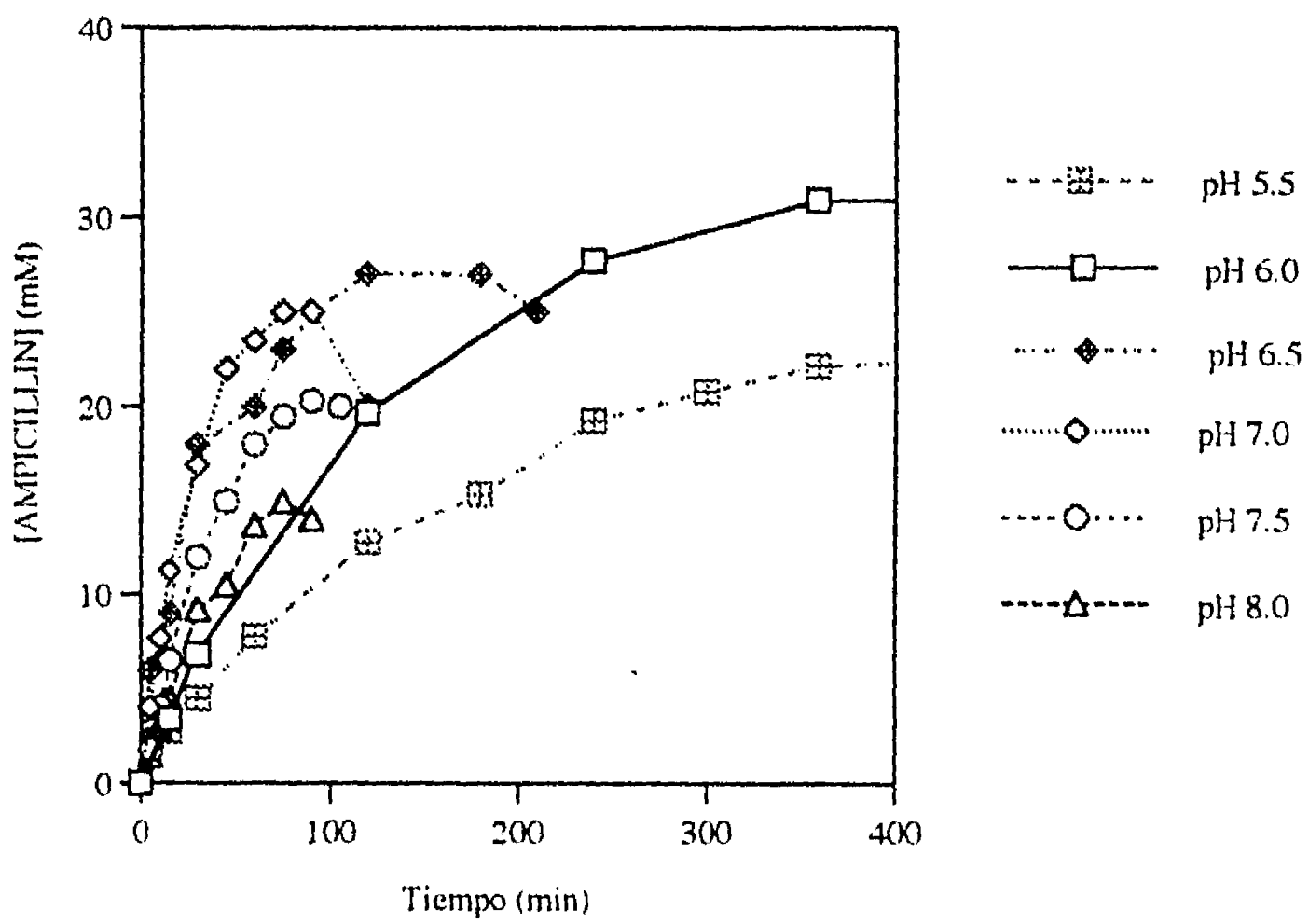


Figure 6 . Evolution of batch reactions of ampicillin synthesis at various pH values. Reaction conditions: 6-APA=50mM; FGME=150mM; temperature 25°C, phosphate buffer 0.1M, pH regulation with NH₄OH E=3U/ml.

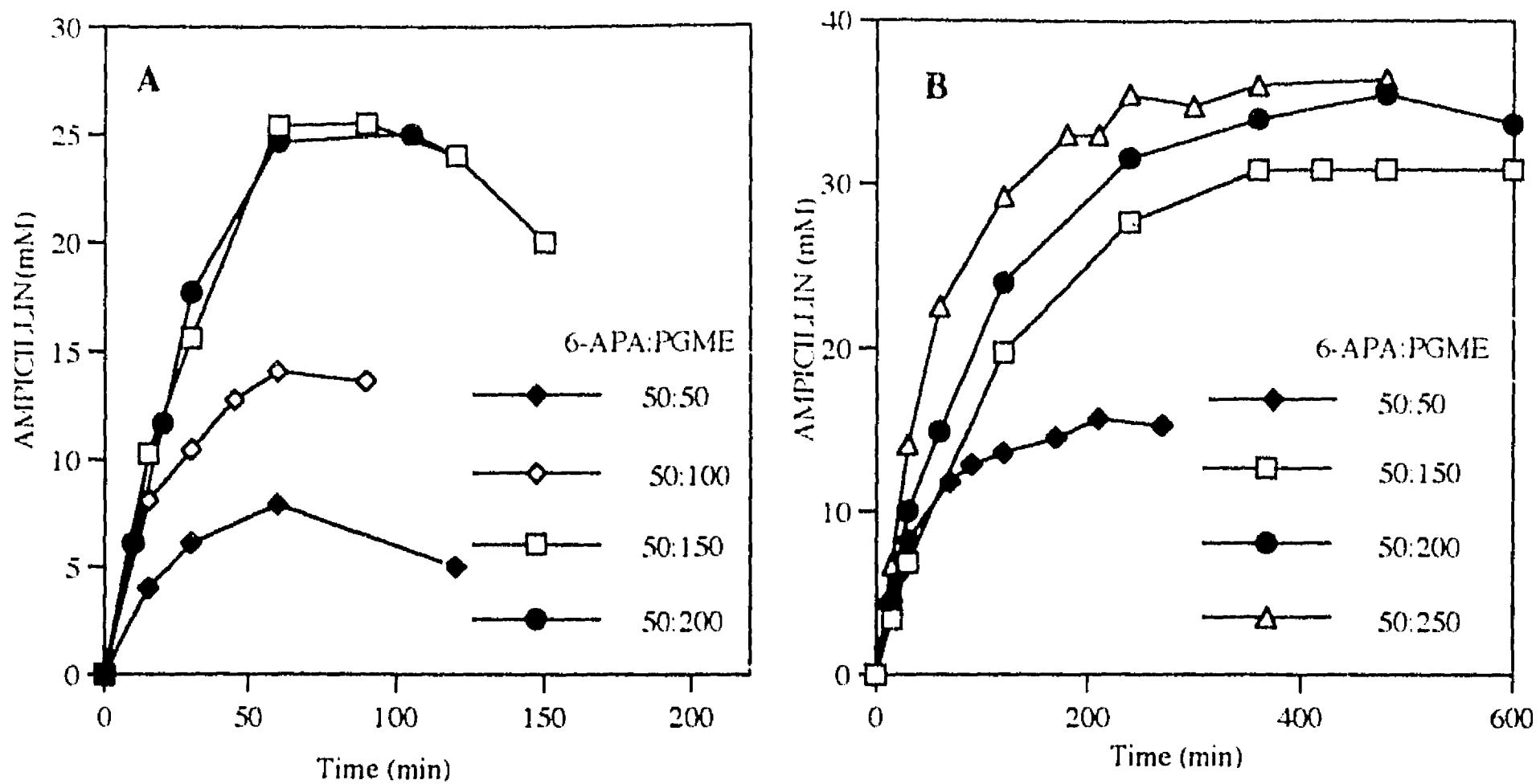


Figure 7 . Effect of the ratio of 6-APA to PGME concentration in the evolution of Ampicillin synthesis with PA at 25°C E=3U/ml. A. pH 7.0 B. pH 6.0.

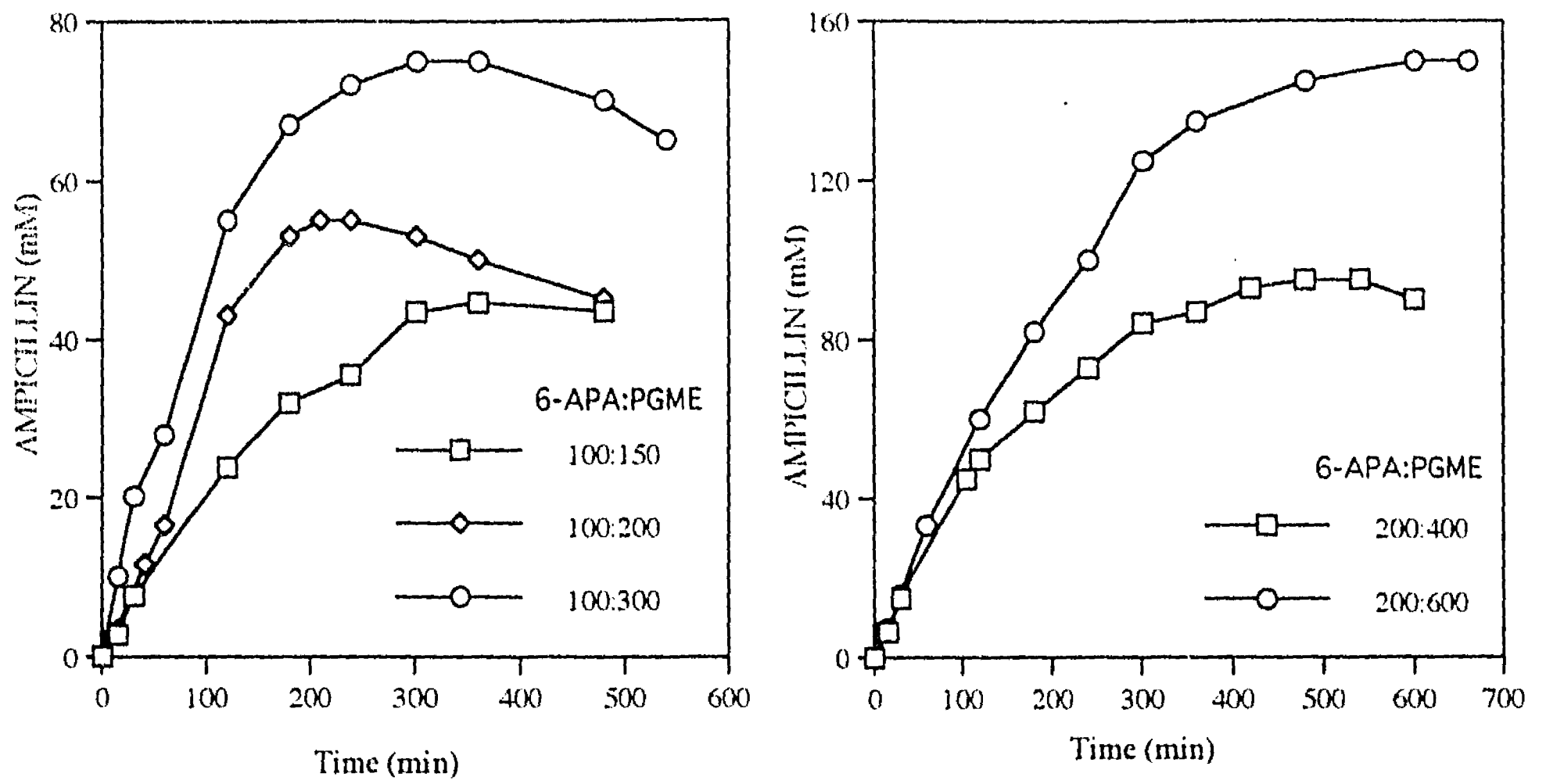


Figure 8 . Effect of the substrate concentration in the Ampicillin synthesis using PA from *E. coli*. Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0, pH regulation with NH_4OH ; temperature 25°C ; $E=3\text{U/ml}$.
A. 100 mM 6-APA. **B.** 200 mM 6-APA

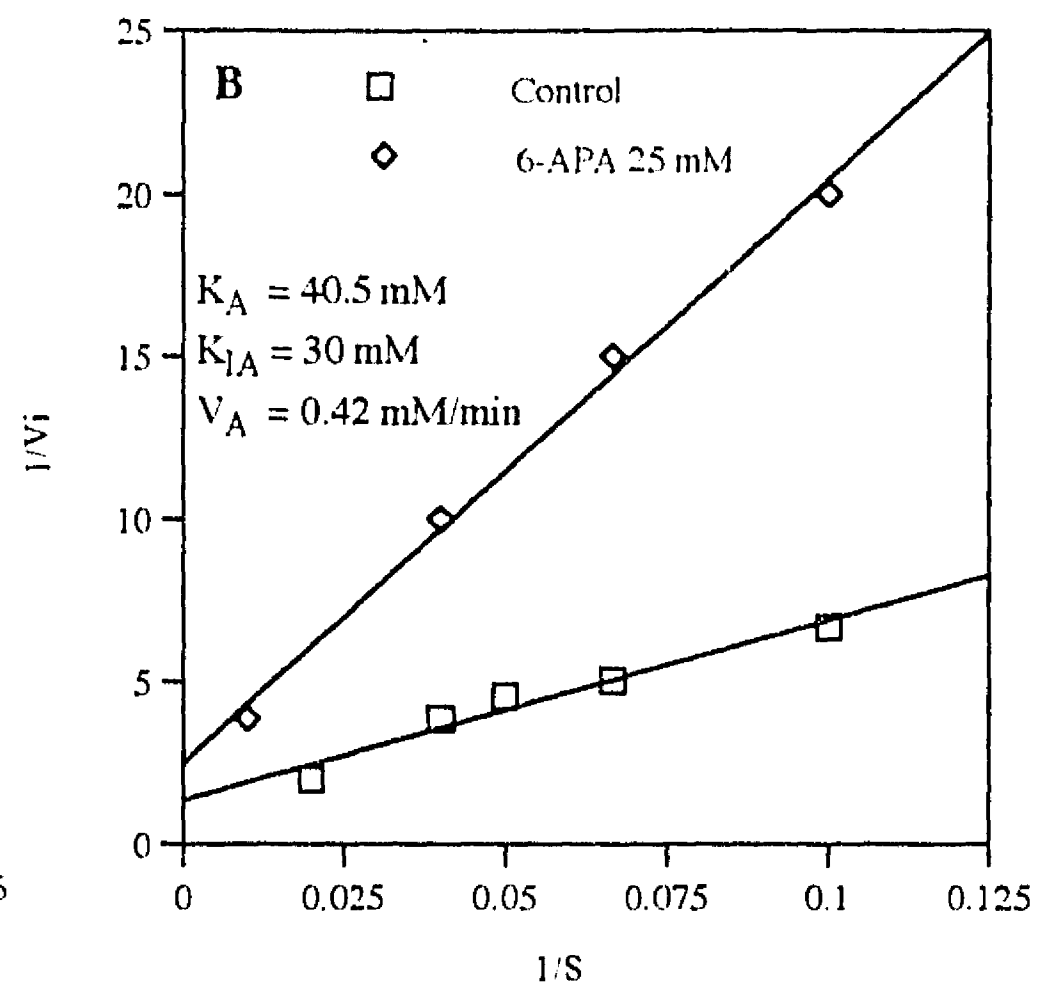
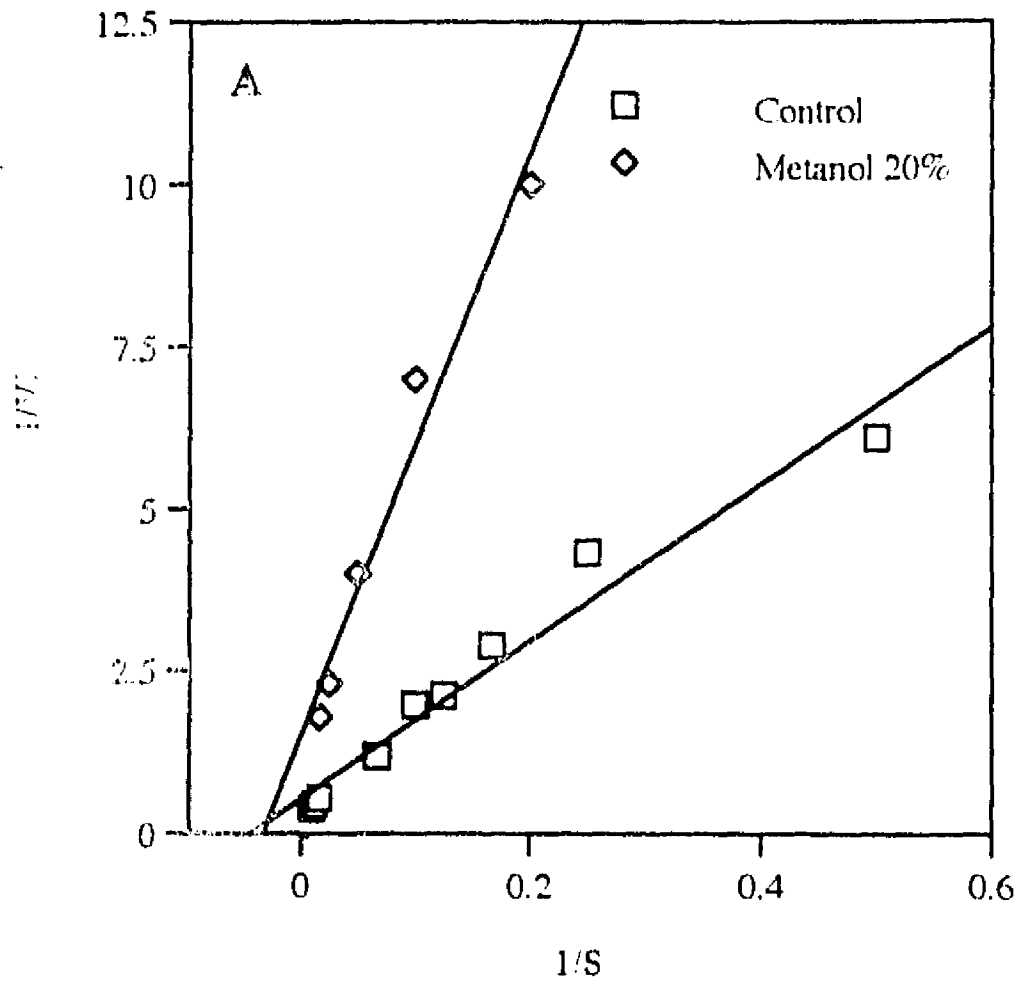


Figure 9. A. Non-competitive inhibition of methanol on PGME hydrolysis catalized by PA from *E. coli*. B. Non-competitive inhibition of 6-APA on ampicillin hydrolysis catalized by PA from *E. coli*. pH 6.0 25 °C, E=3U/ml.

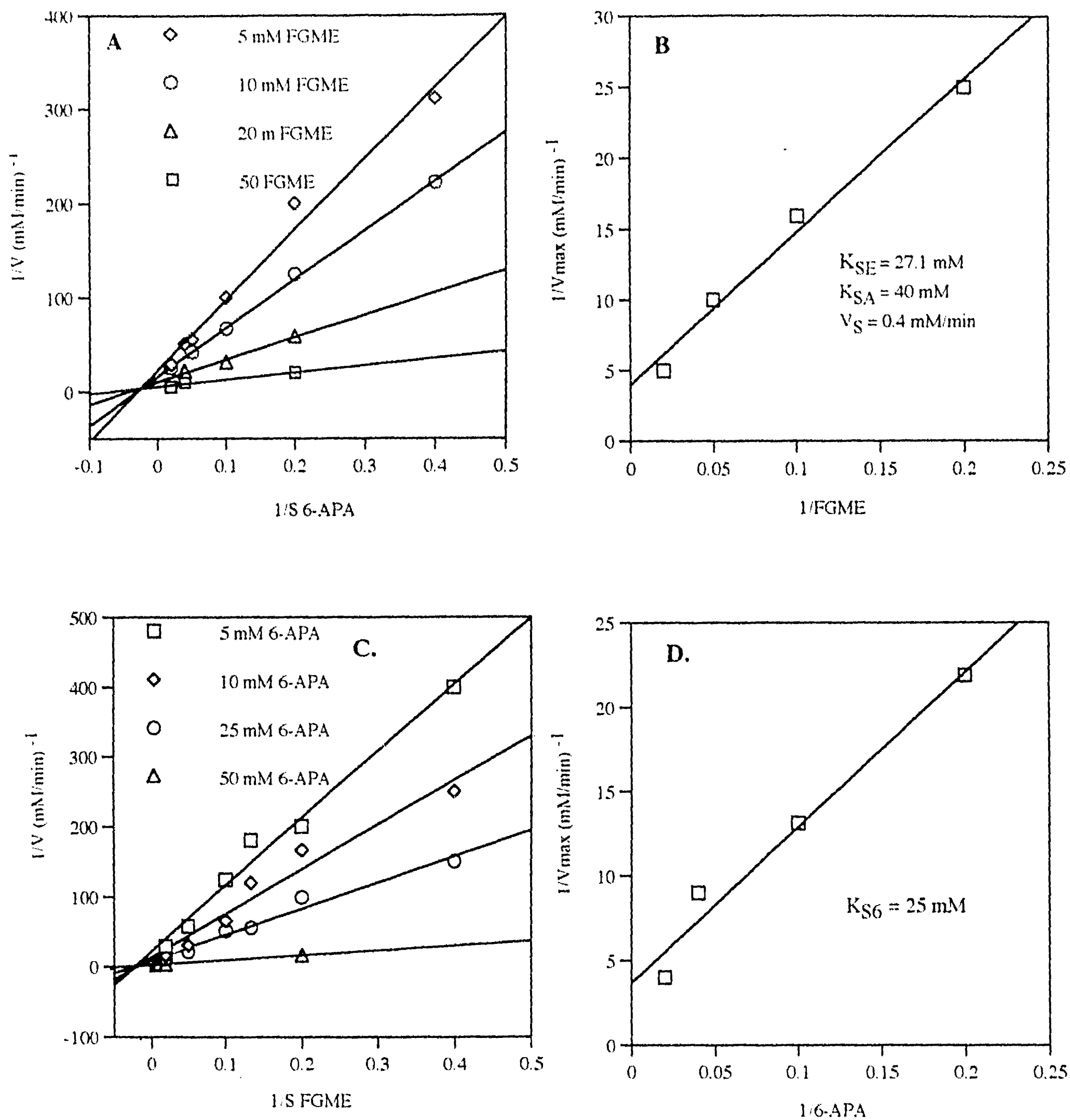


Figure 10 . Kinetic characterization of the ampicillin synthesis reaction catalyzed by PA by a second order model.

A. Dependence of 6-APA concentration on the ampicillin synthesis initial rate. **B.** Determination of the FGME K_m . **C.** Dependence of FGME concentration on the ampicillin synthesis initial rate. **D.** Determination of the 6-APA K_m . pH 6.0, 25°C, E=3U/ml.

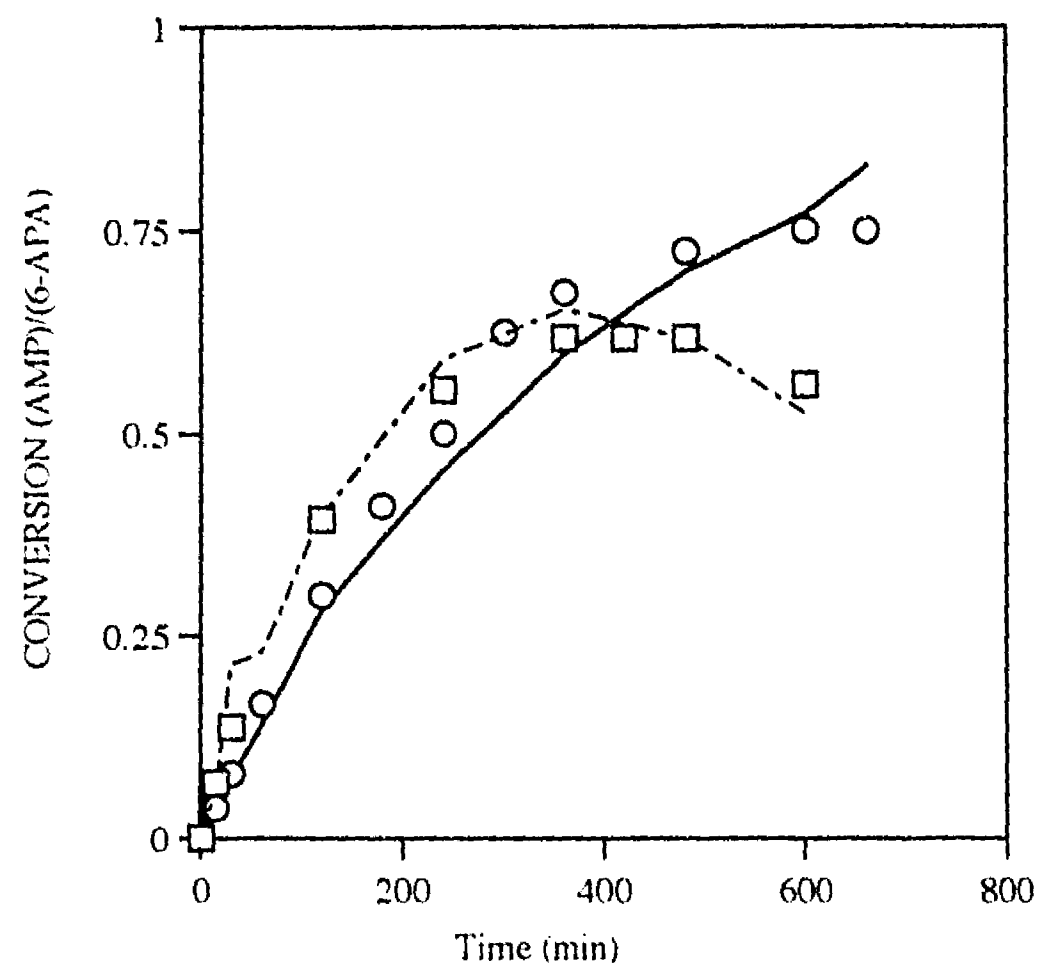


Figure 11 . Kinetic of the ampicillin synthesis using 50:150 mM 6-APA:PGME and 200 600 mM 6-APA:PGME
 Lines correspond to the prediction made from the kinetic model.
 pH 6.0, 25°C, E=3U/ml