

2ej.
106

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Química

"Hidrólisis enzimática de bencilcefalosporina, mediante la inmovilización de células intactas de E.coli con actividad penicilino amidasa, empleando como soporte carragenina"

T E S I S
Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a



Ma. Elena Rodríguez Alegria

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



México, D. F.

1986



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.

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
1.1 La tecnología enzimática en la producción de intermedios para la producción de antibióticos β -lactámicos semisintéticos.	3
1.2 Técnicas de inmovilización.	7
1.3 Inmovilización de células microbianas en K-carragenina.	11
1.4 Propiedades de células y enzimas inmovilizadas.	20
II. ANTECEDENTES	27
2.1 Clasificación y biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.	27
2.2 Cefalosporinas semisintéticas.	29
2.2.1 Producción de cefalosporinas semisintéticas	34
2.3 Penicilino amidasa.	35
2.3.1 Clasificación y microorganismos productores.	35
2.3.2 Características y propiedades de la penicilino amidasa de <u>E. coli</u> .	39
2.3.3 Perfil de sustrato.	42
2.4 Sistemas inmovilizados.	44
2.4.1 Métodos que se han empleado para la inmovilización de penicilino amidasas.	44
2.4.2 Sistemas de penicilino amidasa inmovilizados en conversión de cefalosporinas.	44
III. OBJETIVOS.	55
IV. MATERIALES Y METODOS.	56
4.1 Materiales.	
4.1.1 Reactivos.	56
4.1.2 Equipo.	57
4.1.3 Cepa.	58
4.2 Métodos.	58
4.2.1 Medios de cultivo.	58
4.2.2 Conservación de la cepa.	59
4.2.3 Determinación de 7-ADCA por el método de p-dimetilaminobenzaldehído.	59
4.2.4 Determinación de proteína celular (método de -- Lowry)	63
4.2.5 Determinación de actividad enzimática en células libres.	65
4.2.6 Purificación del sustrato.	68
4.2.7 Curva de crecimiento.	69
4.2.8 Producción de la enzima penicilino amidasa contenidas en células de <u>E. coli</u> ATCC 9637.	70
4.2.9 Inmovilización de células de <u>E. coli</u> ATCC 9637 - en carragenina.	71
4.2.10 Determinación de actividad enzimática en el biocatalizador.	74
4.3 Diseño experimental.	75

	Pág.
V. RESULTADOS Y DISCUSION.	86
5.1 Consideraciones preliminares.	86
5.2 Producción de la enzima penicilino amidasa contenida en células de <u>E. coli</u> ATCC 9637.	88
5.3 Estabilidad al almacenamiento de la enzima penicilino amidasa contenida en células intactas de <u>E.coli</u> ATCC 9637.	91
5.4 Estudio del sistema libre e inmovilizado.	94
a) Perfil de pH.	94
b) Perfil de temperatura.	97
c) Determinación de la energía de activación.	102
d) Termoestabilidad.	105
e) Efecto de la concentración de sustrato.	111
5.5 Estudio de la influencia de tamaño de partícula del biocatalizador y del curtido sobre la expresión de la actividad.	116
5.6 Montaje y operación de un reactor enzimático en la hidrólisis de bencilcefalosporina.	120
VI. CONCLUSIONES.	123
VII. RECOMENDACIONES.	125
VIII. BIBLIOGRAFIA.	126

INDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Diagrama comparativo entre los procesos dirigidos a la inmovilización de enzimas purificadas y de células inmovilizadas.	6
Figura 2. Esquematación de los métodos de inmovilización empleados para células o enzimas microbianas.	8
Figura 3. Estructura química de la carragenina.	12
Figura 4. Mecanismo de gelificación de la carragenina.	18
Figura 5. Esquema de la inmovilización de células microbianas utilizando como soporte carragenina.	21
Figura 6. Estructura básica de penicilinas y cefalosporinas.	28
Figura 7. Producción de intermediarios de cefalosporinas	38
Figura 8. Reacciones catalizadas la penicilino amidasa.	41
Figura 9. Obtención de bencilcefalosporina a partir de penicilina G por síntesis química.	51
Figura 10. Curva estandar de 7-ADCA.	62
Figura 11. Curva estandar de proteína.	66
Figura 12. Curva estandar de peso seco de <u>E. coli</u> ATCC 9637	72
Figura 13. Procedimiento utilizado para determinar estabilidad al almacenamiento de células de <u>E.coli</u> ATCC 9637.	79
Figura 14. Características del reactor utilizado en la hidrólisis de bencilfepalosporina.	84
Figura 15. Sistema de hidrólisis de la bencilcefalosporina.	85
Figura 16. Diagrama del proceso para la producción del ácido 6-aminopenicilánico.	87
Figura 17. Cinéticas de fermentación.	90
Figura 18. Estabilidad al almacenamiento de la penicilino amidasa contenida en células intactas de <u>E. coli</u> ATCC 9637.	93

	Pág.
Figura 19. Perfil de pH del sistema soluble.	96
Figura 20. Perfil de pH del sistema inmovilizado.	98
Figura 21. Perfil de temperatura del sistema soluble.	100
Figura 22. Perfil de temperatura del sistema inmovilizado	101
Figura 23. Energía de activación del sistema soluble.	103
Figura 24. Energía de activación del sistema inmovilizado	104
Figura 25. Termoestabilidad del sistema soluble.	107
Figura 26. Termoestabilidad del sistema inmovilizado.	108
Figura 27. Termoestabilidad a 50°C (gráfica comparativa)	109
Figura 28. Termoestabilidad a 55°C (gráfica comparativa)	110
Figura 29. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima. Sistema soluble (Lineawaver-Burk).	112
Figura 30. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad del sistema inmovilizado (Lineawaver-Burk)	114
Figura 31 Comportamiento de las hidrólisis de bencilcefalosporina con el biocatalizador de células de <u>E.coli</u> -carragenina.	122

INDICE DE TABLAS.

Pág.

Tabla 1. Características comparativas de los métodos utilizados en la inmovilización de células microbianas.	10
Tabla 2. Actividad enzimática y estabilidad de células microbianas inmovilizadas en poliacrilamida y carragenina.	13
Tabla 3. Células microbianas inmovilizadas por adsorción.	16
Tabla 4. Células microbianas inmovilizadas por entrecruzamiento.	16
Tabla 5. Células microbianas inmovilizadas por atrapamiento.	17
Tabla 6. Comparación entre las propiedades de células libres e inmovilizadas para diferentes procesos.	26
Tabla 7. Principales cefalosporinas producidas por fermentación.	31
Tabla 8. Principales cefalosporinas semisintéticas.	33
Tabla 9. Microorganismos que producen penicilino amidasa.	36
Tabla 10. Datos de Km de penicilino amidasa de <u>E.coli</u> utilizando penicilina G como sustrato.	40
Tabla 11. Perfil de sustrato para la penicilino amidasa de <u>E.coli</u> .	43
Tabla 12. Ejemplos de métodos de inmovilización de penicilino amidasas y uso para la producción de 6-APA.	45
Tabla 13. Deacilación de penicilinas por penicilino amidasas inmovilizadas.	46
Tabla 14. Hidrólisis de algunas cefalosporinas semisintéticas por penicilino G amidasas.	49
Tabla 15. Deacilación de cefalosporinas por penicilino amidasas inmovilizadas.	54
Tabla 16. Eficiencia del biocatalizador sin curtir con respecto a su tamaño de partícula.	118
Tabla 17. Eficiencia del biocatalizador curtido con respecto a su tamaño de partícula.	119

NOMENCLATURA.

6-APA	ácido 6-aminopenicilánico
7-ACA	ácido 7-aminocefalosporánico
7-ADCA	ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico
B-7-ADCA	ácido bencil 7-aminodesacetoxicefalosporánico
ATCC	American Type Culture Collection.
V_o	velocidad inicial
$V_{m\acute{a}x.}$	velocidad máxima
Km	constante de Michaelis-Menten
rpm	revoluciones por minuto
vvm	volumen de aire por volumen de medio por minuto
K_{1a}	coeficiente de transferencia de masa.

Ecuación de Van'Riet.

$$K_{1a} = k(p_g/V)^{0.4}(V_s)^{0.2}$$

donde:

$$k = 2.0 \times 10^{-3}$$

K_{1a} = seg (coeficiente de transferencia de masa)

P_g/V = W/m³ (potencia de aireación por unidad de volumen)

V_s = m/seg (velocidad superficial de aire)

1. INTRODUCCION.

Los antibióticos lactámicos son los más antiguos, y los primeros agentes quimioterapéuticos de mayor importancia durante los pasados 50 años. La biogénesis de estos compuestos no ha sido totalmente elucidada desde que Flemming en 1929, observó antibiósisis entre una especie de *Penicillum* y cultivos bacterianos vecinos. La sustancia antibacteriana observada por Flemming fue denominada penicilina G, e introducida por primera vez en medicina por una cooperativa Anglo Americana durante la segunda guerra mundial. (Flynn, 1972).

El avance de esta empresa fue debido al rápido desarrollo del proceso de fermentación a gran escala y a la selección del *Penicillum* sobreproductor.

Por este tiempo (1950), cuando se empezaron a descubrir las limitaciones de la Penicilina G, incluyendo su baja actividad relativa contra bacilos gram negativos, tales como el bacilo de la tuberculosis, Newton y Abraham descubren en 1953 otra variedad de antibióticos lactámicos como lo son las cefalosporinas. (Flynn, 1972).

El descubrimiento de las cefalosporinas atrae la atención de muchos investigadores, debido a sus propiedades antibacterianas y principalmente a su estabilidad en medios ácidos y su

gran resistencia a la enzima β -lactamasa en comparación con las penicilinas.

Los antibióticos β -lactámicos son biológicamente raros, químicamente difíciles de sintetizar, eminentemente naturales y su producción depende de fermentaciones industriales. La síntesis química de estos compuestos se ha intentado, pero dichos esfuerzos no son competitivos con la síntesis microbiana, sin embargo, estos antibióticos pueden ser modificados fácilmente por ruta química o enzimática.

La modificación de la cadena lateral de los antibióticos β -lactámicos naturales les confiere una serie de características importantes, entre las principales tenemos: aumento de su actividad intrínseca, de su espectro antibacteriano, de su estabilidad contra la enzima β -lactamasa y medios ácidos, así como el incremento en sus propiedades farmacocinéticas.

A este tipo de antibióticos se les denomina: "Antibióticos semisintéticos".

La modificación de los antibióticos β -lactámicos consiste básicamente en remover la cadena lateral de las penicilinas y cefalosporinas que no presentan las características necesarias para ser utilizadas como agentes terapéuticos, de esta manera, se obtienen sus núcleos estructurales; ácido 6-aminopenicilánico - (6-APA), ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y ácido 7-aminodesactoxi--

cefalosporánico (7-ADCA) , los cuales con la adición de una adecuada cadena lateral nos dan las denominadas penicilinas y cefalosporinas semisintéticas.

Como ya se mencionó, la modificación de los antibióticos lactámicos puede realizarse por vía química o por vía enzimática, y es debido a esta última opción que la producción de penicilinas y cefalosporinas semisintéticas han tomado un matiz muy interesante.

1:1 La tecnología enzimática en la producción de intermedios para la producción de antibióticos β -lactámicos semisintéticos.

Las enzimas son proteínas especializadas en catálisis de reacciones biológicas (Lenhinger, 1979) que presentan características muy importantes para ser utilizadas en este tipo de procesos:

1. alta especificidad.- que permite la catálisis de un solo tipo de reacción, evitando así la producción de compuestos indeseables ocasionados por reacciones colaterales inespecíficas, dadas comunmente en procesos químicos.

2. las condiciones de operación como son un pH moderado, presión atmosférica y temperaturas relativamente bajas con velocidades de reacción elevadas, disminuyen los consumos energéticos y de equipo.

La utilización de microorganismos como fuente enzimática ha permitido que las enzimas tengan un mayor uso, ya que pueden ser producidas más fácilmente y en mayor cantidad por técnicas de Ingeniería Genética y manipulación de factores ambientales.

En la última década dado el gran desarrollo que ha tenido la tecnología enzimática se han implementado técnicas de inmovilización de células y enzimas microbianas con alguna actividad biológica. Estas técnicas consisten en restringir la movilidad de enzimas o células microbianas y mantenerlas en una región del espacio relativamente definida con una adecuada retención de su actividad catalítica, lo que permite:

- a) la reutilización de la enzima,
- b) utilización del sistema en procesos continuos,
- c) un mayor control de la reacción, ya que la preparación inmovilizada puede ser incorporada o extraída de la reacción sin mayor dificultad,
- d) alta pureza y rendimiento de los productos. La pureza en los antibióticos es particularmente importante, debido a que la presencia de proteínas en el producto final da lugar a la formación de compuestos alergénicos, y
- e) ahorro de recursos y menor contaminación.

Las ventajas de disponibilidad, costo y manejo de las preparaciones de la enzima libre o inmovilizada (fig. 1), hace pensar en un proceso más simple, como es la inmovilización de

células intactas con la actividad enzimática deseada.

Los factores que se deben tomar en consideración para la utilización de células microbianas inmovilizadas sobre la utilización de enzimas inmovilizadas son:

- a) si las enzimas son intracelulares,
- b) si el extracto enzimático o enzima purificada es inestable antes, durante o después de la inmovilización,
- c) si los microorganismos no contienen enzimas que realicen reacciones colaterales y afecten al producto de interés, y si existen, sean fáciles de inactivar,
- d) si los sustratos y productos son de bajo peso molecular, y
- e) si se requiere el sistema multienzimático del microorganismo.

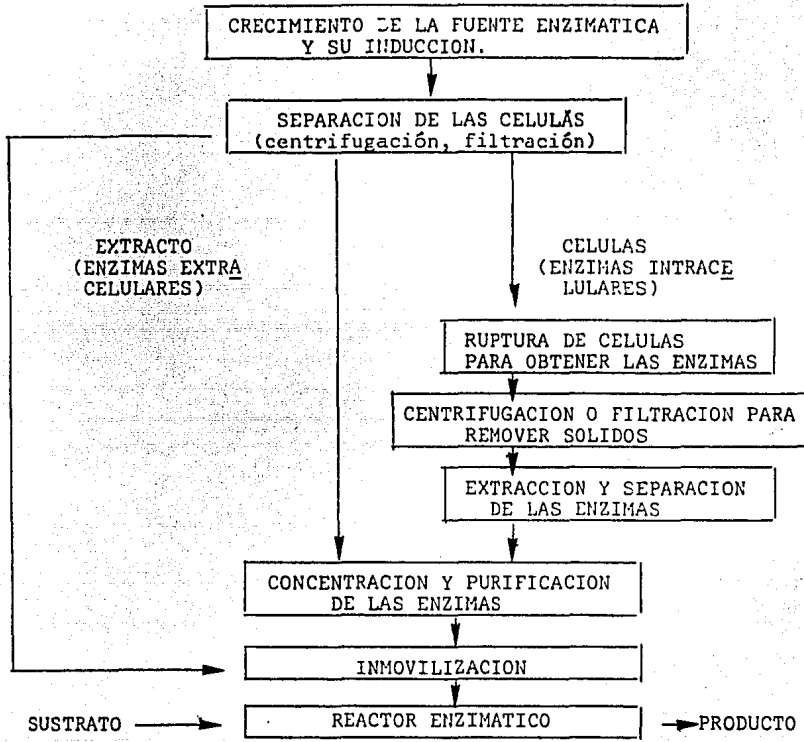
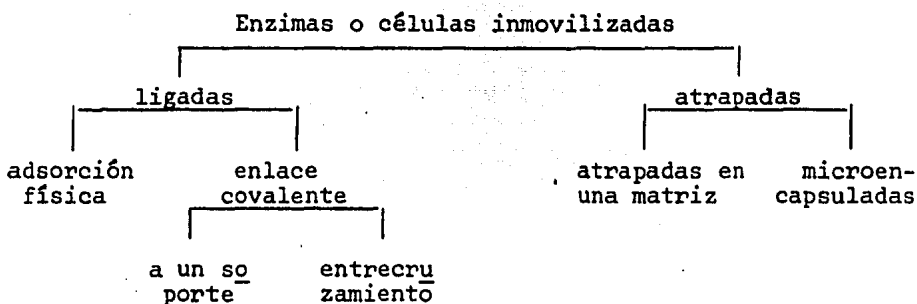


Fig. (1) Diagrama comparativo entre los procesos dirigidos a la inmovilización de enzimas purificadas y de células microbianas.

1.2 Técnicas de inmovilización.

Las técnicas de inmovilización de enzimas y células pueden clasificarse en enzimas o células ligadas a un soporte y enzimas o células atrapadas, que a su vez se dividen de la siguiente manera, (Fig. 2).



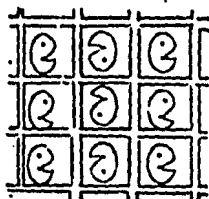
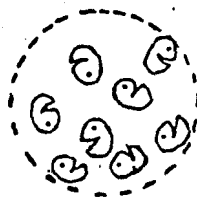
De los métodos antes mencionados los más apropiados en la inmovilización de células microbianas son,

- A. Ligadas a un soporte por adsorción química o física
- B. Entrecruzamiento y,
- C. Atrapamiento en una matriz.

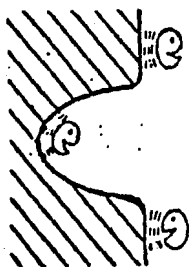
En la tabla (1) se muestran las características comparativas de los métodos utilizados en la inmovilización de células microbianas.

A. Adsorción química o física. Este método consiste en el acoplamiento de las células microbianas a la superficie de un soporte. Dicho acoplamiento puede llevarse a cabo por alguno o la

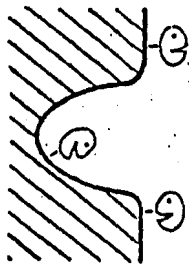
Enzimas o células atrapadas

Atrapamiento a una
matrizAtrapamiento a una
microcápsula

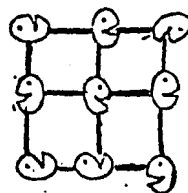
Enzimas o células ligadas :



Adsorción física



Enlace covalente



Entrecruzamiento

Fig. 2. Esquematación de los métodos de inmovilización empleados para células o enzimas microbianas

combinación de los siguientes tipos de enlaces,

- fuerzas de van der Waals
- interacciones hidrofóbicas
- puentes de hidrógeno
- transferencia de cargas
- intercambio de iones y,
- quimioadsorción

B. Entrecruzamiento. Este método está basado en la formación de enlaces covalentes intermoleculares entre los componentes de la membrana o pared celular del microorganismo y un agente bi o multifuncional.

Los agentes bi o multifuncionales más utilizados son el glutaraldehído, los disocianatos, la bisdiazobenzidina, la carbodiimida, etc. La aplicación de este método no ha sido muy amplia, sin embargo, puede resultar un buen método encontrando el agente bi o multifuncional y concentración adecuada para el microorganismo deseado.

C. Atrapamiento en una matriz. Esta técnica consiste en retener las células microbianas en espacios intersticiales construidos durante la formación de un gel o un polímero insoluble en agua. Este método es el más utilizado en la inmovilización de células microbianas.

Tabla 1. Características comparativas de los métodos utilizados en la inmovilización de células microbianas. (Chibata, 1978).

Características	Células ligadas		Entrecruzamiento	Atrapamiento en una matriz
	Adsorción física	Adsorción química		
Preparación	fácil	fácil	difícil	fácil
Actividad * Enzimática	alta	alta	moderada	alta
Especificidad * por sustrato	no varía	no varía	variable	no varía
Unión Células-soporte	débil	fuerte	fuerte	moderada
Regeneración	posible	posible	imposible	posible
Aplicación General	baja	moderada	baja	alta
Costo de la inmovilización	bajo	alto	moderado	bajo

* Parámetro dado en base a el sistema libre.

Entre las matrices más utilizadas tenemos la poliacrilamida, colágena, fibras de celulosa, agar, alginatos, poliestireno, etc. La inmovilización en geles de poliacrilamida ha sido muy utilizada pero las condiciones de polimerización son muy drásticas, lo cual causa desnaturalización parcial o total de la enzima.

Recientemente Chibata (1970), desarrolló un método para la inmovilización de células microbianas utilizando como soporte carragenina. Las características de las células inmovilizadas resultantes presentan buena actividad y estabilidad. Este método se ha utilizado en la inmovilización de células microbianas aplicadas en procesos industriales y resulta ser más ventajoso que el método de atrapamiento con poliacrilamida (Tabla 2).

En las tablas 3, 4 y 5, se presentan algunos microorganismos inmovilizados por las técnicas antes mencionadas.

1.3 Inmovilización de células microbianas en K-carragenina.

La carragenina es un polisacárido aislado de algas marinas rojas, no tóxico, utilizado ampliamente como aditivo en la industria alimentaria. Su fórmula química consiste en unidades D-galactosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1-3) y β -(1-4) en forma alternada (fig. 3) y se diferencian entre ellos por la cantidad de moléculas de los azúcares 3,5 anhídrido D-galactosa que

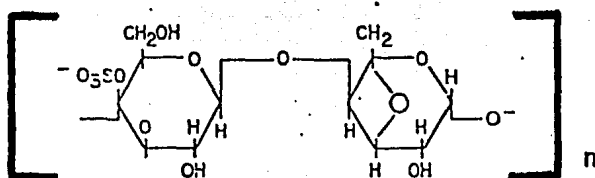


Figura 3. Estructura química de la carragenina.

Unidad estructural: β -D galactosulfato y
3,6 anhidro α -D galactosa

Peso molecular: 100,000 - 800,000

n : 200 - 250

Contenido de ester sulfato : 20-30% en peso

Contenido de 3,6 anhidro α -D galactosa: 34%
en peso.

Tabla 2. Actividad enzimática y estabilidad de células microbianas inmovilizadas en poliacrilamida y carragenina (Venkatasubramanian, 1979).

Enzima y Microorganismo	Actividad Enzimática u/g células o mg. proteína		Temperatura Óptima (°C)	Estabilidad operacional Tiempo de vida media (días)		
	Poliacrilamida	Carragenina		Sist.sol.	Poliacrilamida	Carragenina
<u>E. coli</u> (Aspartasa)	18,900 (73%)	49,400 (49%)	37	10	120	680*
<u>St. pheochromogenes</u> (glucosa isomerasa)	4,160 (37%)	4,310 (59%)	60	-	150	289*
<u>B. ammoniagenes</u> (Fumarasa)	5,800 (60%)	5,800 (60%)	37	6	53	75
<u>B. flavum</u> (Fumarasa)	6,680 (34%)	9,920 (51%)	37	-	72	70
Aminocilasa	10 (50%)	10* (50%)	37	-	30	60*
Aspartasa	190 (29%)	300 (40%)	37	-	20	-
Glucosa isomerasa	660 (12%)	4,640* (69%)	60	-	5	120*

*Curtidos con hexametilendiamina y Glutaraldehído.

contengan y por la posición en que los grupos sulfato se encuentran en la molécula de D-galactosa. Las fracciones de carragenina más importantes son κ , γ , ι y θ .

Los pesos moleculares de la carragenina varían de 500 000 en su forma nativa en la planta marina, a 100 000, que es la forma comercial más utilizada en alimentos. Al dispersarse en agua, la carragenina se hincha y se requiere de un calentamiento ligero para que se disuelva. La solución resultante tiene una baja viscosidad a temperaturas mayores de 60°C, pero al enfriarse forma geles, cuya calidad y rigidez dependen de la concentración del coloide y de la cantidad de iones K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , y Ba^{2+} que contengan. El mecanismo de gelificación no es totalmente conocido, sin embargo, se ha visto que las moléculas de carragenina tienen estructuras helicoidales a través de las cuales pueden reaccionar entre ellas formando una red tridimensional. A temperaturas mayores del punto de fusión del gel existe una agitación térmica que impide que se produzcan las hélices y por lo tanto el polímero existe en solución con una conformación al azar (fig. 4).

Posteriormente, cuando se enfría se produce una transición sol gel que induce la formación de una estructura tridimensional en la cual las dobles hélices son los puntos de unión de las cadenas de los polímeros; al seguir enfriando se

favorece la agregación de las moléculas, lo cual resulta en la formación final del gel.

La rapidez con la que éstas transiciones ocurren afectan la rigidez del gel.

Tabla 3. Células microbianas inmovilizadas por adsorción

SOPORTE	MICROORGANISMO	ENZIMA (Aplicación)
Resinas de intercambio aniónico	Actinomicetos	glucosa isomerasa
Dowex 1	<u>Azotobacter agile</u>	sistema multienzimático de glucosa a succinato.
DEAE-celulosa	<u>E. coli</u> <u>Achromobacter sp.</u>	penicilino amidasa (síntesis)
Celulosa de intercambio iónico	<u>B. megaterium</u> <u>Achromobacter sp.</u>	cefalosporino amidasa (síntesis).
Cloruro de polivinil (poroso)	<u>Apergillus oryzae</u> Levadura	Sistema multienzimático para la producción de cerveza.

Tabla 4. Células microbianas inmovilizadas por entrecruzamiento

AGENTE	MICROORGANISMO	ENZIMA (Aplicación)
Glutaraldehído	<u>Bacillus coagulans</u>	glucosa isomerasa
	<u>E. coli</u>	aspartasa NH ₄ -fumarato-L-aspartato.
	Hongos	removimiento de rafinosa

Chibata, 1978.

Tabla 5. Células microbianas inmovilizadas por atrapamiento

MATRIZ	MICROORGANISMO	ENZIMA (Aplicación)
Gel de poliacrilamida	<u>E. coli</u>	Aspartasa (NH_4 fumara sa \rightarrow L-aspartico). Penicilino amidasa Penicilina G 6-APA
	<u>Arthrobacter orydans</u>	Sistema multienzimáti co (1,3 propanediol \rightarrow ácido láctico)
	<u>Corynebacterium glutamicum</u>	Sistema multienzimáti co (Glucosa \rightarrow L gluco sa)
Agar	<u>Lactobacillus vulgaricus</u>	B-galactosidasa (hidró lisis de lactosa)
	<u>Saccharomyces pastorianus</u>	invertasa
Alginatos	<u>Candida tropica- lis</u>	Sistema multienzimáti co (fenol \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$)
	Levadura	Producción de cerveza
K carragenina	<u>Brevibacterium flavum</u>	Fumarasa (fumarato \rightarrow L- malato)
	<u>E. coli</u>	Aspartasa (NH_4 fumara to \rightarrow L-aspartico)
	<u>Streptomyces phaeochromogenes</u>	glucosa isomerasa
Triacetato de celulosa	<u>E. coli</u>	Penicilino amidasa penicilina G 6-APA
	<u>Saccharomyces lactis</u>	B-galactosidasa (hidrólisis de lactosa)
Colágena	<u>Corynebacterium glutamicum</u>	Sistema multienzimáti co (glucosa \rightarrow glutámico)
	<u>Streptomyces ve- nezuelae</u>	glucosa isomerasa
Gelatina y glutaral- dehído	Actinomycetes	glucosa isomerasa
Poliestireno	<u>Candida tropica- lis</u>	Sistema multienzimáti co (fenol \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$)

Chibata, 1978.

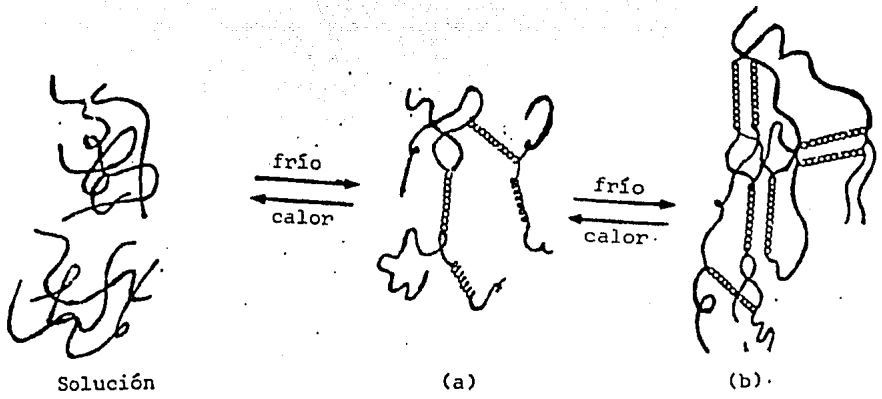


Fig. 4. Mecanismo de gelificación de la carragenina

La inmovilización de células microbianas utilizando como soporte carragenina se esquematiza en la fig. 5.

La suspensión celular y carragenina se disuelven en solución fisiológica a una temperatura entre 37 y 60°C, ambas se mezclan y la mezcla se enfría y/o se pone en contacto con una solución que contiene cualquiera de los iones inductores de la gelificación.

Después de este tratamiento, el gel es dividido en pequeñas partículas. Esta preparación tiene características mecánicas poco satisfactorias, por lo que el biocatalizador es tratado con agentes curtientes, tales como glutaraldehído y hexametildiamina, con el fin de obtener una preparación más resistente.

La razón de la alta estabilidad de las preparaciones que utilizan carragenina como soporte no es clara, sin embargo, en algunas evidencias experimentales se ha encontrado que la carragenina en "estado líquido" no muestra efecto alguno de estabilización de la actividad enzimática. Esto sugiere que la matriz "gel carragenina" juega un papel muy importante para esta estabilización.

A continuación se resumen las características y ventajas del método de inmovilización utilizando como soporte K-carragenina.

1. este método de inmovilización es aplicable a muchos tipos de células microbianas y enzimas,
2. los rendimientos de actividad en la inmovilización de células microbianas y enzimas es alta.
3. el tamaño de partícula del biocatalizador obtenido puede manejarse de acuerdo a los propósitos de aplicación, y
4. la estabilidad operacional de células microbianas y enzimas es alta, especialmente cuando se trata con el agente curtiende apropiado.

1.4 Propiedades de células y enzimas inmovilizadas

Las propiedades de células y enzimas inmovilizadas en comparación con un sistema soluble son diferentes (Tabla 6), esto se debe a los cambios que sufren las enzimas durante el proceso de inmovilización, que se pueden atribuir a los siguientes factores:

1. alteraciones del sistema enzimático dado por las características químicas y físicas del soporte utilizado, así como del método de inmovilización.

2. efectos difusionales

- a. células o enzimas unidas a la superficie de un soporte.

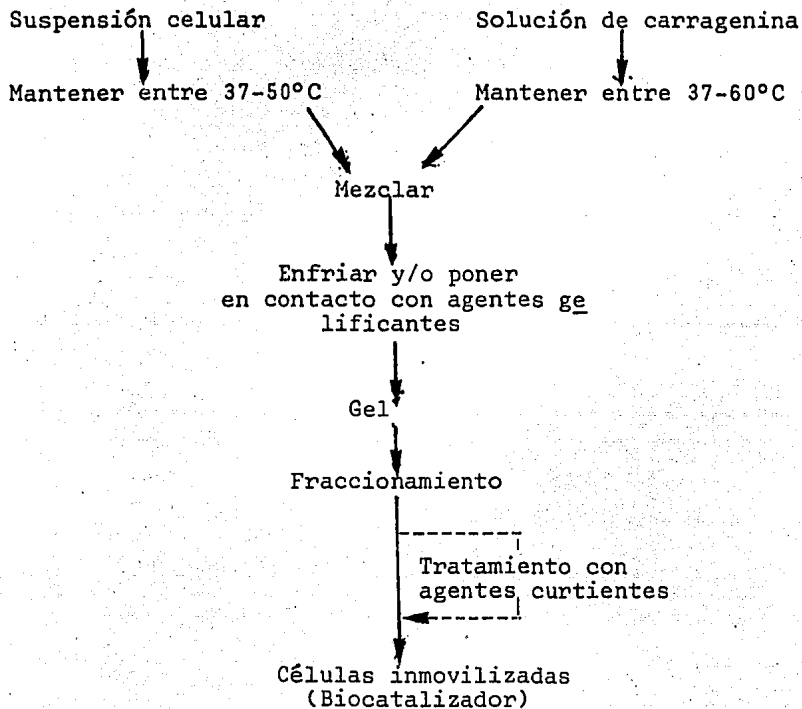


Fig. 5. Esquema de la inmovilización de células microbianas utilizando como soporte carragenina (Linko y Linkarn, 1979).

- resistencia interna a la transferencia de masa
- resistencia externa a la transferencia de masa
- efecto de partición del sustrato

Los cambios que frecuentemente presentan los sistemas inmovilizados son: incremento de su estabilidad térmica, incremento de su estabilidad operacional, incremento de su estabilidad al almacenamiento, disminución de su actividad específica, modificación de su temperatura y pH óptimos y modificación de sus constantes cinéticas.

Durante el proceso de inmovilización adecuado, se logra cierta estabilización de la estructura tridimensional de las enzimas, además el soporte en sí confiere a la enzima cierta protección a factores ambientales, logrando así mayor estabilidad térmica, operacional y de almacenamiento con respecto al sistema libre.

Los perfiles de temperatura y pH, así como la temperatura y pH óptimos pueden o no variar dependiendo del nuevo microambiente formado en las inmediaciones de la enzima. Estos cambios dependen básicamente del tipo de soporte y del método de inmovilización empleados.

La modificación de los parámetros cinéticos de sistemas inmovilizados, se puede atribuir a los siguientes factores (Goldstein,

1976):

- a. cambios conformacionales de la enzima
- b. efectos estéricos
- c. efecto del microambiente
- e. resistencia externa a la transferencia de masa, y
- f. resistencia interna a la transferencia de masa

En el caso particular de células inmovilizadas en el seno de una matriz, las enzimas de las células inmovilizadas no interaccionan directamente con el soporte, por lo que los efectos conformacionales y estéricos son poco probables. Sin embargo, las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de las células con el soporte causan lo que se denomina efecto de partición del sustrato, el cual consiste en lo siguiente: cuando una enzima es atrapada en una matriz, se separan dos fases, la fase líquida y la fase de la matriz, en ausencia de reacción química un soluto puede mostrar afinidad preferencial por alguna de las dos fases.

Los efectos difusionales son los modificadores más importantes de la cinética de las enzimas inmovilizadas. Las restricciones difusionales internas pueden ser detectadas por un decremento en la energía de activación aparente, y será mayor la influencia para células inmovilizadas, ya que el tamaño de partícula de las preparaciones de células inmovilizadas es usualmente mucho más grande que las correspondientes a enzimas --

inmovilizadas.

Las restricciones difusionales internas pueden reducirse por el uso de un tamaño adecuado de partícula con una elevada área superficial por volumen de biocatalizador, mientras que las restricciones difusionales externas pueden minimizarse por incremento de la velocidad de agitación en un reactor - agitado o por incremento en la velocidad de flujo en un reactor de columna.

La cinética de células inmovilizadas es más compleja que la correspondiente a enzimas inmovilizadas, por dos factores adicionales, éstos son, la posibilidad de un limitado incremento de células por división celular y la presencia de una barrera difusional adicional creada por una membrana celular y una membrana citoplásmica osmóticamente intactas.

Así los parámetros cinéticos efectivos de la actividad enzimática de células inmovilizadas llamadas $V'máx.$ y $K'm$, son raramente cercanos a los parámetros cinéticos de enzimas inmovilizadas; consecuentemente la ecuación de Michaelis-Menten se modifica a:

$$V = \eta \frac{(V'máx.S)}{(K'm + S)}$$

donde:

V = velocidad de reacción

S = concentración de sustrato

V'_{\max} = velocidad máxima de reacción

K'_m = constante de Michaelis Menten

n = factor de efectividad

Tabla 6. Comparación entre las propiedades de células libres e inmovilizadas para diferentes procesos.

Enzima	Aspartasa	Fumarasa	L-Arginina deiminasa	L-histidina amonia-liasa	Penicilino amidasa
Microorganismo	<u>E. coli</u>	<u>Brevibacterium ammoniagenes</u>	<u>Pseudomona putida</u>	<u>Achromobacter liquidum</u>	<u>E. coli</u>
<u>pH Óptimo</u>					
Intactas	10.5	7.5	5.5-6.0 ^a	9 ^b	8.5
Inmovilizadas	8.5	7.0	5.5-6.0 ^a	9 ^b	8.5
<u>Temp. Óptima (°C)</u>					
Intactas	50	60°C	37	60 ^b	40
Inmovilizadas	50	60	55	60 ^b	40
<u>Estabilidad térmica</u>					
% de actividad remanente relativa					
Condiciones	50°C, 30 min	55°C, 60 min	60°C, 60 min	-	60°C, 30 min.
Intactas	49	63	42	-	10
Inmovilizadas	58	65	63	-	25
<u>Estabilidad operacional</u>					
Tiempo de vida ^a	120	52.5	140	180	17 42
media (días)	(37°C)	(37°C)	(37°C)	(37°C)	(40°C)(30°C)
<u>Sustrato</u>	Fumarato de amonio	Fumarato de sodio	L-arginina	L-histidina	Penicilina G
<u>Producto</u>	Acido L-aspártico	Acido-L-málico	L-citrulina	ac-uroconico	6-APA
<u>Referencias</u>	Chibata, 1974	Yamamoto, 1976	Yamamoto, 1974a	Yamamoto, 1974b	Sato, 1976.

^a En presencia de 0.05% de bromuro de cetiltrimetilamonio

^b En presencia de 0.05% de bromuro de cetiltrimetilamonio

^c dato para la enzima intacta

^d dato para la enzima inmovilizada

2. ANTECEDENTES.

2.1 Clasificación y biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

El grupo de los antibióticos β -lactámicos está comprendido por las cefalosporinas y penicilinas, sus estructuras son semejantes, difieren en que las primeras contienen un anillo β -lactama dihidrotiazina hexagonal en lugar del anillo β -lactama tiazolidina pentagonal de las últimas (Fig. 6). Su biosíntesis se encuentra a cargo de un reducido grupo de microorganismos, todos ellos filamentosos pero no relacionados taxonómicamente, algunos son hongos (eucariotes) y otras bacterias (procarionotes) (Flynn, 1972).

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

Los antibióticos sintetizados por la especie *Penicillium* se caracterizan por tener una cadena lateral N-acil variable, que incluye al ácido D- α -aminoadípico o algún otro derivado ácido carboxílico. La síntesis de penicilinas específicas se lleva a cabo por la adición de una cadena lateral precursora al medio de cultivo, tal es el caso de la penicilina G al adicionar ácido fenilacético como precursor. Durante la fermentación de esta especie de microorganismos se acumula 6-APA, especialmente

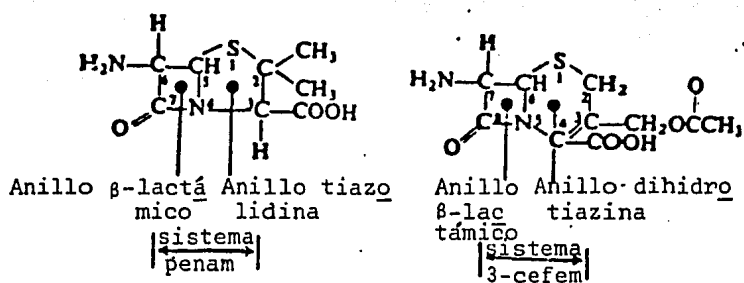


Figura 6. Estructura básica de penicilinas y cefalosporinas.

en ausencia de precursores. Cabe mencionar aquí que la especie *Penicillium* no sintetiza compuestos cefalosporánicos.

La especie *Cephalosporium* sintetiza únicamente antibióticos con cadena lateral D- α -aminoadipil, esta fermentación es insensitiva a la adición de cadenas laterales precursoras y todas las cefalosporinas conocidas son sintetizadas por las especies *Cephalosporium* y *Streptomyces*. El 7-ACA no se forma durante la fermentación.

Se han aislado tres cefalosporinas importantes, esto es la P, N y la C del hongo *Cephalosporium acremonium* aislado en 1945 por Giuseppe Brotzu, de ellas la más importante es la cefalosporina C, la cual posee una cadena lateral derivada del ácido D- α -adípico, presenta moderada actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas, pero dicha actividad no es suficiente para utilizarle como agente terapéutico.

En la tabla 7 se presentan las principales cefalosporinas producidas por fermentación, así como el microorganismo productor.

2.2 Cefalosporinas semisintéticas.

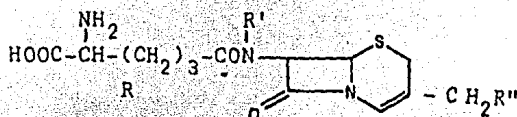
Desde la introducción de la cefalotina (Tabla 8) en 1964, las cefalosporinas semisintéticas han adquirido importancia como agentes terapéuticos en el tratamiento de infecciones causadas por

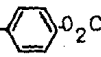
microorganismos gram positivos y gram negativos. El núcleo estructural de estos compuestos son el 7-ACA y 7-ADCA. El primero se obtiene por hidrólisis química o enzimática de la cefalosporina C, mientras que el segundo se produce a partir de 7-ACA removiendo el grupo acetoxi, o bien por hidrólisis química o enzimática de bencilcefalosporina (Fig. 7).

La ventaja que existe al partir de 7-ADCA en la producción de cefalosporinas semisintéticas, es que el grupo acetoxilo que contiene el 7-ACA, hace inestable a la sustancia en el tubo digestivo, lo que requiere vía parentenal. Al reemplazar este grupo acetoxilo por otro grupo, las cefalosporinas son estables en el tracto digestivo y pueden administrarse por vía oral (Litter, 1979). Por otro lado, el grupo acetoxi no es determinante en la actividad antibacteriana de estos compuestos, ésta actividad depende principalmente del sistema anular dihidrotiazina β -lactámico y de los sustituyentes R y R' (Tabla 8).

El hecho de partir de 7-ADCA para la producción de cefalosporinas semisintéticas presenta además de las ventajas antes mencionadas, las siguientes: el 7-ADCA se puede obtener por método enzimático a partir de bencilcefalosporinas o fenoxicefalosporinas, las cuales son deaciladas por amidasas que hidrolizan penicilinas, por otro lado, la obtención de bencil o - - fenoxicefalosporinas se realiza a partir de bencil o fenoxi--

Tabla 7. Cefalosporinas producidas por fermentación (Hamill, 1978).



Nombre	Organismo productor	Estructura
Cefalosporina C.	<u>Cephalosporium acremonium</u>	R = R' = -H R'' = OCOCH ₃
Deacetoxicefalosporina C	muchas cepas de hongos entre ellas <u>Streptomyces sp</u>	R = R' = -H R'' = -H
Deacetylcefalosporina C	<u>Cephalosporium sp</u>	R = R' = -H R'' = -OH
7-Metoxicefalosporina C (A 16884)	<u>Streptomyces lipmanii</u>	R = R' = -OCH ₃ R'' = -OCOCH ₃
7-Metoxi-3-deacetyl-3-O-carbamoilcefalosporina C (A 16886B, cefamicin C)	<u>Streptomyces clavuligerus</u> <u>Streptomyces lactamdurans</u>	R = R' = -OCH ₃ R'' = -OCONH ₂
Cefamicin A	<u>Streptomyces griseus</u>	R = R' = OCH ₃ R'' = OCOCH=CH-  -O ₂ C OCH ₃

Continúa...

Continuación Tabla 7 ...

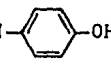
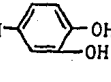
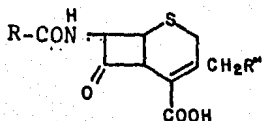
Nombre	Organismo productor	Estructura
Cefamicin B	<u>Streptomyces griseus</u>	$R = -H$ $R' = OCH_3$ $R'' = OCOC=CH$ 
C2081X	<u>Streptomyces heterorhous</u> <u>Streptomyces panayensis</u>	$R = -H$ $R' = OCH_3$ $R'' = OCOC=CH$ 
N-acetildeacetoxi- cefalosporina C	<u>Cephalosporium acremonium</u>	$R = -COCH_3$ $R' = -H$ $R'' = -H$
3-Deacetoxi-3-tio- metilcefalosporina C	<u>Cephalosporium acremonium</u>	$R = -H$ $R' = -H$ $R'' = -S-CH_3$
3-deacetil-3-0-carbamoil- cefalosporina C (A16886A)	<u>Streptomyces clavuligerus</u>	$R = -H$ $R' = -H$ $R'' = -COHN_2$
7-metoxideacetilcefalosporina C	<u>Streptomyces chartreusis</u> SF 1623	$R = -H$ $R' = -OCH_3$ $R'' = -OH$
7-metoxideacetoxicefalosporina C (WS-3442-D)	<u>Streptomyces Wadayamensis</u>	$R = -H$ $R' = -OCH_3$ $R'' = -H$

Tabla 8. Principales cefalosporinas semisintéticas (Hamill, 1978)



Nombre Genético	Estructura	
	R	R''
Cefalotin		-OCOCH ₃
Cefaloxidina		
Cefaloglicina		OCOCH ₃
Cefalexin		-H
Cefazolin		
Cefradina		-H
Cefapirin		-O-COCH ₃

penicilinas, compuestos producidos por fermentación con buenos rendimientos, y por ello son disponibles. Este no es el caso de cefalosporina C porque los rendimientos durante su producción son bajos, además de que no existe una amidasa que realice su hidrólisis satisfactoriamente.

En la tabla 8 se enlistan las principales cefalosporinas semisintéticas.

2.2.1 Producción de cefalosporinas semisintéticas.

Los datos de producción y consumo de cefalosporinas semisintéticas son muy escasos, en el Chemical Economics Handbook (edición actualizada a octubre de 1984), la producción de cefalosporinas se menciona en la categoría "otros" dentro del rubro antibióticos:

Producción	Miles de toneladas métricas	Ventas	Valores de ventas	Valores de ventas
			(millones de dólares)	dólares/kg.
4.4		2.4	270.1	110.91

Datos para el año de 1980.

En esta categoría se incluyen además de cefalosporinas, antifúngicas, antituberculosis, bacitrina y cloranfenicol.

En el país no se produce cefalosporina C, así que una parte de cefalosporinas semisintéticas se produce con 7-ACA y 7-ADCA importados y otra a partir de 7-ADCA producido en el país por

hidrólisis química de bencilcefalosporina (sintetizada a partir de penicilina G) (datos proporcionados por la empresa Fermentaciones y Síntesis, S.A.).

2.3 Penicilino amidasa.

2.3.1. Clasificación y microorganismos productores.

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

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

- I. fenoximetilpenicilina (penicilina V) amidasas,
- II. bencilpenicilina (penicilino G) amidasas y
- III. D- α -aminobencilpenicilina (ampicilino) amidasas.

La enzima del tipo I hidroliza penicilina V a una mayor velocidad que a la penicilina G y ampicilina, la del tipo II es más a fin a la penicilina G y la del tipo III a la ampicilina. Las penicilino V amidasas son producidas principalmente por hongos, las penicilino G amidasas por bacterias y las ampicilino amidasas por algunas especies de Pseudomonas.

En la tabla 9 se presentan los principales organismos

Tabla 9. Microorganismos que producen penicilino amidasa
(Vandamme, 1980).

Bencil penicilino amidasa

Bacterias

Rhodopseudomonas spheroides K.Y. 4112
Pseudomonas aeruginosa K.Y. 3591 K.Y. 8501
Pseudomonas cruciviae K.Y. 3960
Pseudomonas sp.
Xanthomonas sp.
Alcaligenes faecalis A-9424
Alcaligenes faecalis B.R.L. 1237, 1238
Bacterium faecalis alcaligenes 415
Escherichia coli sp.
Escherichia coli N y I/3-67
Escherichia coli N.C.I.B. 9465
Escherichia coli ATCC 9637 (N.C.I.B.8666)
Escherichia coli ATCC 11105 (N.C.I.B. 8878)
Kluyvera citrophila K.Y. 3461, P.L.-10, P.L.21
Aerobacter cloacae
Erwinia sp.
Serratia sp.

Hongos

Neurospora F.S.C. 987, D.G.C. 757
R.F. 424 R.W.B. 622 F.G.S.C. 262, 3a6A

fenoximetil penicilino amidasa

Hongos

Penicillium chrysogenum Q 176
Penicillium chrysogenum A-9342
Penicillium chrysogenum S.C-6481
Emencellopsis minima (Stolk) I.M.I.-69015
Cephalosporium C.M.I. 49137
Cephalosporium acremonium A.T.C.C. 11550
Aspergillus niger
Aspergillus ochraceus B.R.L. 731
Epidermophyton interdigitale, Edermophyton
floccosum B.R.L. 623 B.R.L. 722
Trichoderma spp.
Batrytis cinerea
Fusarium aucnaceum

Levaduras

Torulopsis, Zygasacharomyces, Debaryomyces
Anatorula spp B.R.L. 809.
Cryptococcus Saccharomyces
Trichosporon spp.

Bacterias

Erwinia aroideae N.R.R.L. B-138
Acromobacter sp. B.R.L. 1755
Micrococcus ureae

D- α aminobencilpenicilino amidasa

Pseudomonas melanogenum K.Y. 3987

K.Y. 4030, K.Y. 4031

Pseudomonas ovalis K.Y. 3962

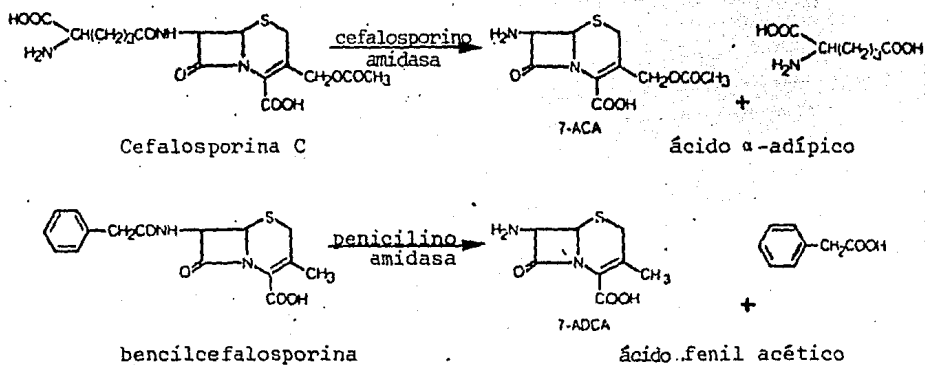


Figura 7. Producción de intermediarios de cefalosporinas.

productores de la enzima.

La enzima utilizada en este trabajo pertenece al tipo II, específicamente de E. coli ATCC 9637. Por este motivo nos concretaremos a hablar de las características y propiedades de esta enzima en particular.

2.3.2. Características y propiedades de penicilino amidasa de E. coli.

La enzima cataliza la reacción de hidrólisis de bencilpenicilina y bencilcefalosporina, obteniéndose como productos de reacción 6-APA y 7-ADCA además el ácido fenilacético (Fig. 8).

La enzima proveniente de E. coli es intracelular, se encuentra localizada en el espacio periplásmico, tiene un peso molecular de $71\ 000 \pm 2\ 000$ determinado por sedimentación y de $70\ 000 \pm 5\ 000$ por filtración en gel, y su punto isoeléctrico determinado por electrodifusión es 6.8 ± 0.2 (Kutzbach, 1974).

La temperatura y pH óptimos para la hidrólisis de bencilpenicilina se encuentra entre 50 y 55°C, pH 8 ± 0.2 (Balasingham y Waburton, 1972). Debido a la inestabilidad de la enzima a su valor óptimo de temperatura y pH ésta se maneja a temperaturas de 32 a 40°C y pH 7.5 a 8, el valor de Km para la enzima pura fue 0.02 mM, comparada con 30 mM para células intactas (Cole, 1969). (Tabla 10).

La enzima es inhibida por penicilina G y sus productos de

Tabla 10. Datos de Km de penicilino amidasa de E. coli utilizando penicilina G como sustrato.

Microorganismo	T(°C)	pH	Km(sist.sol.) M	Km(sist.inmov.) M		Referencia
<u>E. coli</u> ATCC 9637	-	-	7.7×10^{-3}	3×10^{-3}	enzima	Ryu D., 1972
<u>E. coli</u> NCIB8743A	-	-	-	3×10^{-3}	células in	"
<u>E. coli</u>	-	-	1.5×10^{-3}	-	tactas	"
<u>E. coli</u> ATCC 11105	25	8.1	2×10^{-5}	-	enzima	Kutzbach, 1974
<u>E. coli</u> NCIB8743A	37	8	5×10^{-4}	6.3×10^{-3}	enzima	Klein, 1980
<u>E. coli</u> NCIB8743A	50	8.2	3×10^{-2}	-	células in	Cole, 1969
<u>E. coli</u> ATCC 11105	37	7.8	2×10^{-3}	-	tactas	Klein, 1980
<u>E. coli</u> NCIB8743A	37	7.0	7.7×10^{-4}	-	células in	Warburton, 1972
"	37	7.5	7.4×10^{-4}	-	enzima	"
"	37	8	6.7×10^{-4}	-	enzima	"
"	37	8.5	8×10^{-4}	-	enzima	"
"	27	8	7.7×10^{-4}	-	enzima	"
<u>E. coli</u> sp.	30-35	8	$1.35-1.59 \times 10^{-3}$	-	célula in	Vandamme, 1980
"	37	7	7.7×10^{-3}	-	tacta	"
"	37	7	7.7×10^{-3}	-	célula in	"
<u>E. coli</u> ATCC 9637	37	7.5	1.5×10^{-3}	7.7×10^{-3}	tacta	"
<u>E. coli</u> NCIB8743A	37	8.2	6.7×10^{-4}	-	enzima	"
"	-	7.65	-	6.3×10^{-4}	enzima	"
<u>E. coli</u> 11105	-	8.1	-	2×10^{-5}	enzima	"
<u>E. coli</u> C-15 (NCIB 9465)	-	5.5	4×10^{-3}	-	enzima	"
"	-	5.5	4×10^{-3}	-	célula in	"
<u>E. coli</u> NCIB 8743A	37	8	6.7×10^{-4}	6.3×10^{-4}	tacta	"
<u>E. coli</u> ATCC 9637	40	8	1.4×10^{-4}	-	enzima	"
"	40	8	1.4×10^{-4}	-	células in	Sandoval, 1980
"	40	8	1.4×10^{-4}	-	tactas	"
<u>E. coli</u> sp.	-	7.5	17.5×10^{-3}	-	células in	Vandamme, 1980
"	-	7.5	17.5×10^{-3}	-	tactas	"

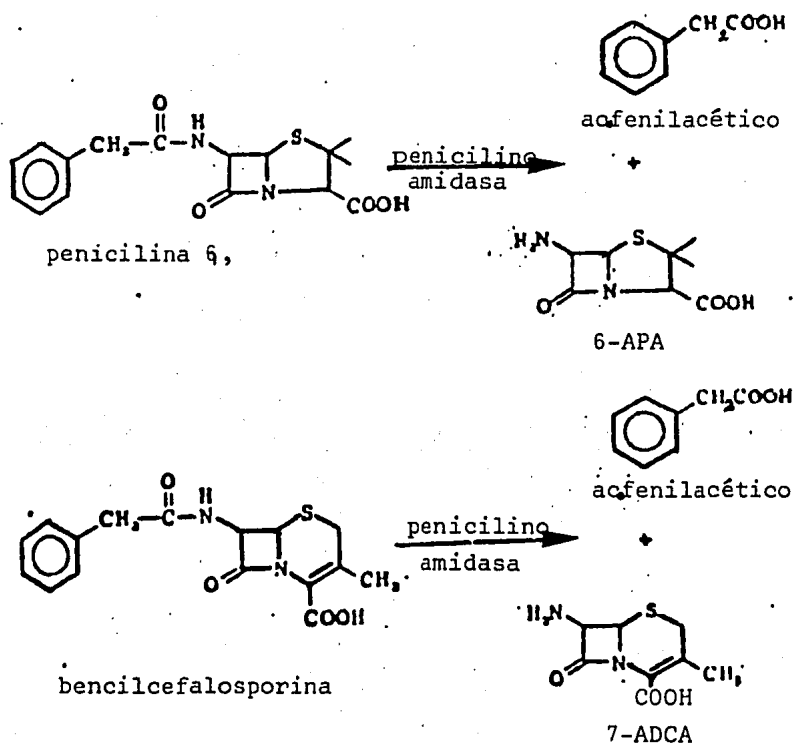


Figura 8. Reacciones que cataliza la penicilino amidasa.

reacción. La penicilina G causa inhibición competitiva, el 6-APA inhibición no competitiva y el ácido fenilacético inhibición competitiva (Balasingham y Waburton, 1972).

La energía de activación del rompimiento hidrolítico de la bencilpenicilina es de 11.4 kcal/mol a pH 7.5 (Savitskaya, Mys, 1975).

2.3.3. Perfil de sustrato.

El sustrato que la enzima hidroliza preferencialmente es la penicilina G, sin embargo, se reporta que existen otros sustratos (Tabla 11). El tamaño y la naturaleza química de la cadena lateral es muy importante, siendo óptimo la cadena fenilacetil, tolera sustituyentes tales como grupos amino a hidroxil, pero no carboxi (Savidge y Cole, 1975). De esto depende la afinidad que esta enzima presente por un sustrato.

Dado que la estructura de las cefalosporinas es muy semejante a la de las penicilinas, las penicilino amidasas de E. coli utilizan como sustrato algunas cefalosporinas, en especial aquellas que contienen una cadena lateral fenilacetil parecida a la de la penicilina G. Esto es muy importante ya que la cefalosporina C, única cefalosporina que se produce por fermentación, con resultados satisfactorios, no es sustrato de la penicilino amidasa y no se ha encontrado la amidasa que pueda ser económicamente importante para esta transformación (De Main 1963, Hamilton Miller, 1970).

Tabla 11. Perfil de sustrato para la penicilino amidasa de E. coli (Casas, 1981).

SUSTRATOS	VELOCIDAD RELATIVA DE HIDROLISIS.
<u>Penicilinas:</u>	100
(Bencil-)	
p-hidroxilbencil	150
DL- α -hidroxilbencil	88
D- α -aminobencil	50
α -carboxilbencil	5
2-furilmetil	91
2-tienilmetil	80
fenoximetil	5.5
α -fenoxietil	5
n-propoximetil	40
Isobutoximetil	29
n-heptil	5
fenil	5
2,5-dimetoxifenil	5
<u>Cefalosporinas:</u>	
Cefalotina	120
Cefaloridina	104
cefaloglicina	48
<u>Otros sustratos:</u>	
Fenilacetamida	140
n-fenilacetilglicina	182
n-fenilacetil-DL-leucina	73
ácido n-fenilacetil-D- α -aminofenilacético	0
ácido n-fenilacetil 1- α -aminofenilacético	139
ácido bencilpenicilíico	22

La penicilino amidasa de E. coli también cataliza la reacción de síntesis de penicilinas y cefalosporinas, tales como la ampicilina y cefalexina (López, . 1982; Choi, 1981).

2.4 Sistemas inmovilizados.

2.4.1. Métodos que se han empleado para la inmovilización de penicilino amidasas.

Existen muchos reportes sobre inmovilización de bencilpenicilino amidasa, los más utilizados se pueden agrupar en 4 categorías: adsorción, adsorción y entrecruzamiento, enlace covalente y atrapamiento físico. La primera aplicación de la tecnología de enzimas inmovilizadas llevada a nivel industrial fue la deacilación de la penicilina G para la producción de 6-APA. En la tabla 12 se muestran ejemplos de los métodos de inmovilización de la penicilino amidasa utilizada en la producción de 6-APA, y en la tabla 13 los métodos de inmovilización específicos, así como la compañía que los desarrolló.

2.4.2 Sistemas de penicilino amidasa inmovilizados en la conversión de cefalosporinas.

La mayoría de reportes de la enzima penicilino amidasa, están dirigidos a la producción de 6-APA por hidrólisis de penicilina G o penicilina V principalmente, y mencionan que dicha enzima puede catalizar la hidrólisis de algunas cefalosporinas. Se han

Tabla 12. Ejemplos de métodos de inmovilización de penicilino amidasas y uso para producción de 6-APA. (Savidge, 1984)

Técnica de Inmovilización	Método de inmovilización
Adsorción	En bentonita y tierra de diatomeas a pH 6.2 - 6.3 por 1 hr.
Adsorción de enzima modificada	Enzima modificada para la adsorción en soportes básicos (DEAE-sephadex) con anhídrido succínico.
Adsorción y entrecruzamiento	Adsorción a resinas de polimetacrilato (Amberlita XAD7) a pH 5 y entrecruzamiento con glutaraldehído.
Enlace covalente	<p>1.- Copulación a sephadex G200 activada con bromuro de cianógeno.</p> <p>2.- Copulación vía grupos anhídrido a copolímeros de acrilamida, anhídrido maleico y N.N'-metileno bis-acrilamida.</p>
Atrapamiento físico	Atrapamiento en triacetato de celulosa
Enlace covalente	<p>1. Copulación a un copolímero sacarosa/epiclorhidrina activado con bromuro de cianógeno, para formar una enzima inmovilizada soluble en agua.</p> <p>2. Copulación vía grupos anhídrido a copolímeros etileno/anhídrido maleico, modificados a la forma de una enzima hidrofóbica -polímero conjugado por reacción con n-octadecilamida.</p>

Tabla 13. Deacilación de penicilinas por penicilino amidasas inmovilizadas.
(Savidge, 1984)

Fuente enzimática	Método de Inmovilización	Comentarios	Compañía
<u>Escherichia coli</u>	Atrapada en triacetato de celulosa	después de 30 ciclos se retiene el 79% de su actividad inicial	SNAM Progeti
<u>E. coli</u>	Enlazada a bromoacetilcelulosa, ácido carboximetilcelulosa, CM sephadex, resinas de intercambio catiónico.	La enzima bromoacetilcelulosa se reutilizó 4 veces	Beecham
<u>E. coli</u>	Copulada a resinas de poli metacrilato (XAD-7) con glutaraldehído y hexametilendiamina	El complejo enzimático fue reutilizado 15 veces	Beecham
<u>E. coli</u>	Copulada a un copolímero sacarosa/epiclorohidrina (P.M. 400 000) y contenido en una división de ultrafiltración	La enzima se unió a un polímero soluble en agua para incrementar su peso molecular y minimizar pérdidas en la ultra centrifugación	Beecham
<u>B. megaterium</u>	Adsorción a bentonita y tierras diatomeas y contenida en una división de ultrafiltración	Proceso empleado para la producción comercial de 6-APA	Squibb

Continúa...

Continúa Tabla 13

<u>B. circulans</u>	Enzima acilataada con anhidro succínico y copulada a DEAE-Sephadex	Utilizando un reactor de columna se obtuvo 6-APA con 93% de conversión	Otsuka Lakemedel
<u>E. coli</u>	Copulada a un derivado de cloro-S-triazina de DEAE-celulosa o papel filtro de celulosa	Después de 11 semanas de reutilización la actividad enzimática no se perdió	University College London
<u>E. coli</u>	Copulada sepharosa activada con bromuro de cianogeno	Proceso empleado para la producción de comercial de 6-APA	Astra Lakemedel
<u>E. coli</u>	Copulada a un copolímero de acrilamida, N,N'-metilen bis(acrilamida) y anhídrido maleico	--	Bayer
--	Copulado a dextrana activada con bromuro de cianógeno	--	Bayer
<u>Fusarium moniliforme</u>	Esporas de el microorganismo	Las esporas fueron reutilizadas 3 veces para hidrolizar fenoximelilpenicilina	Laboratorios Ayerst
<u>E. coli</u>	Células atrapadas en gel de poliacrilamida	En un reactor columna se hidrolizó 85% de una solución al 1% de penicilina G	Tanable Seiyaku
--	Atrapamiento en gel de poliacrilamida	--	Tallin Poly tech. Inst., USSR

identificado algunas cefalosporina C acilasas de especies de *Brevibacterium*, *Achromobacter* y *Flavobacterium* (Walton, 1964); sin embargo, dichos reportes no han sido confirmados. A escala industrial esta reacción se lleva a cabo con alta eficiencia, utilizando, por ejemplo, cloruro de nitrosilo como agente hidrolizante. Ciertas cefalosporinas semisintéticas son hidrolizadas por penicilino G amidasas bacterianas, pero las velocidades de reacción son menores a las de las penicilinas correspondientes (Huang 1963, Söberget 1967, Cole 1969(a), Nara 1971(b), Shimigu, 1975).

En la tabla 14 se mencionan fuentes enzimáticas y sustratos cefalosporánicos más importantes.

Está reportada una ruta enzimática complicada para la producción de 7-ACA formando derivados cetoadipil y glutaril a partir de cefalosporina C (utilizando una D-amino ácido oxidasa), estos derivados posteriormente se hidrolizan a 7-ACA (Banyu, 1977). Sin embargo, se tienen reportes de una cepa (*Pseudomona putida*) que lleva a cabo la hidrólisis de la cefalosporina C (Meiji Seika Co. Ltd., 1978). Las células producto de una fermentación se lavan y se resuspenden en amortiguador de fosfatos pH 7 y se agrega la cefalosporina C (0.5%), la reacción se continúa por 7 horas a 37°C, después del cual 37% de cefalosporina C es convertida a 7-ACA. Otro reporte (Shibuya, 1981) donde se estudia la separación y propiedades de la acilasa de *P. putida* indican que la cefalosporina C no es sustrato y que la reacción es de dos pasos:

Tabla 14. Hidrólisis de algunas cefalosporinas semisintéticas por penicilino G amidasas. (Vandamme, 1980).

Microorganismo	Sustrato	Producto
<u>Escherichia coli</u> (B.R.L. 35)	Bencil cefalosporina	7-ADCA
<u>Escherichia coli</u> N.C.I.B. 8743A	Cefalotin	7-ACA
<u>Escherichia coli</u> B.R.L. 35 1	Cefaglicina	7-ACA
<u>Nocardia sp.</u> F.D. 4697	Fenoriacétil -7ACA	7-ACA
<u>Proteus reHgeri</u> F.D. 13424	Fenilmercapto-7ACA	
<u>Kluyvera citrophila</u> K.Y. 3641, K.Y. 7844,	Cefalotin	7-ACA
<u>Kluyvera noncitrophila</u> K.Y. 3642		
<u>Micrococcus luteus</u> K.Y. 3781		
<u>Achromobacter sp.</u> K.Y. 3048		
<u>Flavo bacterium sp.</u> K.Y. 4082		

uno que involucra la conversión de cefalosporina C a glutaril-7-ACA por una o-amino oxidasa, para posteriormente realizar la hidrólisis a 7-ACA por la acilasa.

Es claro que no se ha encontrado una enzima comercialmente importante que hidrolice a la cefalosporina C, la cual es la cefalosporina natural que se obtiene con mejores rendimientos por fermentación. Dicha fermentación no se encuentran tan bien establecida como es el caso para la producción de penicilina G. Estos factores han dado lugar a pensar en obtener cefalosporinas a partir de penicilinas naturales.

Las cefalosporinas pueden producirse químicamente a partir de penicilinas por extensión de su anillo de 5 miembros tiazolidina a un anillo de 6 miembros dihidrazina de las cefalosporinas (Cooper y Spry, 1973) (Fig. 9), resultando una cefalosporina con una cadena lateral de la penicilina de la cual se -- haya partido, y esta cadena lateral puede removerse enzimáticamente para producir 7-ADCA como se muestra en la fig. 8. Estas reacciones son catalizadas por algunas bencilpenicilino o fenoxipenicilinoamidasa, y parece prometedor que algunos de los procesos descritos para la producción de 6-APA pueden utilizarse para esta reacción. En un proceso (Bayer A.G., 1975, 1977), la bencilpenicilino amidasa inmovilizada por enlace covalente a dextrana activada con bromuro de cianógeno fue utilizada para deacilar 7-fenil-acetil-7-ADCA (6%) a 37°C y

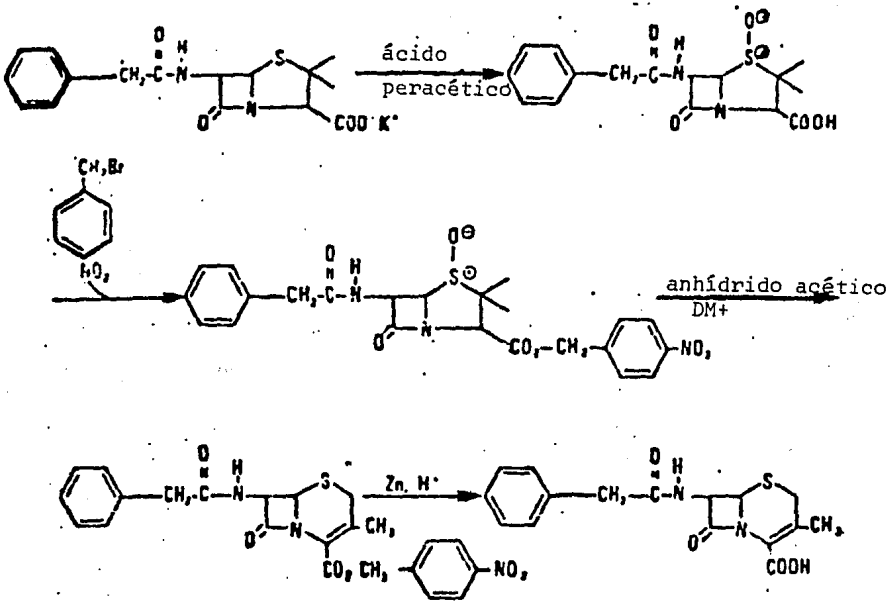


Figura 9. Obtención de bencilcefalosporina a partir de penicilina G por síntesis química.

pH 7.8 (controlado con amonio). La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de intercambio iónico (Iewatit MP 500 A en forma de cloruro), el eluido se ajustó a pH 3.7, el producto precipitado se filtra y se lava sucesivamente con agua y acetona y entonces se seca obteniendo 94% de rendimiento de 7-ADCA.

En un proceso similar, desarrollado por Fujii (1976) con enzima de B. megaterium la enzima extracelular se absorbió en celita, la preparación se empaçó en una columna de 10 litros para la producción continua de 7-ADCA, por el paso de sustrato (0.5% a 37°C) a velocidad de 5 l/hr por 4 días. El 7-ADCA se recuperó con un 90% de pureza (por adición de acetona y ajuste del pH a 4) con un rendimiento del 85%.

Una fenoximetilpenicilino acilasa aislada de E. aroideal ATCC 25206 se utilizó para deacilar 7-fenoxiacetil-7-ADCA (Fleming, 1977). La enzima es intracelular y se produce por fermentación aeróbica, las células cosechadas se ponen al 10% en amortiguador de imidazol con sulfato de amonio ferroso y β -mercapto etanol, éstas se rompen en un homogeneizador Malton Gaulin y entonces la enzima se purifica por precipitación fraccionada con isopropanol. La enzima se inmovilizó en fibras de triacetato de celulosa, dichas fibras se empacaron en una columna a la cual se le hizo pasar la solución de sustrato -- (16.7 mg/ml de ácido 7-fenoxiacetamidodesacetoxicefalosporánico), después de 3 horas a 37°C, 58% del sustrato se hidrolizó a 7-ADCA.

En la tabla 15 se muestran los principales procesos para hidrolizar cefalosporinas con amidasas.

Tabla 15. Deacilación de cefalosporinas por penicilino amidasas inmovilizadas (Abbott, 1975)

Fuente de la enzima	Método de Inmovilización	Reacción Catalizada	Comentarios	Compañía o Institución
<u>B. megaterium</u>	Adsorción en tierras diatomeas	bencil cefalosporina a 7-ADCA	un reactor de columna se operó 9 días	Toyo Jozo
<u>Arthrobacter viscosus</u>	Adsorción en Ca ₃ (PO ₄) y "Decalite"	bencil cefalosporina a 7-ADCA	--	Banyu Pharmaceutical
<u>B. megaterium</u>	--	fenoxicefalosporina a 7-ADCA	--	Tozo Jozo
<u>Erwinia aroideae</u>	Células atrapadas en triacetato de celulosa	fenoxicefalosporina a 7-ADCA	--	Laboratorios Glaxo

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudio de la reacción de hidrólisis de la bencilcefalosporina con un biocatalizador (células de E. coli ATCC 9637 con actividad penicilino amidasa inmovilizadas en carragenina) utilizado en la hidrólisis de penicilina G.

Objetivos parciales

- Estudio del sistema con células libres
- Estudio del sistema con células inmovilizadas
- Montaje de un reactor enzimático para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de bencilcefalosporina.

IV. MATERIALES Y METODOS

4:1 Materiales

4:1:1 Reactivos:

Acido clorhídrico (J.T. Baker)

Acido fosfórico (J.T. Baker)

Acido sulfúrico (J.T. Baker)

Acido fenilacético (Sigma)

Acido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (Fermentaciones y Síntesis, S.A.)

Agar bacteriológico (Difco)

Albúmina bovina (Sigma)

Bacto peptona (Difco)

Bencilcefalosporina (ácido bencil-7-aminodesacetoxicefalosporánico (bencil-7-ADCA) ó ácido 7-fenilacetamidodesacetoxicefalosporánico (Fermentaciones y Síntesis, S.A.))

Carbonato de sodio (J. T. Baker)

Carragenina (Prevequin)

Cloruro de amonio (J. T. Baker)

Cloruro de calcio (J. T. Baker)

Cloruro de potasio (J. T. Baker)

Cloruro de sodio (J. T. Baker)

Etanol absoluto (J.T. Baker)

Etilendiamina (J.T. Baker)

Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker)

Fosfato de potasio dibásico (J. T. Baker)

Glicerol (J.T. Baker)

Glutaraldehído (Merck)

Hidróxido de amonio (J.T. Baker)
Hidróxido de potasio (J.T. Baker)
Hidróxido de sodio (J.T. Baker)
Isopropanol (J. T Baker)
Membrana Millipore tipo HAWP diámetro 47 mm (Millipore Ltd)
Paradimetilaminobenzaldehído (J.T. Baker)
Reactivo de Fenol Folin Ciocalteau (Sigma)
Sulfato de cobre heptahidratado (J.T. Baker)
Sulfato de fierro hexahidratado (J.T. Baker)
Sulfato de potasio (J. T. Baker)
Sulfato de magnesio heptahidratado (J.T. Baker)
Tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker)

4:1:2 Equipo

- Colorímetro (Spectronic 20 Baush & Lomb, Co.)
- Potenciómetro (Corning, Co.)
- Centrífuga clínica 5 000 rpm (Sol Bar. Aparatos científicos)
- Incubadora (Cuarto de temperatura constante 29°C)
- Baño con agitación rotatoria (modelo G 76) New Brunswick Scientific Co.).
- Centrífuga de alta velocidad con refrigeración (Sorvall R.L. 5 B)
- Balanza analítica cap. 100 g (S 2000) Bosch
- Balanza granataria
- Fermentador de 25 lt. con controles automáticos (Centro de Instrumentos).

- Bio flo Multi Gen New Brunswick Co. Inc. Edison N.J.
USA cap. 2000 ml.
 - Homogeneizador de células (Caframo Wiarton, Ont. Canada)
- 4:1:3 Cepa

Escherichia coli ATCC 9637 proporcionada por el laboratorio de Tecnología Enzimática de IIBM (UNAM).

4.2 Métodos

4.2.1 Medios de cultivo.

- Medio Luria (líquido)	g/l.
Bacto peptona o triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Acido fenilacético	2

ajustar el pH a 7 con hidróxido de potasio.

Para preparar medio Luria sólido se agrega agar bacteriológico 15 g/l.

- Medio mínimo (líquido)	g/l.
Fosfato de potasio monobásico	1.3
Sulfato de potasio	2.6
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.2
Cloruro de calcio	0.01
Sulfato ferroso 7H ₂ O	0.005
Cloruro de amonio	0.8
Acido fenilacético	2.0

ajustar el pH a 7.4 con hidróxido de potasio.

Para preparar medio mínimo sólido se agrega agar bacteriológico 15 g/l.

Los componentes de cada medio se disuelven en agua destilada, el pH se ajusta antes de esterilizar, la esterilización se realiza a 121°C, 15 libras/pulgada² de presión, durante 20 minutos.

4.2.2 Conservación de la cepa.

La conservación de la cepa se realizó en glicerol como se menciona a continuación.

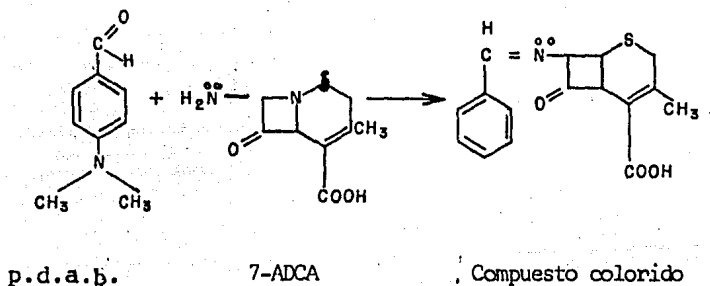
- 1.- inocular un tubo de ensaye con 3 ml de medio mínimo, incubar durante 24 hr. a 29°C, 200 rpm,
- 2.- transferir este volumen a un matraz erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio, incubar bajo las condiciones descritas en el paso 1,
- 3.- centrifugar durante 1 hr a 3000 rpm, en condiciones estériles, desechar el sobrenadante.
- 4.- resuspender el paquete celular en 1 ml de medio y adicionarlo a 1 ml de glicerol estéril, agitar para lograr completa homogeneización, mantener a -15 °C.

4.2.3 Determinación de 7-ADCA por el método de para-dimetilaminonobenzaldehído (p.d.a.b.) (Casas, 1981).

a) Fundamento

Se forma una imida (Base de Schiff) entre el grupo aldehído del p dimetil aminobenzaldehído y el grupo amino (amina primaria)

del 7-ADCA, formandose un compuesto colorido (amarillo), que presenta su máxima absorbancia a una longitud de onda de 415 nm.



b) Reactivos

- . p.d.a.b.
- . alcohol etílico absoluto
- . ácido sulfúrico concentrado
- . H_2KPO_4 , HK_2PO_4

c) Soluciones

- . Preparación de la solución de p.d.a.b.
Pesar 1 g de p.d.a.b., agregar 50 ml de alcohol etílico al 60%, adicionar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, llevar a 100 ml con alcohol etílico al 60%.
- . Solución amortiguadora de fosfatos pH 8 0.03 M.

d) Procedimiento

De cada muestra problema tomar 0.2 ml, agregar 4.8 ml de alcohol absoluto, agregar 2.5 ml de solución de p.d.a.b., agitar y dejar reposar durante 10 min. Durante estos 10 min. centrifugar a 3000 rpm 5 min. Leer a 415 nm contra blanco de reactivos, el cual se prepara sustituyendo los 0.2 ml de muestra problema por 0.2 ml de amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M.

e) Curva patrón

Preparar una solución de 7-ADCA 2 mg/ml en amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M, para lograr una disolución completa, ajustar el pH a 8 con solución de hidróxido de potasio diluída.

Proceder mediante la siguiente tabla:

ml de sol 7-ADCA.	ml de H ₂ O
0.1	0.9
0.2	0.8
0.3	0.7
0.4	0.6
0.5	0.5

De cada preparación tomar 0.2 ml y seguir el procedimiento ya descrito. Una curva característica se muestra en la fig. 10.

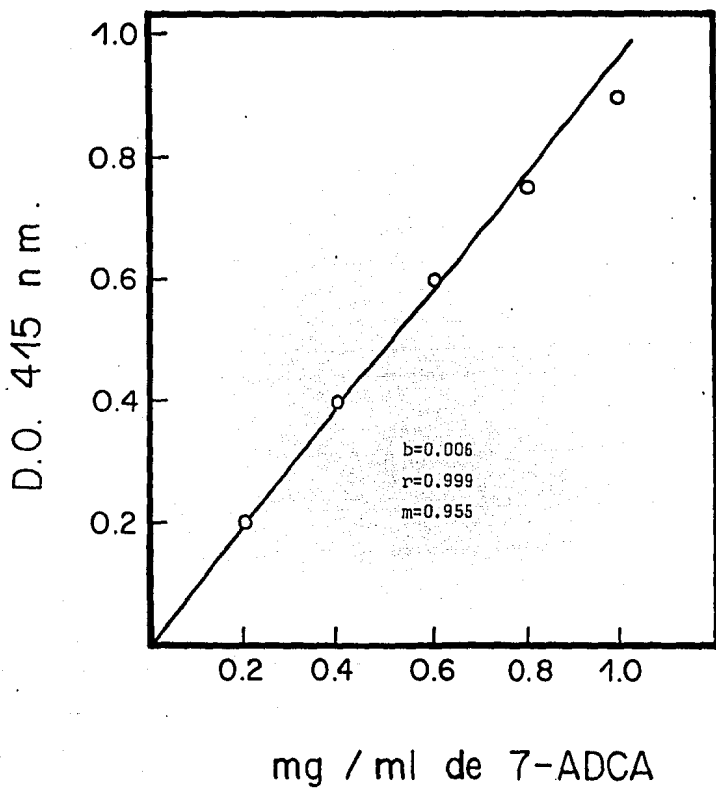


Fig. 10 Curva estandar de 7-ADCA

$$y = mx + b \quad x = (7\text{-ADCA})$$

$$y = \text{D.O.}_{415\text{nm}}$$

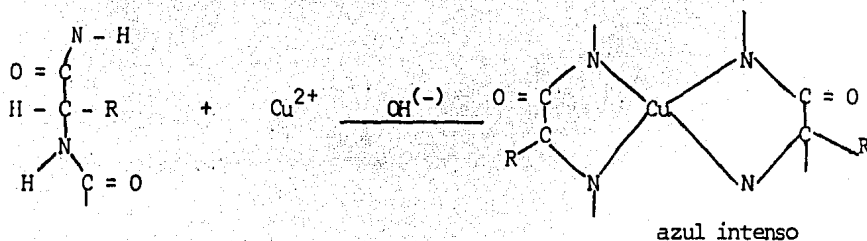
4.2.4 Determinación de proteína celular (Lowry, 1951).

a) Fundamento

Se basa en el desarrollo de un color azul debido a:

- i) reacción de Biuret
- ii) reacción del reactivo fosfomolibdenotungstano por aminoácidos como tirosina y triptofano presentes en las proteínas.

El color azul formado presenta su máxima absorbancia a 590 nm.



b) Reactivos.

- Na₂CO₃
- NaOH
- CuSO₄
- KNaC₉H₄O₆
- reactivo Fenol Folin Ciocalteu

c) Soluciones

- solución A.- Na₂CO₃ al 2% (p/v) en NaOH 0.1 N.

- . solución B.- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% (p/v)
- . solución C.- Tartrato de sodio y potasio al 1% (p/v).
- . reactivo D.- Mezclar volúmenes iguales de solución B y C al momento de usarla.
- . reactivo E.- Por cada 50 ml de solución A agregar un ml de reactivo D.
- . reactivo F.- Diluir volumen a volumen el reactivo de Folin con agua destilada.

El reactivo E se prepara agregando simultáneamente la cantidad necesaria de solución B y C a la cantidad previamente medida de solución A.

d) Procedimiento

- . tomar 0.1 ml de suspensión celular y llevar a 1 ml con agua destilada,
- . adicionar 5 ml de reactivo E, agitar y dejar reposar durante 10 min,
- . adicionar 0.5 ml de reactivo F, agitar,dejar reposar 30 min,
- . leer a 590 nm contra blanco de reactivos, el cual se prepara de igual manera, utilizando 1 ml de agua destilada en lugar del problema.

e) Curva Patrón

La curva patrón se prepara partiendo de una solución de 200 µg/ml de albúmina bovina, de ésta solución se toman 0.25, 0.5, 0.75, 1 ml y se aforan a 1 ml con agua destilada.

Una curva característica se muestra en la fig. 11.

4.2.5 Determinación de actividad enzimática en células libres (Casas , 1981).

a) Fundamento

La enzima penicilino amidasa contenida en células intactas de E. coli ATCC 9637 cataliza la hidrólisis de B-7-ADCA, obteniéndose como producto de reacción el ácido fenil acético y 7-ADCA el cual contiene un grupo amino (amina primaria) que reacciona con el grupo aldehído del p.d.a.b., dando un compuesto de color amarillo que absorbe a 415 nm.

b) Reactivos

- . p.d.a.b.
- . H_2KPO_4
- . HK_2PO_4
- . Alcohol etílico absoluto
- . Bencilcefalosporina
- . KOH

c) Soluciones

- . solución de p.d.a.b. (antes descrita)
- . amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M

CURVA ESTANDAR DE PROTEINA

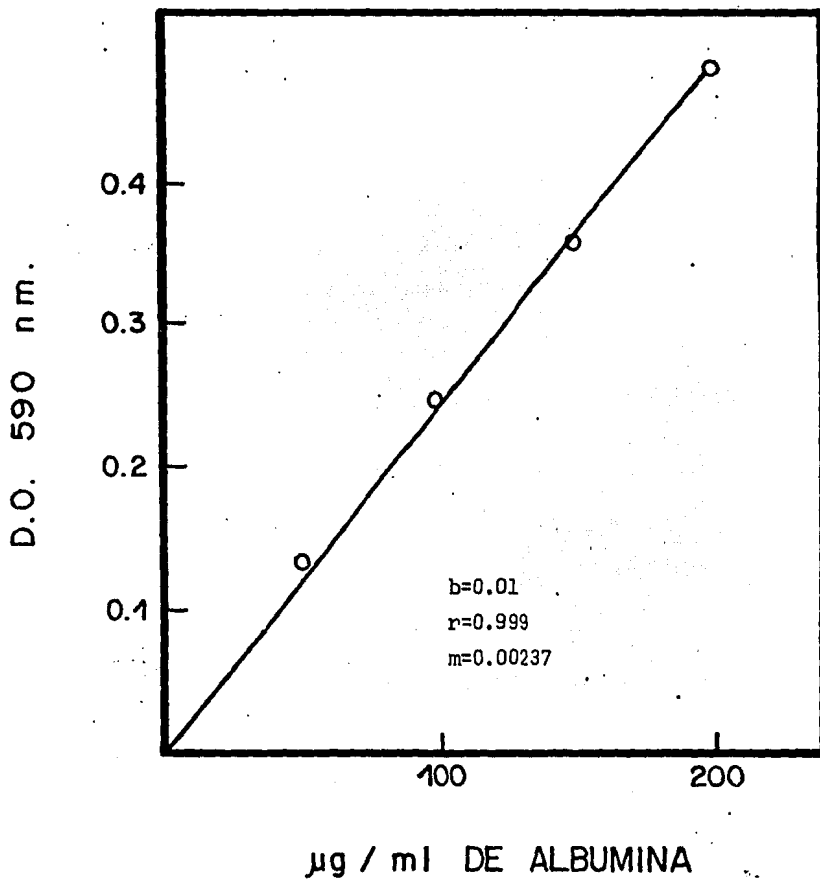


Fig. 11. Curva estandar de proteína.

$$y = mx + b \quad x = (\text{proteína})$$

$$y = \text{D.O. } 590\text{nm.}$$

- . solución de bencilcefalosporina 50 mg/ml en amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M, ajustar el pH con hidróxido de potasio diluido.

d) Procedimiento

- . Tomar 10 ml de medio fermentado con E. coli ATCC 9637
- . Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min.
- . eliminar sobrenadante
- . resuspender adicionando 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 8 0.03 M. Tomar 0.9 ml de esta suspensión.
- . agregar 0.1 ml de sustrato para tener una concentración final de 5 mg/ml.
- . Incubar durante 30 min. en un baño con agitación rotatoria a 40°C.
- . transcurrido este tiempo, se toman 0.2 ml de mezcla de reacción y se vierten sobre 4.8 ml de alcohol etílico absoluto.
- . se determina 7-ADCA por el método de p.d.a.b., antes descrito.

CONTROLES

1. de sustrato Se sigue el procedimiento anterior, sustituyendo el volumen de suspensión celular por solución

de sustrato (bencil
cefalosporina).

2. de células

Se sigue el procedi-
miento anterior, sus-
tituyendo el volumen
de sustrato por solu-
ción amortiguadora de
fosfatos pH 8 0.03 M.

- determinar proteína celular por el método de Lowry (an-
tes descrito).

Definición de actividad enzimática:

μMoles de 7-ADCA a 40°C, pH 8
30 min. mg. prot.

4.2.6 Purificación de sustrato.

El sustrato utilizado en este trabajo: bencilcefalosporina ,
ácido bencil-7-aminodesacetoxicefalosporánico (B-7-ADCA) ó ácido
7-fenilacetomidodesacetoxicefalosporánico, fue porporcionado
por Fermentaciones y Síntesis, S.A., este producto se obtiene
por vía química a partir de bencilpenicilina. Se nos proporcio-
nó en forma impura. La técnica de purificación fue porporcionada
por la misma industria..

- a) Reactivos
isopropanol

- . hidróxido de amonio
- . ácido clorhídrico

b) Procedimiento

- . en un vaso de precipitados colocar 10 g de bencilcefalosporina impura, agregar 80 ml de isopropanol agua 60% v/v, ajustar a pH 7 con hidróxido de amonio, hasta disolución total.
- . si hay turbiedad filtrar, el filtrado se precipita con HCl concentrado a pH 1.3 a 1.6 a temperatura ambiente.
- . después de un período de cristalización a temperatura ambiente (24 hr) el producto se filtra y se lava por separado con 25 ml de agua caliente y 20 ml de isopropanol.

4:2:7 Curva de crecimiento.

El crecimiento de un microorganismo puede determinarse por numerosas técnicas, fundadas en algunos de los siguientes tipos de estimación:

1. recuento o enumeración de células directamente por microscopía o mediante un contador electrónico de partículas o, indirectamente por recuento de colonias.
2. masa celular.- directamente por pesada o determinación cuantitativa de nitrógeno celular, o indirectamente por turbidimetría.
3. actividad celular.- indirectamente por referencia del grado de actividad química al tamaño de la población.

En este trabajo el crecimiento del microorganismo se determinó por turbidimetría y se realizó además por peso celular, para así obtener la relación existente entre peso celular y D.O. 560 nm. (Fig. 12).

a) Procedimiento

El experimento se realizó en un fermentador Multi Gen New Brunswick Co. Inc. Edison M.J. USA, con capacidad de 2000 ml y volumen de trabajo de 1200 ml, 250 rpm y 1.0 vvm, utilizando medio mínimo, 5% inóculo.

El crecimiento celular se siguió hasta que el microorganismo llegó a la fase estacionaria, se tomaron muestras de 10 ml cada hora, se determinó D.O. 560 nm utilizando como blanco el medio de cultivo. De estos 10 ml, 5 ml se filtraron en membranas millipore (0.22 μ m.) previamente pesadas y puestas a peso constante, se dejaron en la estufa a 80°C hasta llegar a peso constante.

4.2.8 Producción de la enzima penicilino amidasa contenidas en células de E. coli ATCC 9637.

El medio en que se realizó el crecimiento del microorganismo fue medio mínimo, pH 7.4 antes de esterilizar, 29°C, agitación rotatoria a 200 rpm, durante un tiempo de 20 a 24 hrs.

a) Procedimiento

Se parte de un glicerol,* del cual se toman 0.2 ml para inocular un tubo de ensaye con 3 ml de medio, después del tiempo de

* cepa conservada en glicerol.

incubación el contenido de este tubo se transfiere a un matraz erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio. Transcurrido el tiempo de incubación 5ml de este matraz se transfieren a un matraz erlenmeyer de 250 ml que contienen 50 ml de medio.

Cuando el crecimiento se realiza en matraz Fernbach el volumen de trabajo es 1200 ml. El porcentaje de inóculo de -- fernbach y fermentadores es 5% de volumen, dicho inóculo debe seguir los pasos antes descritos.

4.2.9 Inmovilización de células de E. coli ATCC 9637 en carragenina (Casas , 1981).

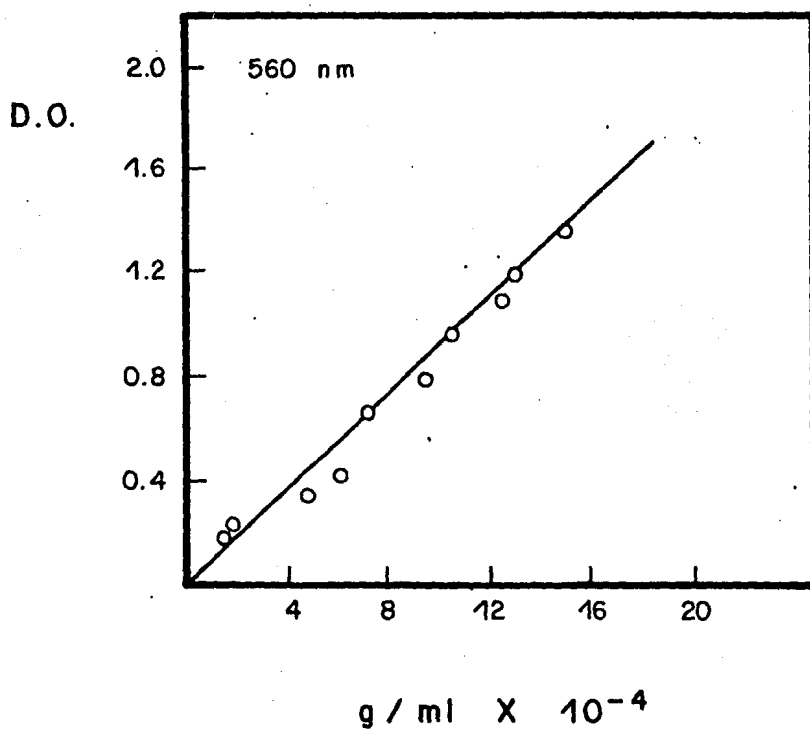
a) Reactivos

- . H_2KPO_4
- . HK_2PO_4
- . KOH
- . KCL
- . Etilen diamina
- . NaCl
- . Glutaraldehído (25%)
- . H_3PO_4 conc.

b) Soluciones

- . solución salina fisiológica.- Pesar 9 g de NaCl y llevar a 1000 ml con agua destilada.

D.O. vs. PESO SECO.

Fig. 12 Curva estandar peso seco de *E. coli* ATCC 9637.

- solución curtidora.- En un vaso de precipitados de 1000 ml colocar 22.35 g de KCl y disolverlos en 500 ml de amortiguador de fosfatos pH 7, 0.5 M, adicionar 5.10 g de etilendiamina, todo esto a 4°C. Ajustar el pH a 7 con ácido fosfórico concentrado y aforar a 1000 ml con amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7. Las cantidades de KCl y etilendiamina están para tener una concentración de 0.3 M y 0.085 M respectivamente.

b) Procedimiento

Inmovilización

- pesar 3 g de carragenina
- resuspender el paquete celular (4g p.s.) en solución fisiológica hasta un volumen final de 25 ml,
- en un baño a temperatura de 60°C, colocar 75 ml de solución fisiológica, hasta que alcance 60°C,
- agregar la carragenina y con un homogeneizador de células, mezclar durante 10 min para lograr una suspensión homogénea y translúcida.
- bajar la temperatura a 50°C,
- agregar la suspensión celular, mezclar con el homogeneizador de células, hasta lograr una suspensión homogénea
- vertir sobre una superficie lisa,
- dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30-40 min,
- sumergir en cloruro de potasio 0.3 M a temperatura de 4 a 10°C.

- . fraccionar el biocatalizador (cubos).

Procedimiento para curtir el biocatalizador células carragenina.

- . se toman 100 g de biocatalizador (peso húmedo),
- . se suspenden en 500 ml de solución curtidora, se mantiene en agitación durante 5 minutos,
- . se agrega glutaraldehído para tener una concentración final de 2%, agitar durante 30 minutos,
- . transcurrido este tiempo lavar generosamente con agua destilada, posteriormente se da un lavado con KCl 0.3 M,
- . suspender en KCl 0,3 M.

4.2:10 Determinación de actividad enzimática en el biocatalizador

a) Reactivos

- . p.d.a.b.
- . $H_2K PO_4$
- . $HK_2 PO_4$
- . alcohol etílico absoluto
- . bencilcefalosporina
- . KOH

b) Soluciones

- . solución de p.d.a.b. (antes descrita)
- . amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M.
- . solución de bencilcefalosporina 50 mg/ml en amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M, ajustar el pH a 8 con hidróxido de potasio diluido.

c) Procedimiento

- . pesar 0.1 a 0.2 g de biocatalizador peso húmedo*, adicionar 9 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 8 0.03 M, en un matraz erlenmeyer de 50 ml.
- . agregar 1 ml de sustrato (B-7-ADCA 50 mg/ml)
- . incubar durante 30 min en un baño con agitación rotatoria a 40°C.
- . transcurrido este tiempo, se toman 0.2 ml de mezcla de reacción y se vierten sobre 4.8 ml de alcohol etílico absoluto.
- . se determina 7-ADCA por el método de p.d.a.b. antes descrito.

Definición de actividad enzimática:

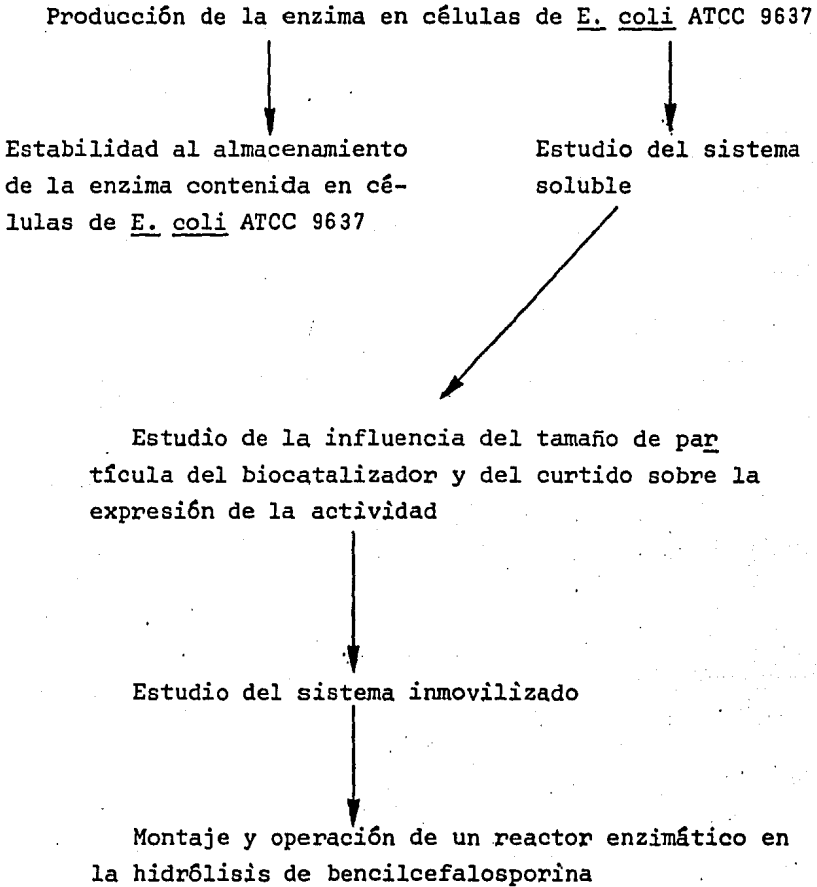
umoles de 7-ADCA _____ a 40°C, pH 8.
30 min g de biocatalizador (peso húmedo*)

4:3 Diseño experimental

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo bajo la siguiente

* El biocatalizador curtido tiene 93 % de humedad.

secuencia :



A continuación se describe cada punto.

I. Producción de la enzima penicilino amidasa contenida en células de E.coli ATCC 9637.

La producción de las células de E.coli ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa empleadas en el desarrollo de esta tesis, se efectuó en un fermentador de 25 l construido en el Centro de Instrumentos de la UNAM. El volumen de trabajo fué 18 l, se utilizó medio mínimo y se inoculó con 900 ml de células crecidas conforme a lo descrito en el punto 4.2.8. Para que un inoculo pueda ser empleado en una fermentación deberá tener una densidad óptica de 1.3 a 1.5 y una actividad específica mayor de 0.6 μ moles de 7-ADCA/mg de proteína.

Durante las fermentaciones se media por ciento de oxígeno disuelto, crecimiento y actividad específica.

Las fermentaciones se daban por terminadas cuando el por ciento de oxígeno disuelto en el medio subía. Las células se empleaban en el proceso solamente si tenían una actividad específica de al menos 3 μ moles de 7-ADCA/mg de proteína.

- II. Estabilidad al almacenamiento de la enzima penicilino amidasa contenida en células intactas de E. coli ATCC 9637.

En la figura 13 se muestra la forma en que se procedió para la realización de este experimento.

Las condiciones ensayadas fueron las siguientes.

a) Almacenadas en diferentes medios:

- i. medio mínimo sin fuente de carbono ni de nitrógeno
- ii. amortiguador de fosfatos pH 8, 0.03 M
- iii. solución fisiológica salina

b) almacenadas en el caldo de fermentación

c) almacenadas como paquete celular

Las temperaturas probadas fueron: temperatura ambiente (20-25°C), temperatura de refrigeración (4-8°C), temperatura de congelación (0-, -15°C).

Se determinó actividad enzimática al inicio del experimento, a los 7, 21 y 40 días de almacenamiento, bajo las condiciones mencionadas en la sección de métodos y materiales.

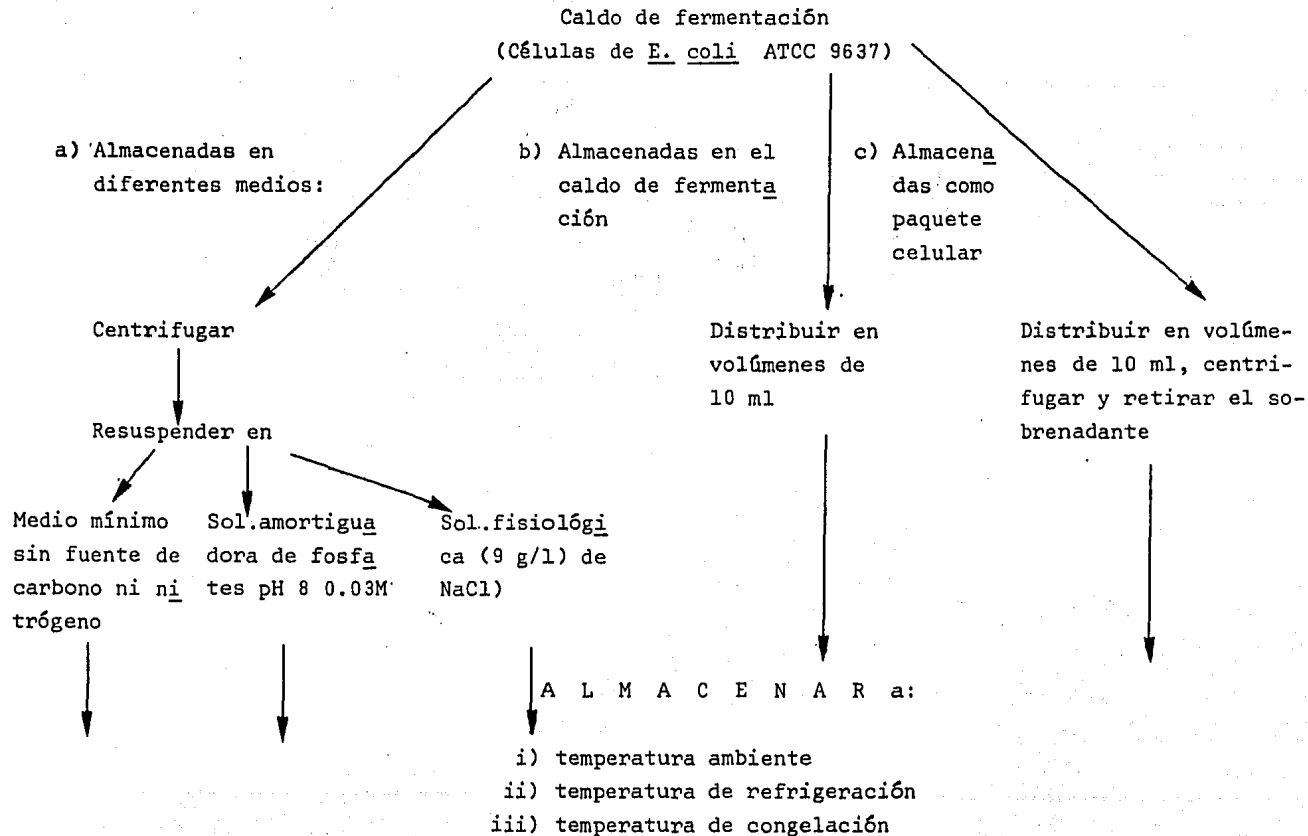


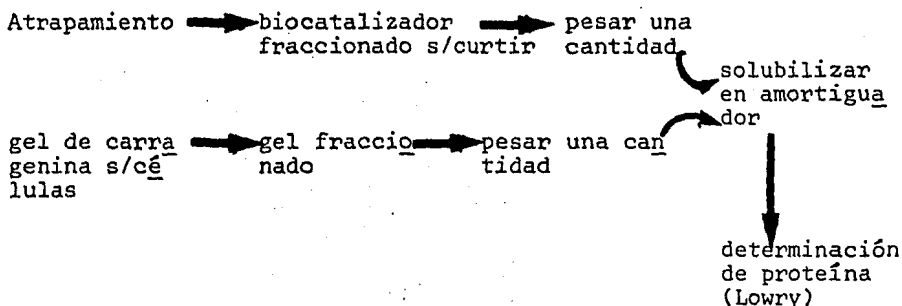
Figura 13. Procedimiento utilizado para determinar estabilidad al almacenamiento de células de E. coli ATCC 9637.

III. Estudio de la influencia del tamaño de partícula del biocatalizador

Este estudio se realizó con biocatalizador curtido y sin curtir, para el biocatalizador sin curtir se trabajó con tamaños de biocatalizador de 0.6 cm por lado (0.2160 cm^3) a 0.1 cm por lado (0.0010 cm^3).

Con el fin de tener parámetro de comparación con respecto a la actividad de células intactas, la actividad específica del biocatalizador se realizó con respecto a proteína atrapada por gramo de biocatalizador.

La determinación de proteína en biocatalizador se realizó como se menciona a continuación:



Esta determinación se realizó en biocatalizador sin curtir, para el biocatalizador curtido se hizo la suposición de que la proteína era la misma que para biocatalizador sin curtir.

La determinación de actividad enzimática se realizó, mediante lo preestablecido en la sección de materiales y métodos.

IV. Estudio del sistema libre e inmovilizado

a). Perfil de pH

Paquetes celulares provenientes de células fermentadas en el medio de producción, se resuspenden en amortiguador de fosfatos 0.03 M a diferentes pHs (6, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9). En el caso del sistema inmovilizado se procede de la misma manera, sustituyendo células por biocatalizador. En ambos casos se determina actividad conforme a lo preestablecido en la sección de materiales y métodos.

b). Perfil de temperatura

Paquetes celulares provenientes de células fermentadas en el medio de producción, se resuspenden en amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M, y se les determina actividad enzimática a diferentes temperaturas (30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C). Para el sistema inmovilizado se procede de la misma manera, sustituyendo células por biocatalizador, las determinaciones de actividad se realizan con las cantidades de biocatalizador y suspensión celular descritos en la sección de materiales y métodos.

c). Determinación de la energía de activación.

En el presente estudio se determinó la velocidad inicial del sistema libre e inmovilizado a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 55°C), para de esta manera determinar la energía

de activación.

En el caso del sistema libre se manejaron volúmenes de 5 ml de suspensión celular, se tomaban muestras de 0.2 ml cada dos minutos, hasta el minuto 10.

Para el sistema inmovilizado se manejaron 0.75 g de biocatalizador (peso húmedo), con un volumen total de 25 ml en matraces erlenmeyer de 125 ml, se tomaban muestras cada dos minutos, hasta el minuto número 10.

En ambos casos se utilizó una concentración final de sustrato de $1.51 \times 10^{-2} M$. Se determinó 7-ADCA mediante lo preestablecido en la sección de materiales y métodos.

d). Termoestabilidad

En este experimento se ensayaron 3 diferentes temperaturas 40, 50 y 55°C. En el caso del sistema soluble, el paquete celular de E. coli ATCC 9637 se resuspende en amortiguador de fosfatos pH 8, 0.03 M y se colocan en un baño con agitación rotatoria (200 rpm) a las temperaturas antes mencionadas y se toman alicuotas a diferentes tiempos de incubación.

En lo referente al sistema inmovilizado, el biocatalizador se coloca en el mismo amortiguador bajo las mismas condiciones y se toman muestras a diferentes tiempos de incubación.

Para el sistema soluble se manejaron volúmenes de 60 ml,

las alícuotas tomadas fueron de 1 ml. Para el sistema inmovilizado, se manejaron 6 g de biocatalizador (peso húmedo) en 45 ml de amortiguador. La cantidad de biocatalizador tomada a los diferentes tiempos fue de 0.1 a 0.2 g peso húmedo.

En ambos casos se determina actividad enzimática mediante lo preestablecido en la sección de métodos y materiales.

e). Efecto de la concentración de sustrato.

En este estudio se determinó velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato (3.02, 2.26, 1.51, 0.75, 0.37, y 0.18×10^{-2} M.), tanto en sistema soluble como en sistema inmovilizado.

En el caso del sistema libre se manejaron 5 ml de suspensión celular. Para el sistema inmovilizado se utilizaron 0.75 g de biocatalizador (peso húmedo) en un volumen total de reacción de 25 ml.

En ambos casos se determinó 7-ADCA mediante lo establecido en la sección de métodos y materiales.

V. Montaje del Bioreactor Enzimático

En el presente estudio se utilizó un reactor con penicilino amidasa inmovilizada en forma de columna, con las siguientes características.

1. columna de vidrio de 10 cm de longitud y 2.2 cm de diámetro.
2. cantidad de soporte empacado 18.5 g (peso húmedo)
3. volumen muerto 10 ml.

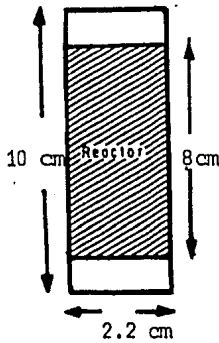


Fig. 14. Características del reactor utilizado en la hidrólisis de bencilcefalosporina.

Las condiciones de hidrólisis fueron las siguientes:

- concentración de bencilcefalosporina 0.159 M.
- flujo 142.5 ml/min.
- temperatura 40°C, pH 8
- carga enzimática 500 u/g de bencilcefalosporina
- cantidad de bencilcefalosporina manejada 2.35 g.
- volumen de reacción 47 ml.

Un esquema del sistema de hidrólisis se muestra a continuación:

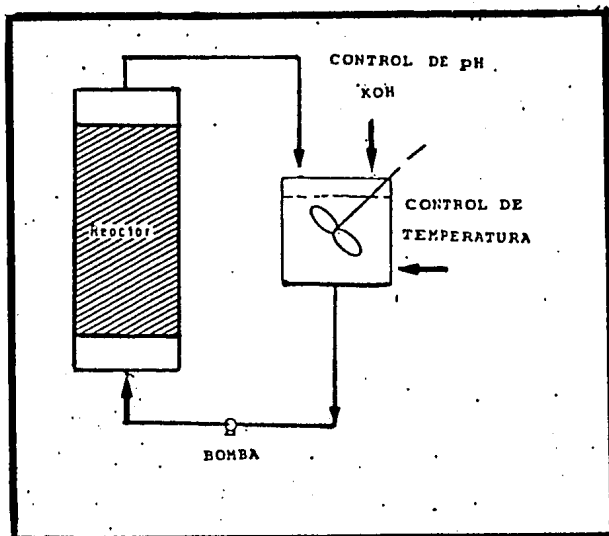


Fig. 15. Sistema de hidrólisis de la bencilcefalosporina. La solución de bencilcefalosporina se hace pasar a través del biocatalizador por medio de una bomba peristáltica, el pH se controla a 8 con KOH 1 N y la temperatura a 40 °C.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5:1 Consideraciones preliminares.

En el sitio donde se desarrolló esta tesis se ha trabajado ampliamente en el desarrollo de una tecnología para la producción de 6-APA por hidrólisis enzimática de penicilina G. La figura 16 nos muestra el diagrama del proceso, en el se puede observar que una de las alternativas es la inmovilización de células completas; en esta parte en particular, trabajaron el Dr. Rodolfo Quintero R. y M. en C. Lidia T. Casas. Ellos produjeron un biocatalizador utilizando células intactas de E. coli ATCC 9637 inmovilizadas en carragenina, para su posterior uso en la hidrólisis de penicilina G. El presente trabajo pretende demostrar que utilizando el biocatalizador antes mencionado, se puede llevar a cabo la hidrólisis de bencilcefalosporina, la cual nos da como producto de reacción el 7-ADCA; importante intermediario en la síntesis de cefalosporinas semisintéticas.

Es importante mencionar que demostrar que la bencilcefalosporina es hidrolizada por este sistema incrementó la importancia del proceso, ya que el biocatalizador puede ser utilizado tanto en la producción de 6-APA, como en la de 7-ADCA.

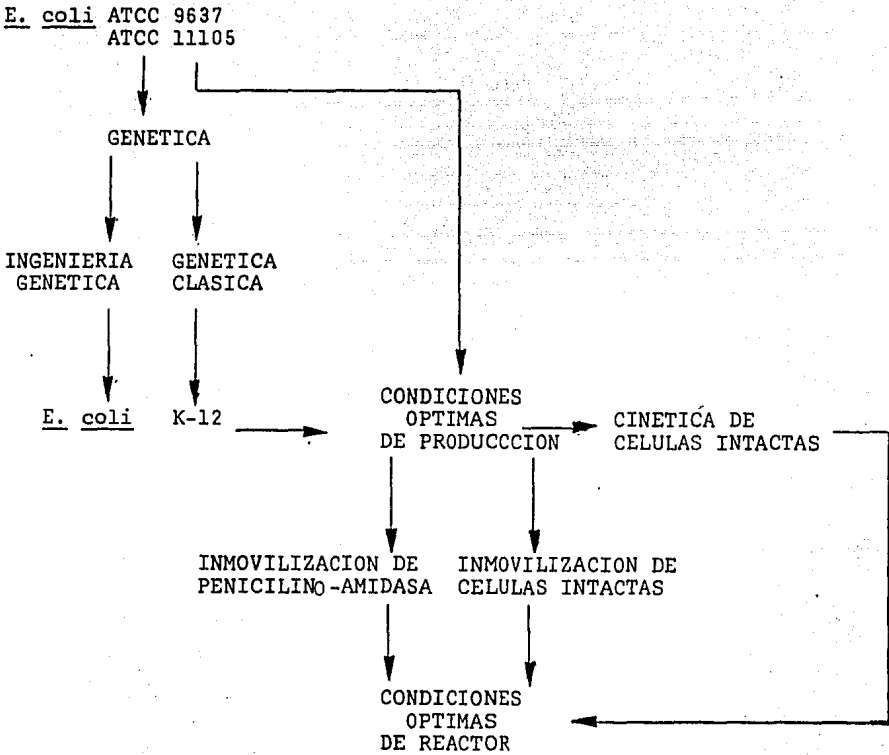


Figura 16. Diagrama del proceso para la producción del ácido 6-aminopenicilánico.

5.2 Producción de la enzima penicilino amidasa contenida en células de E. coli ATCC 9637.

En la figura 17 se muestran las cinéticas de dos fermentaciones llevadas a cabo en el fermentador de 25 l, en diferentes condiciones de aireación y agitación. La fermentación 17a se llevó a cabo empleando valores de 100 rpm y 0.5 vvm y la 17b a 200 rpm y 1 vvm. En ambas figuras se grafican D.O._{560 nm}, % de oxígeno disuelto (% O₂ dis) y actividad específica contra tiempo. Las dos fermentaciones presentan el comportamiento clásico de cinética de crecimiento: - una fase de adaptación, una fase logarítmica y una fase estacionaria.

En lo que se refiere a la producción de la enzima en la fermentación 17a se observa que la actividad específica se incrementa a medida que el microorganismo crece, mientras que en la fermentación 17b la producción de la enzima presenta variaciones a lo largo del crecimiento. En la primera se llega a una actividad específica final de 7 μ moles de 7-ADCA/mg de proteína y en la segunda 3 μ moles de 7-ADCA/mg de proteína.

El % de O₂ dis. disminuye a medida que la bacteria crece, sin embargo, en la fermentación 17a la disminución no es tan drástica como en el caso de la fermentación 17b; los valores a los que se llegan son 40 y 30% a las horas 18 y 20 respectivamente.

Es claro que el comportamiento en cuanto a la producción de la enzima y % de O₂ dis. es distinto en ambas fermentaciones y esto se puede atribuir a las diferencias en las condiciones de aireación y agitación.

Se puede apreciar que cuando se manejan valores de 0.5 vvm y 100 rpm la actividad específica fué mayor que la obtenida cuando éstos fueron de 1 vvm y 200 rpm.

Para tener una idea más exacta de la influencia de la concentración de O_2 dis. se calculó el k_{1a} para ambos casos. El k_{1a} es el coeficiente de transferencia de oxígeno; este concepto nos dice la eficiencia con que el oxígeno burbujeado a un fermentador se transfiere al medio de cultivo, suponiendo que esta transferencia sea la limitante para que el oxígeno pueda ser aprovechado por el microorganismo.

El k_{1a} puede ser calculado por correlaciones que se encuentran reportadas en la literatura y que son ecuaciones matemáticas calculadas experimentalmente. Existen muchas correlaciones publicadas (Belmar, 1984); para calcular el k_{1a} en la presente tesis se utilizó la de Van't Riet (1983).

Los valores obtenidos para las fermentaciones 17a y 17b fueron de 29.98 y 178.77 hr^{-1} respectivamente, lo cual quiere decir que la eficiencia de transferencia de oxígeno es aproximadamente 6 veces mayor en el caso de la fermentación 17b, que es precisamente la que presenta la menor actividad específica final.

Esto nos indica que el oxígeno tiene un posible efecto inhibitorio en la producción de la enzima. No obstante para concluir sobre este punto de una manera definitiva serían necesarios estudios mas profundos, que salen de los objetivos de esta tesis.

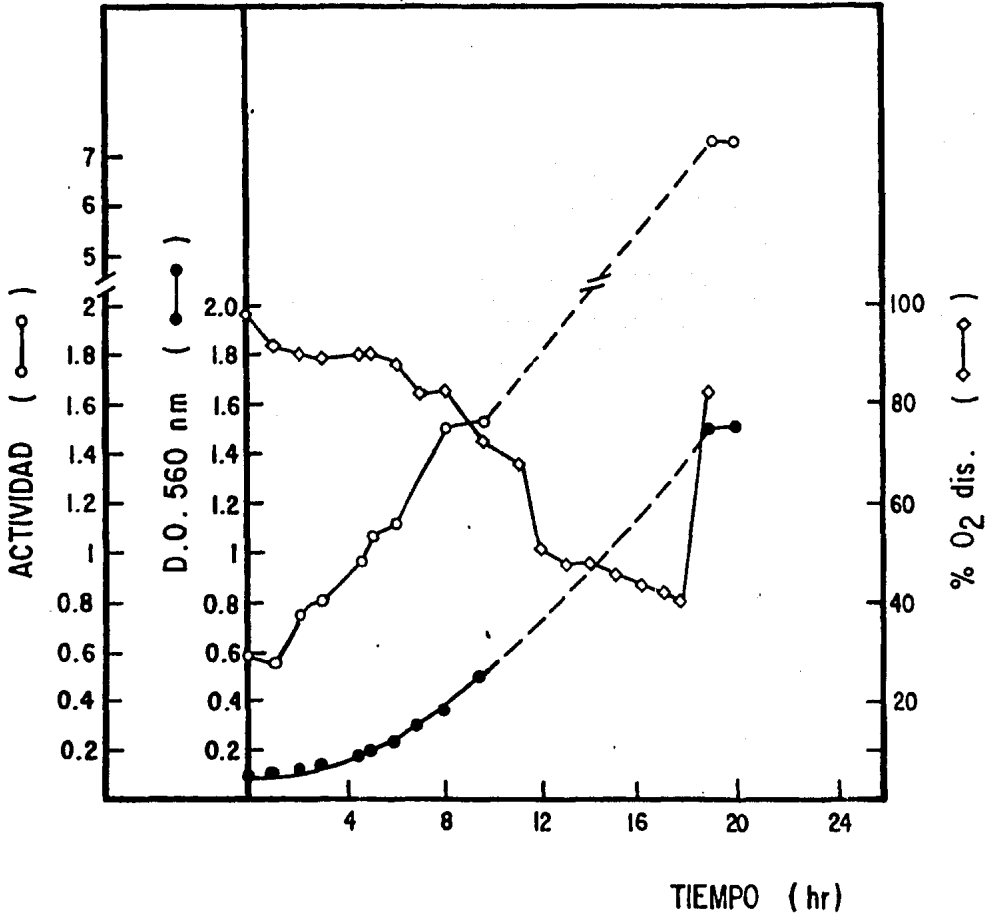


Figura 17a. Cinética de fermentación de *E. coli* ATCC 9637 para la producción de penicilino amidasa. Aireación 0.5 v.v.m, agitación 100 rpm. Fermentador de 25 litros, volumen de trabajo 18 l.

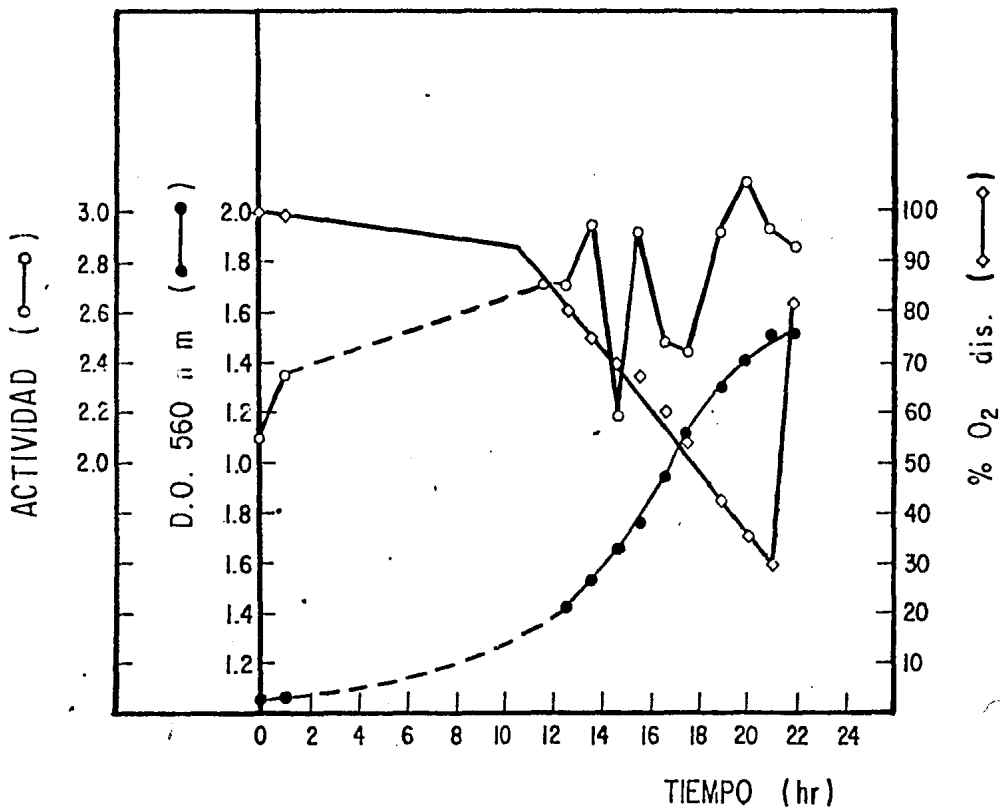


Figura 17b. Cinética de fermentación de E.coli ATCC 9637 para la producción de penicilino amidasa. Aireación 1 v.v.m, agitación 100 rpm. Fermentador de 25 litros, volumen de trabajo 18 l.

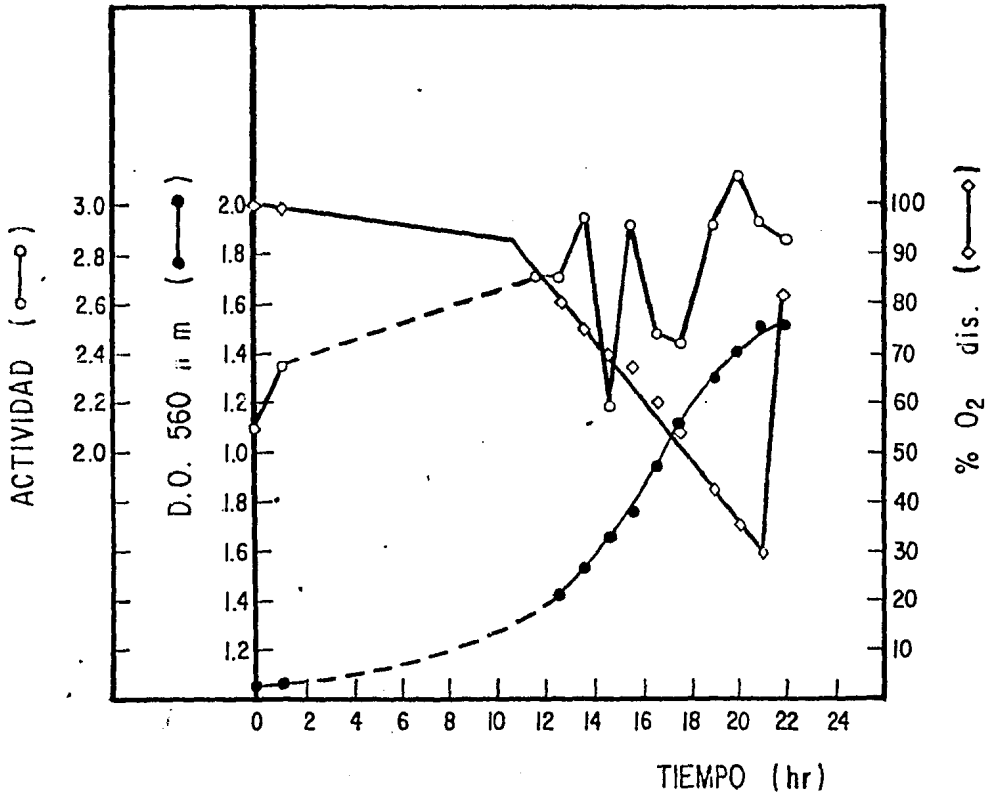


Figura 17b. Cinética de fermentación de *E.coli* ATCC 9637 para la producción de penicilino amidasasa. Aireación 1 v.v.m, agitación 100 rpm. Fermentador de 25 litros, volumen de trabajo 18 l.

5:3 Estabilidad al almacenamiento de la enzima penicilino amidasa contenida en células intactas de E. coli ATCC 9637.

En el sitio donde se desarrolló esta investigación, se ha trabajado muy extensamente con penicilino amidasa contenida en células intactas de E. coli ATCC 9637, sin embargo, la estabilidad enzimática al almacenamiento no se encontraba bien definida. El almacenamiento se ha realizado en solución fisiológica a 4°C (López-Laura, 1982), en solución amortiguadora de fosfatos pH 8 0.03 M a 4°C y como paquete celular a 4°C (Casas, 1981).

Durante las primeras etapas de este trabajo, se pudo observar que la actividad enzimática de la penicilino amidasa contenida en E. coli variaba con el almacenamiento, esto es de suma importancia debido a que dichas variaciones se ven reflejadas en la reproducibilidad de los resultados.

Por las razones antes expuestas, se decidió determinar el comportamiento de la enzima bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Se eligieron las condiciones ya antes manejadas en el laboratorio, es decir, resuspendidas en solución fisiológica, en amortiguador de fosfatos pH 8 0.03 M, y como paquete celular. En muchas ocasiones después de producir las células, no es posible centrifugarlas y utilizarlas inmediatamente, así que se

dejan en el caldo de fermentación agotado por un tiempo. Por esta razón, también se decidió determinar la estabilidad al almacenamiento de la enzima en el caldo de fermentación agotado. Las células además se almacenaron en medio mínimo sin fuente de carbono ni de nitrógeno.

Las temperaturas elegidas para el almacenamiento fueron: temperaturas de refrigeración, (4 a 8°C), de congelación, (0 a -15°C), por ser estas las temperaturas más utilizadas en el almacenamiento de enzimas y con fines comparativos también a temperatura ambiente.

Los resultados se muestran en la figura 18, en la que se puede observar que bajo las 3 diferentes temperaturas probadas, el comportamiento es muy similar para células almacenadas en solución amortiguadora, en medio agotado, en sales de medio mínimo y centrifugadas; durante los primeros 7 días de almacenamiento, la actividad enzimática disminuye, a los 21 días aumenta y en la mayoría de los casos sigue incrementándose hasta los 40 días del almacenamiento. No obstante, en células almacenadas en solución fisiológica la actividad enzimática siempre aumenta. Este incremento es considerablemente mayor comparado con las condiciones restantes y llega a ser casi del doble de la actividad inicial a la temperatura de refrigeración. Estos últimos resultados en un principio fueron alentadores, porque al tener mayor actividad específica

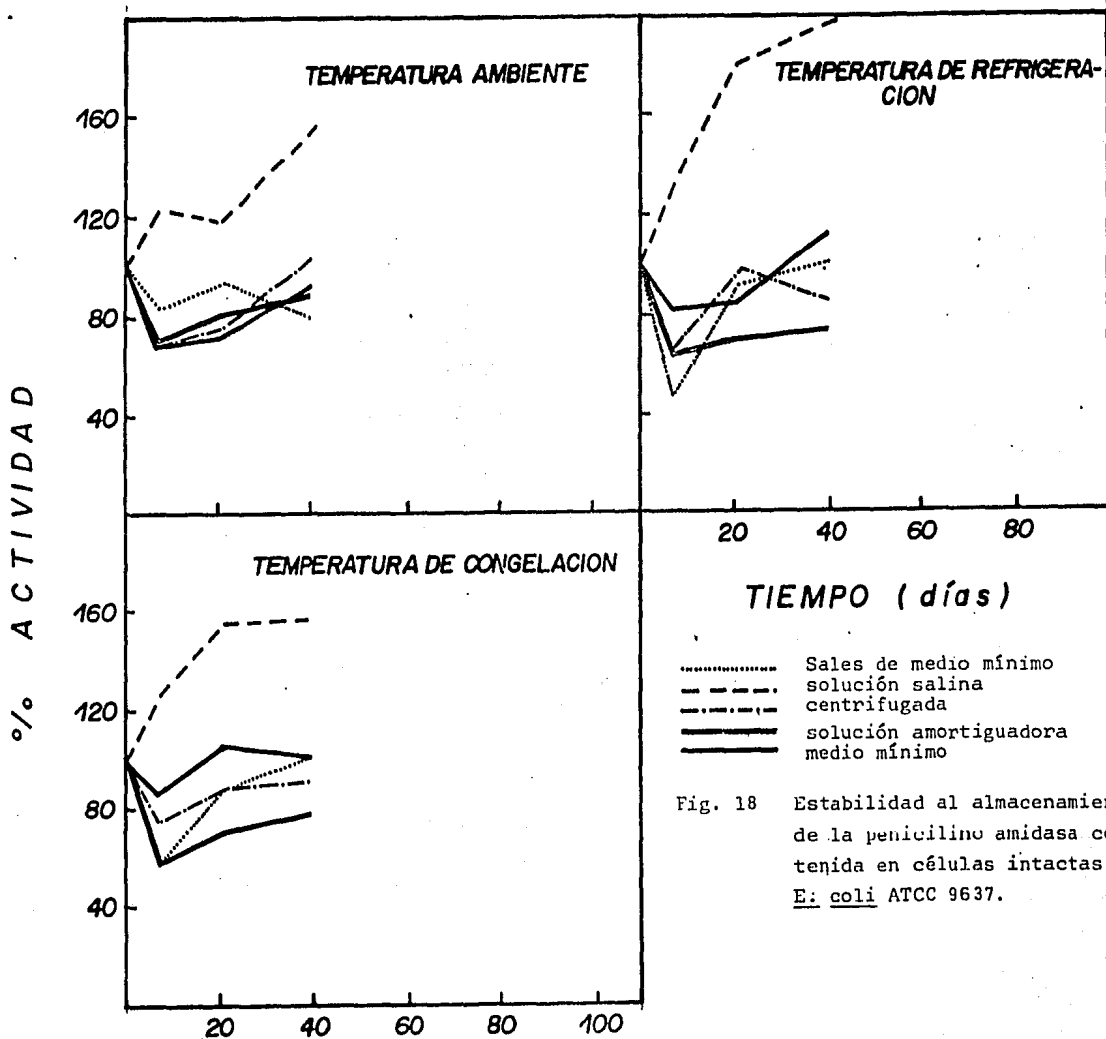


Fig. 18 Estabilidad al almacenamiento de la penicilino amidasa con tenida en células intactas de E. coli ATCC 9637.

en células, la actividad del biocatalizador se esperaba mayor. Pese a todo, esto se debe tomar con mucho cuidado porque al inmovilizar células con 4 semanas de almacenamiento (en sol. fisiológica a 4°C), la actividad del biocatalizador obtenido fué menor del valor esperado.

El hecho de que las células almacenadas en solución fisiológica hayan aumentado su actividad específica pudo deberse a una permeabilización de la membrana tal que la difusión del sustrato y productos se vea más favorecida. De cualquier forma, estas células no pueden ser utilizadas para elaborar el biocatalizador ya que el proceso de inmovilización afecta a las células permitiendo probablemente que la enzima se libere y que el gel no sea capaz de retenerla. Además, la enzima fuera de la célula es más susceptible al tratamiento químico que se le da al biocatalizador para curtirlo.

Los resultados obtenidos nos indican que la manera más conveniente de determinar el tiempo y condiciones de almacenamiento de las células es evaluando el producto final (que en este caso es el biocatalizador).

5:4 Estudio del sistema libre e inmovilizado.

a) Perfil de pH

Las enzimas por ser proteínas contienen muchos grupos ionizables. El efecto del pH sobre su actividad catalítica se debe a cambios en el estado de ionización de los componentes

del sitio activo, o bién de los componentes que permiten mantener la conformación del sitio activo.

Esto da lugar a que las enzimas trabajen sobre intervalo limitado de pH y en la mayoría de los casos a un pH definido denominado "pH óptimo".

En la figura 19, se puede apreciar que el pH óptimo de la enzima penicilino amidasa contenida en células intactas de E. coli ATCC 9637, utilizando como sustrato bencilcefalosporina es 8. Este valor se encuentra dentro de los reportados para la hidrólisis de peniciliná G, en enzima libre y contenida en células intactas, los cuales muestran un pH de actividad óptimo de 7.8-8.2. (Balansingham y Warburton, 1972).

Como puede observarse en la figura 19, la enzima presenta una actividad muy semejante a pHs de 6 y 7, a pH 7.5, dicha actividad aumenta hasta llegar a su óptimo de 8, a pH de 8.5 la actividad enzimática declina apreciablemente.

Este comportamiento puede ser debido a que a pHs menores de 8, exista un decremento en la saturación de la enzima por el sustrato, causado por una disminución en su afinidad, mientras que a pHs mayores de 8, el efecto sea sobre la estabilidad de la enzima y/o sustrato (Segel, 1975).

En lo que se refiere al sistema inmovilizado en la figura

Perfil de pH del sistema soluble

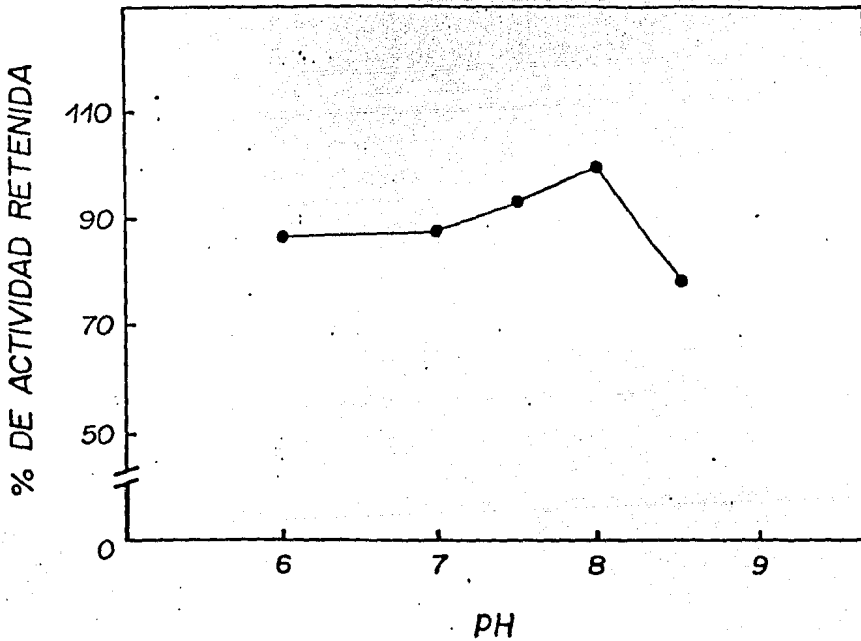


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad de penicilino amidasada contenida en células de *E. coli* ATCC 9637, utilizando como sustrato bencilcefalosporina. Temperatura 40°C, amortiguador de fosfatos 0.03 M. La actividad máxima fue tomada como 100%. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

20 , se observa que el pH óptimo es 8.5. La enzima muestra un incremento en su actividad catalítica de pH 6 a pH de 7.5, posteriormente se presenta una meseta entre valores de pH 7.5 a 8.5 y a pH 9 la actividad declina apreciablemente.

Aunque el pH óptimo de actividad enzimática parece ser 8.5, la meseta que existe entre pH 7.5 a 8.5, hace pensar que el pH óptimo en realidad se encuentra entre pH 7.5 a 8.5.

El pH óptimo reportado por Casas (1981) para el mismo sistema utilizando penicilina G como sustrato, es 8.5. Esto nos indica que el cambio de sustrato no afecta el pH óptimo del sistema inmovilizado.

El pH de trabajo en ambos casos fue 8, ya que cae dentro del pH óptimo de la enzima y muy probablemente dentro de los límites de estabilidad del sustrato.

b) Perfil de temperatura.

En la figura 21 y 22 se presentan los resultados correspondientes al comportamiento de la penicilino amidasa, con respecto a la temperatura en sistema libre e inmovilizado. Para ambos sistemas se aprecia que la actividad catalítica se incrementa conforme aumenta la temperatura de reacción, esto se debe a que un incremento en la temperatura aumenta

Perfil de pH del sistema inmovilizado

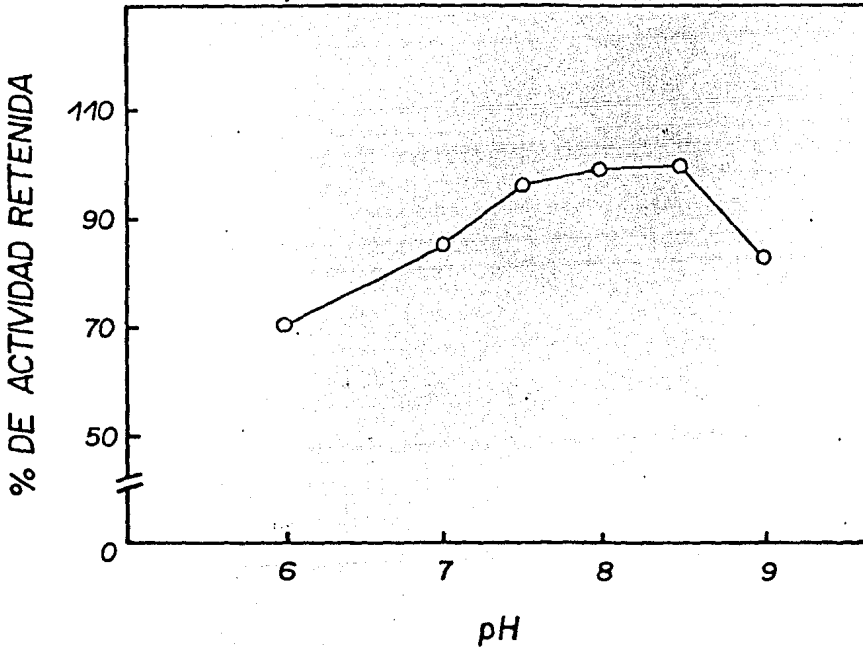


Figura 20 . Efecto del pH sobre la actividad de penicilino amidasa contenida en células de E. coli ATCC 9637, utilizando como sustrato bencilcefalosporina, temperatura 40°C, amortiguador de fosfatos 0.03 M. La actividad máxima fue tomada como 100%. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado - promedio de las determinaciones.

la energía cinética de los reactantes dando lugar a una mayor producción de colisiones enzima-sustrato, hasta llegar a un óptimo, que en este caso es 55°C para los dos sistemas. Al sobrepasar esta temperatura se aprecia una acelerada pérdida de actividad enzimática que se explica considerando que las enzimas por su naturaleza proteica, si absorben mucha energía, su estructura tridimensional puede perderse y dar lugar a su desnaturalización.

Los datos experimentales concuerdan con los estudios similares utilizando penicilina G como sustrato, en los cuales se reporta una temperatura de máxima actividad de 55°C en sistema soluble e inmovilizado (Balansingham y Warburton, 1972; Casas, 1981).

La temperatura óptima de las enzimas en ocasiones cambia por la inmovilización. En este caso, no se observó dicho efecto debido muy probablemente, a que la inmovilización de la penicilino amidasa contenida en células de E. coli en carragenina no altera la conformación química y física de dicha enzima porque no hay una interacción directa con el soporte.

La temperatura de trabajo en ambos sistemas, fue 40°C ya que como se podrá observar más adelante a temperaturas mayores, la enzima presenta baja estabilidad.

Perfil de temperatura del sistema soluble

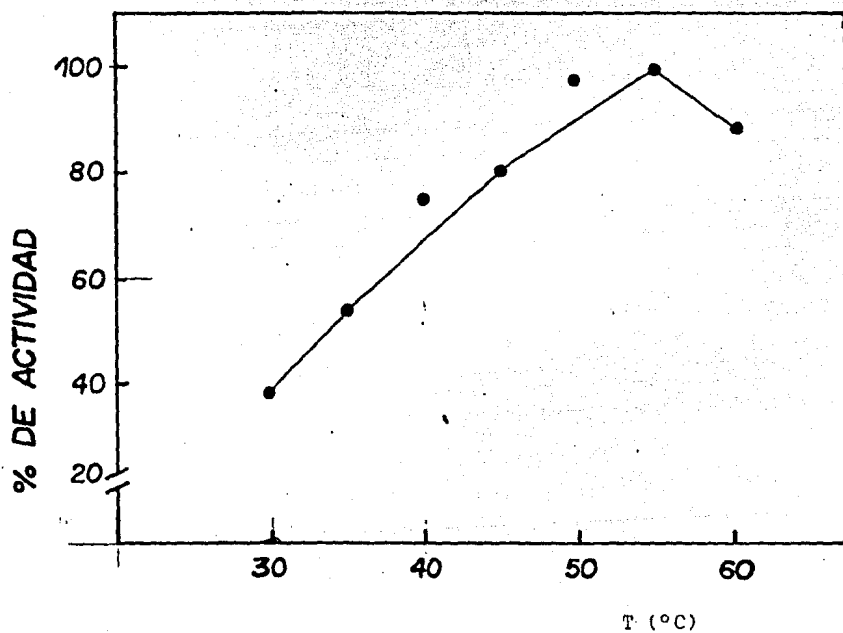


Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la actividad de penicilino amidasa contenida en células de E. coli ATCC 9637 utilizando como sustrato benzilcefalosporina, pH 8, amortiguador de fosfatos 0.03 M. La actividad máxima fue tomada como 100%. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Perfil de temperatura del sistema inmovilizado

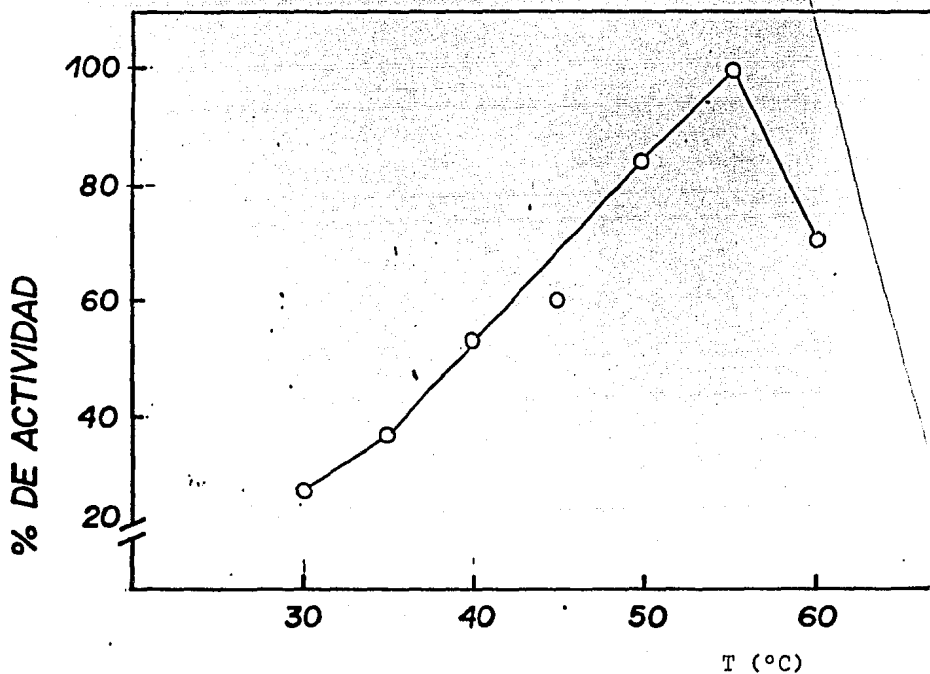


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de penicilino amidasa contenida en células de E. coli ATCC 9637 utilizando como sustrato bencil cefalosporina, pH 8 amortiguador de fosfatos 0.03 M. La actividad máxima fue tomada como 100%. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

c) Determinación de la energía de activación.

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción enzimática puede ser representado por la ecuación de Arrhenius.

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

o bien:

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A$$

donde

k = constante de la velocidad de reacción (min^{-1})

A = constante denominada factor de frecuencia (min^{-1})

E_a = energía de activación (cal/mol)

T = temperatura absoluta en $^{\circ}\text{K}$

R = constante de los gases

La energía de activación es la energía requerida para tener las moléculas en estado activo, y puede calcularse por la pendiente de la línea que se obtiene al graficar $\ln v$ contra $1/T$, en la que dicha pendiente corresponde a $-E_a/R$ (Laidler y Bunting, 1973).

Se obtuvo una energía de activación de 10,494 y 7,920 cal/mol para el sistema soluble e inmovilizado respectivamente.

Energía de activación del sistema soluble

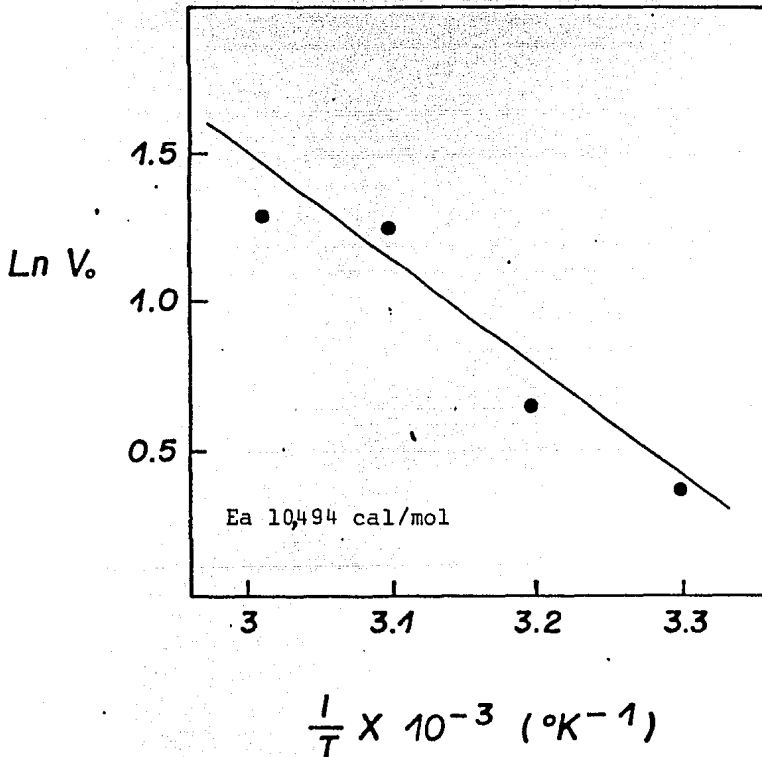


Figura 2.3. Energía de activación para la hidrólisis de bencilcefalosporina con penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637 pH 8, amortiguador de fosfatos 0.03. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Energía de activación del sistema inmovilizado

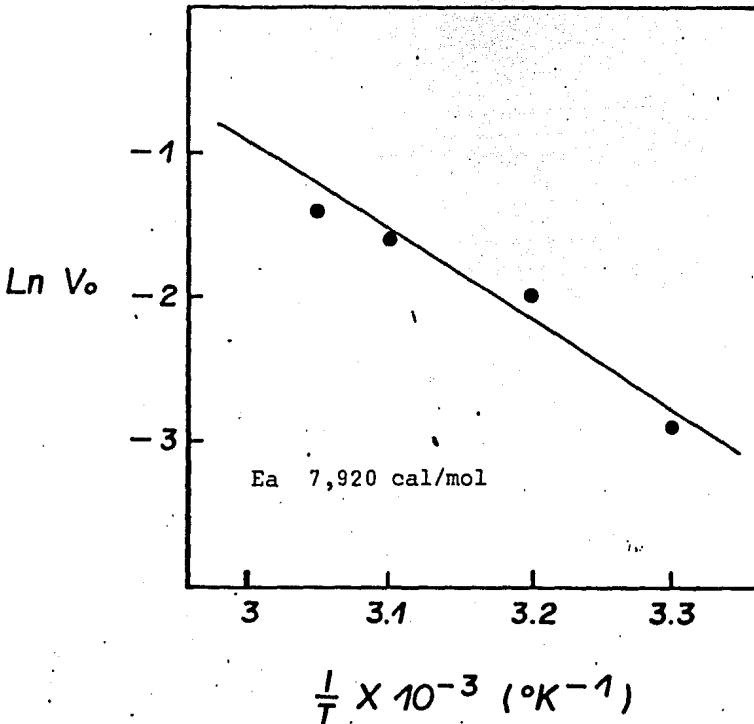


Figura 24. Energía de activación para la hidrólisis de bencilcefalosporina con penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637, pH8, amortiguador de fosfatos 0.03 M. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Los resultados aparecen en las figuras 23 y 24, en las cuales se observa que un aumento de la temperatura de reacción se ve reflejado en el incremento de la tasa de reacción.

Savitskaya y Mys (1975), encontraron una energía de activación de 11,400 cal/mol a pH 7.5 para enzima pura, utilizando como sustrato penicilina G. Al comparar este valor con el obtenido en el presente estudio en sistema libre, se observa que existe una pequeña diferencia, lo cual puede ser debido a las diferentes condiciones en las determinaciones. Sin embargo, si se considera que en un caso se está hablando de enzima soluble con mínimos problemas difusionales y para el otro de una enzima contenida en células intactas con problemas difusionales, se podría suponer que ésto fuera el motivo en la diferencia de estos valores.

En lo referente a la energía de activación del sistema inmovilizado, se observa que el valor de este último, es menor que el correspondiente al sistema libre. Este tipo de comportamiento es característico en sistemas en los que existen restricciones difusionales internas, lo que es muy lógico de suceder en enzimas inmovilizadas por atrapamiento en geles.

d) Termoestabilidad.

Los resultados de termoestabilidad del sistema soluble e inmovilizado se presentan en las figuras 25 y 26. En ellas se

aprecia que en las 3 temperaturas probadas la actividad enzimática decae con respecto al tiempo de incubación. En ambos sistemas se observa que el tiempo en que la enzima llega a la mitad de su actividad inicial (tiempo de vida media, $t_{1/2}$) disminuye conforme se incrementa la temperatura.

En el sistema soluble, a temperatura de 40°C después de 38 hrs de incubación la enzima aún no llega a su $t_{1/2}$, a 50°C su $t_{1/2}$ fué de 6 hrs y a 55°C de 0.5 hrs.

Con respecto al sistema inmovilizado, su comportamiento es muy similar al del sistema soluble, con la diferencia de que en este caso el $t_{1/2}$ es mayor. Se observa que a la temperatura de 40°C después de 96 hrs de incubación se conserva casi el 80% de la actividad inicial, a 50°C el $t_{1/2}$ es de 24 hrs y a 55°C de 0.96 hrs.

En las figuras 27 y 28 se puede observar claramente como el sistema inmovilizado es más termoestable que el sistema soluble.

Los resultados aquí obtenidos son lógicos, ya que las enzimas por su naturaleza proteica se desnaturalizan con el incremento de la temperatura y la mayoría de ellas se inactivan a temperaturas comprendidas entre 55 y 60°C.

Termoestabilidad del sistema soluble.

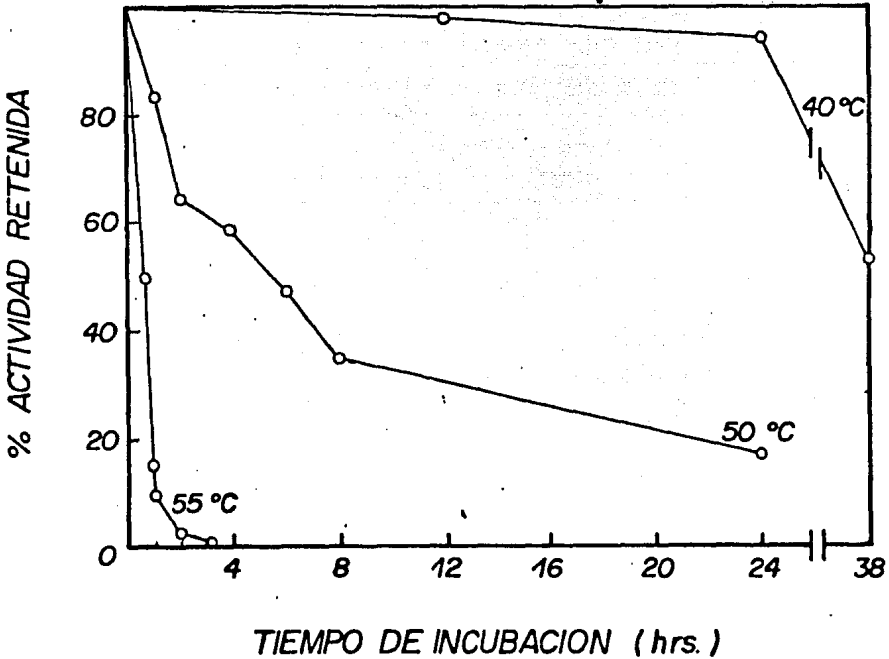


Figura 25. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637. Las células se incubaron a temperaturas de 40, 50 y 55°C, posteriormente se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinaba actividad mediante lo establecido en la sección de materiales y métodos. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Termoestabilidad del sistema inmovilizado

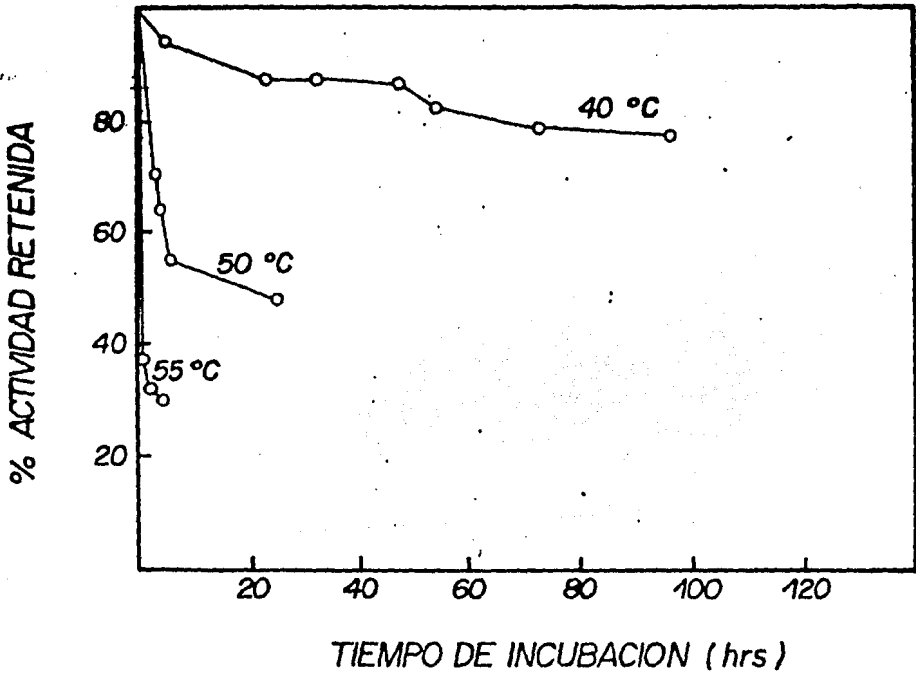


Figura 26. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637 inmovilizados en carragenina. El biocatalizador se incubó a temperaturas de 40, 50 y 55°C, posteriormente se tomaron muestras a diferentes tiempos y se les determinó actividad mediante lo establecido en la sección de materiales y métodos. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Termoestabilidad a 50°C
(gráfica comparativa)

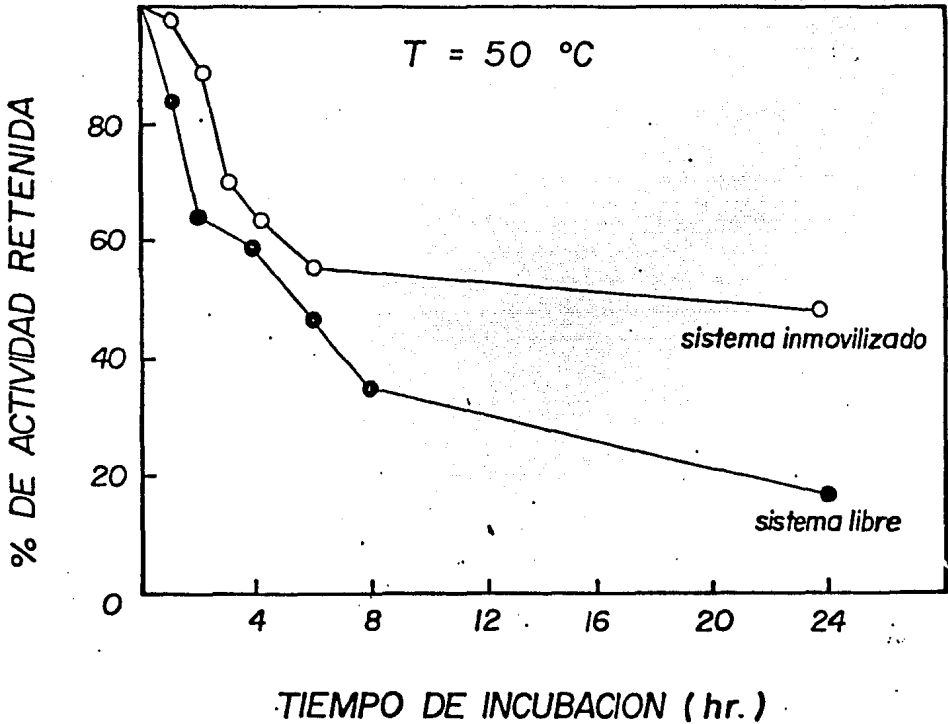


Figura 27. Efecto de la temperatura de 50°C sobre la estabilidad del sistema soluble e inmobilizado de la enzima penicilino amidasa contenida en E. coli ATCC 9637. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Termoestabilidad a 55°C
(gráfica comparativa)

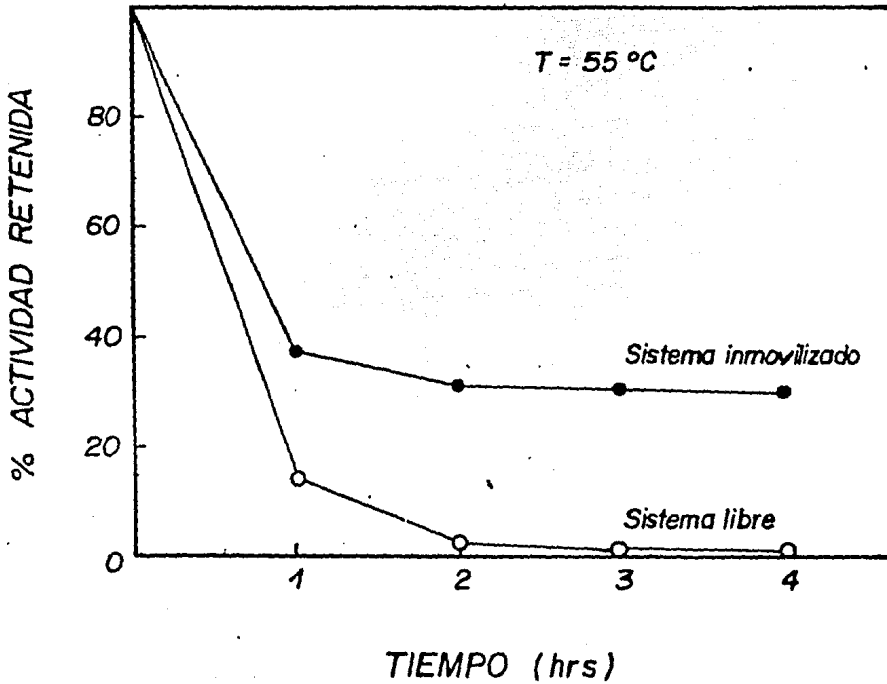


Figura 28. Efecto de la temperatura de 55°C sobre la estabilidad del sistema libre e inmovilizado de la enzima penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

En el caso particular de la penicilino amidasa, se de terminó que a su temperatura óptima de 55°C su estabilidad es muy baja, lo cual nos indica que la llamada "temperatura óptima" de la enzima, debe considerarse como una característica operacional, ya que a temperaturas altas (en este caso su óptima) existe un decremento de su actividad, resultado de la disminución en la cantidad de la enzima activa total, ya que como se pudo constatar, la desnaturalización enzimática es función del tiempo y temperatura.

Los resultados de éste estudio, presentan concordancia con lo que se reporta en la literatura, ya que la enzima la manejan a temperaturas comprendidas entre 35 y 40°C (Godfrey, 1983).

Ahora bien, es claro que el proceso de inmovilización incrementa considerablemente la estabilidad térmica del sistema, esto implica que el proceso de inmovilización confiere a la enzima cierta estabilización, además el soporte en sí da protección a la enzima.

e) Efecto de la concentración de sustrato.

Los resultados del estudio cinético de la enzima penicilino amidasa del sistema soluble e inmovilizado, se muestran en las figuras 29 y 30, en las cuales se realiza la representación de Lineweaver-Burk para la obtención de la constante de

Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima. Sistema soluble (Lineawaver-Burk).

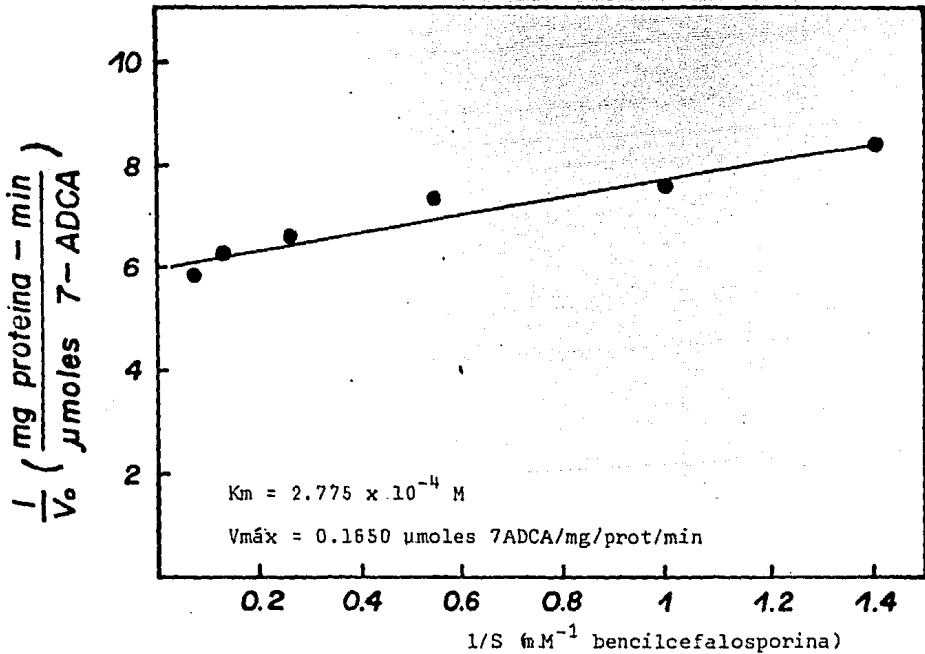


Figura 29. Efecto de la concentración de bencilcefalosporina sobre la actividad de la penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637, pH 8, en amortiguador de fosfatos 0.03 M. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

Michaelis-Mentin (K_m) y de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Los resultados obtenidos son $K_m = 2.775 \times 10^{-4} M$ y $4.38 \times 10^{-3} M$ para sistema libre e inmovilizado respectivamente, y en el mismo orden una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.1650 μ moles de 7ADCA/mg protefina/min y 0.107 μ moles 7ADCA/ g biocatalizador p.h./min. Los valores reportados en la literatura para células intactas de E. coli utilizando como sustrato penicilina G son muy variados, se encuentran entre 1.4×10^{-4} a $3 \times 10^{-2} M$. Tomando en consideración que el K_m es un índice de afinidad de la enzima por un sustrato y que dicho valor entre más pequeño, nos indica mayor afinidad de la enzima por el sustrato, se puede decir que el valor obtenido en este trabajo ($2.775 \times 10^{-4} M$) es bueno, ya que se encuentra dentro del orden de magnitud bajo de los valores reportados en la literatura. Es importante mencionar, que aún cuando la bencilcefalosporina presenta diferencias en su estructura con la penicilina G, esto no parece afectar la afinidad de la enzima por dicho sustrato, lo que implica que lo importante para la afinidad de la penicilino amidasa de E. coli es la cadena lateral ácido fenilacético.

Con respecto a las $V_{m\acute{a}x}$ reportadas para células intactas de E. coli utilizando penicilina G como sustrato son pocos. Cole y Savidge (1975) reportan un valor de 7.1 μ moles 6APA/mg

Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad del sistema inmovilizado (Lineawaver-Burk).

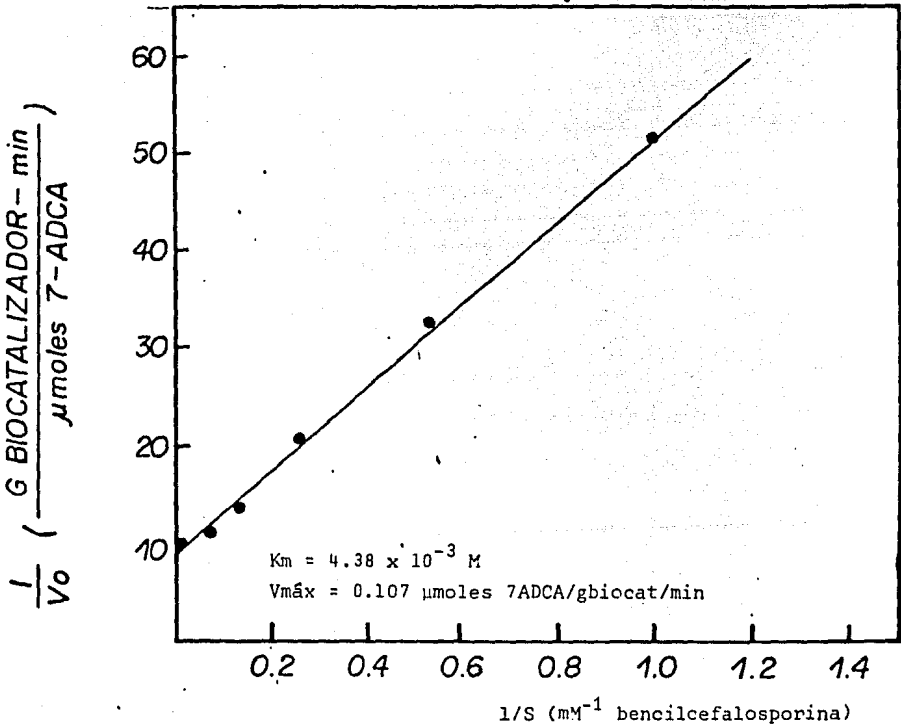


Figura 30. Efecto de la concentración de bencilcefalosporina sobre la actividad de la penicilino amidasa contenida en *E. coli* ATCC 9637, pH 8 en amortiguador de fosfatos 0.03 M. El experimento se realizó por duplicado, en la gráfica se muestra el resultado promedio de las determinaciones.

proteína/min para enzima de E. coli NCIB8743A, Cole (1969) de 1.228 y 1.156 μ moles de 6APA/mg prot/min y Sandoval (1980), de 0.034 μ moles/mg proteína/min en ambos casos para células intactas de E. coli. De estos valores, los más cercanos al obtenido en esta investigación son los de Cole y Sandoval., seguramente porque estos trabajos se realizaron también con células intactas.

En lo que respecta al sistema inmovilizado, los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ reportados en la literatura dependen del método empleado. Chibata (1980), reporta que los sistemas inmovilizados por atrapamiento incrementan su K_m y su $V_{m\acute{a}x}$ disminuye en comparación con el sistema soluble y esto esencialmente por los problemas de difusión de sustrato y productos. En nuestro caso, se presentó dicho efecto ya que el K_m de $2.7 \times 10^{-4}M$ en sistema soluble se incrementó a $4.7 \times 10^{-3}M$ en sistema inmovilizado. La $V_{m\acute{a}x}$ de 0.1650 μ moles 7ADCA/mg proteína/min disminuyó a 0.00427 μ moles /mg proteína inmov/min (0.107 μ moles 7ADCA/g de bioc. ph/min).

5:5 Estudio de la influencia del tamaño de partícula del biocatalizador y del curtido sobre la expresión de la actividad.

En el caso particular de células inmovilizadas en geles, los efectos difusionales son los modificadores más importantes del comportamiento de estos sistemas; existen dos tipos de restricciones difusionales: las internas y las externas, estas últimas pueden minimizarse por el incremento de la velocidad de flujo en el reactor, mientras que las primeras pueden reducirse por el uso de un tamaño de partícula adecuado, con una elevada área superficial por volumen de biocatalizador. Ya se ha mencionado que la geometría del biocatalizador utilizado es cúbica; una forma de incrementar su área superficial es disminuyendo el tamaño de los cubos. En base a esto se manejarán distintos tamaños de biocatalizador curtidos y sin curtir, para además observar el efecto del tratamiento de curtido.

La evaluación se realizó determinando el factor de efectividad (η), definido como:

$$\eta = \frac{\text{Actividad del sistema inmovilizado}}{\text{Actividad del sistema libre}}$$

En la tabla 16 se puede observar que la eficiencia del sistema sin curtir se incrementa a medida que el biocatalizador disminuye de tamaño, llegando a obtenerse una eficiencia de 0.7271 para el tamaño de 0.1 cm por lado. Sin embargo, el biocatalizador sin curtir tiene poca consistencia, lo cual dificulta su manejo al fraccionarse. Por esta razón el menor tamaño que pudo obtenerse fué de 0.1 cm por lado del

cubo, sin que ésto signifique que sea el óptimo.

Por otro lado, al hacer la comparación de los resultados del sistema sin curtir con el sistema curtido (tabla 17) es posible observar que el tratamiento químico afecta sensiblemente la eficiencia del biocatalizador. Dicho efecto se incrementa al disminuir el tamaño del biocatalizador. Así tenemos que para la preparación de 0.2 cm por lado de cubo la eficiencia disminuye de 0.4831 en sistema sin curtir a -- 0.286 en sistema curtido (diferencia = 0.1971); para la preparación de 0.1 cm por lado de 0.7172 a 0.4262 (diferencia = 0.2809).

De aquí se puede concluir que si bien es cierto que al disminuir el tamaño del biocatalizador el área superficial es mayor y por lo tanto la eficiencia se incrementa, existe un límite para obtener tamaños de partícula más pequeños debido a la propia naturaleza del biocatalizador y a la técnica de su fabricación.

Es claro que el tratamiento de curtido afecta a la enzima, desactivándola. Por ello la actividad específica del biocatalizador disminuye; dicho efecto se aprecia al comparar las actividades enzimáticas de los mismos tamaños de cubo, en los sistemas curtido y sin curtir. Cuando la comparación se hace dentro del mismo sistema para los diferentes tamaños lo que se observa son fenómenos difusionales, problemas meramente físicos.

Tabla 16. Eficiencia del biocatalizador sin curtir con respecto a su tamaño de partícula.

Muestra	mg de proteína	Actividad*	Tamaño		
	g de bioct. (p.h.)		cm/lado	volumen (cm ³)	
1	25.07	1.36	0.2183	0.6	0.216
2	27.88	3.01	0.4831	0.2	0.008
3	26.25	3.13	0.5024	0.2, 0.15	0.008, 0.0033
4	21.40	3.36	0.5393	0.15	0.0033
5	24.68	4.53	0.7271	0.1	0.001
	\bar{x} 25.056				

* Actividad en μ moles de 7-ADCA/mg de proteína inmovilizada

Actividad del sistema soluble = 6.23 μ moles de 7-ADCA/mg de proteína

Tabla 17. Eficiencia del biocatalizador curtido con respecto a su tamaño de partícula.

Actividad*		Tamaño	
		cm/lado	volumen (cm ³)
1.78	0.286	0.2	0.008
2.78	0.4462	0.1	0.001

*Actividad en μ moles de 7-ADCA/mg de proteína inmovilizada
 Actividad del sistema soluble = 6.23 μ moles de 7-ADCA/ mg
 de proteína.

5.6 Montaje y operación de un reactor enzimático en la hidrólisis de bencilcefalosporina.

Durante la hidrólisis de la bencilcefalosporina se produce un mol de 7-ADCA por mol de ácido fenilacético, esto da lugar a que el pH baje durante la reacción. Por esta razón es necesario agregar un álcali para mantener el pH en un valor constante de 8. Cuando el gasto de álcali no varía significativamente, se puede decir que la reacción ha llegado a su fin.

En la figura 31 se presentan 3 hidrólisis realizadas en las condiciones manejadas por Casas (1981). Dichas hidrólisis presentan un comportamiento muy similar entre ellas, y en promedio se obtuvo un porcentaje de conversión de 72.04 en 4 a 4.5 hrs de reacción. Los resultados obtenidos por Casas (1981) para la hidrólisis de penicilina G, fueron 74.03% de conversión en un tiempo de 6.8 hrs.

Se puede apreciar que los porcentajes de conversión de uno y otro sustrato son prácticamente iguales, pero los tiempos de reacción difieren considerablemente. Es importante mencionar que durante la hidrólisis de la penicilina G, el biocatalizador empleado tenía un tamaño de partícula de 0.2 a 0.25 cm por lado de cubo; en esta tesis se utilizó un biocatalizador con un tamaño de 0.1 cm por lado de cubo. Esto implica que la carga enzimática/volumen de biocatalizador es diferente para cada caso, así el - - -

reactor empleado para la hidrólisis de penicilina G, ocupó mayor cantidad de biocatalizador que el utilizado para la hidrólisis de bencilcefalosporina, por lo tanto el tiempo que tarda la solución de penicilina en pasar a través del biocatalizador empacado en el reactor, es mayor para la hidrólisis de penicilina G, y los problemas de inhibición y gradientes de pH afectarán más; esto trae como consecuencia que la eficiencia del sistema disminuya y los tiempos de reacción se incrementen.

Del comportamiento de las hidrólisis realizadas con bencilcefalosporina se puede deducir que existen problemas de inhibición; de hecho el ácido fenilacético, como ya se ha mencionado, causa inhibición competitiva y seguramente el 7-ADCA y la bencilcefalosporina causan algún tipo de inhibición.

Uno de los aspectos más importantes en la evaluación de un biocatalizador es su estabilidad operacional. En el biocatalizador empleado en este trabajo se han realizado algunas pruebas y, en los mejores resultados, el biocatalizador llegó a la mitad de su actividad inicial después de 30 hidrólisis de penicilina G.

Se debe mencionar que el objetivo principal de este trabajo fue determinar si el biocatalizador era capaz de hidrolizar bencilcefalosporina; sabiendo ésto cualquier mejora que se haga al sistema seguramente va a funcionar tanto para la hidrólisis de penicilina G, como para la bencilcefalosporina.

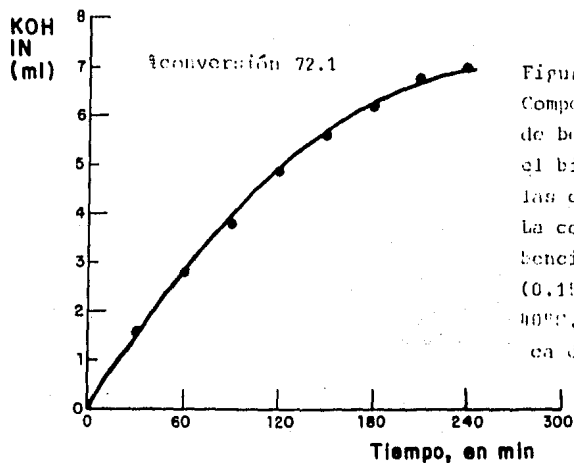
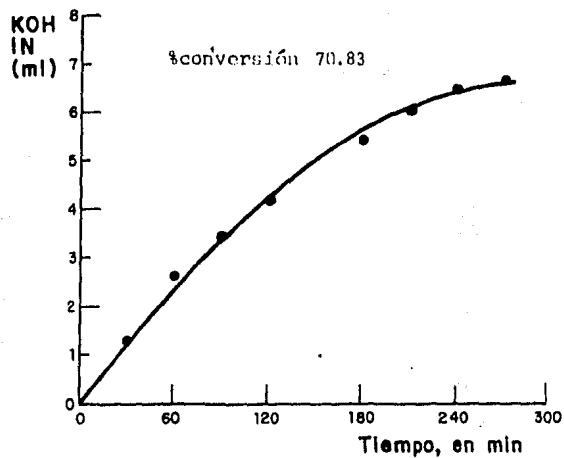
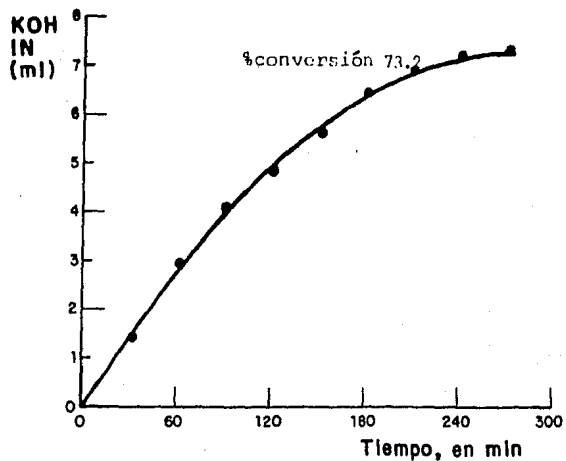


Figura 31.
Comportamiento de la hidrólisis de benzilcefalosporina con el biocatalizador de células de *E.coli*-carragenina. La concentración inicial de benzilcefalosporina fue 500 g/l (0.159M), flujo 142.5 ml/min., 40°C, pH 8, carga empacada de 5000 g de sustrato.

VI. CONCLUSIONES.

- Se demostró que las células de E. coli ATCC 9637 con actividad de penicilino amidasa libres e inmovilizadas en carragenina tienen la capacidad de hidrolizar tanto penicilina G como benzilcefalosporina en sus respectivos productos de reacción - (6-APA, 7-ADCA y ácido fenilacético).
- Se encontró que en ninguna de las condiciones de almacenamiento probadas para la enzima penicilino amidasa contenida en células intactas de E. coli, la actividad enzimática se mantiene constante, por lo que lo más conveniente es emplear células recientemente fermentadas.
- Es muy probable que la producción de la enzima sea inhibida por altas concentraciones de oxígeno en el medio.
- El pH óptimo del sistema soluble e inmovilizado es 8 y 8.5 respectivamente.
- La temperatura óptima del sistema soluble e inmovilizado es 55°C en ambos casos.
- El pH y temperatura óptimos del sistema inmovilizado coinciden con los obtenidos para la hidrólisis de penicilina G.
- La energía de activación del sistema soluble fue 10,490 cal/mol y de 7,900 cal/mol para el sistema inmovilizado.
- El proceso de inmovilización da una alta protección a la enzima ya que la estabilidad térmica a través del tiempo a las temperaturas de 40, 50 y 55°C son siempre mayores en el sistema inmovilizado

que en el sistema libre, presentándose la mayor estabilidad a través del tiempo en ambos sistemas a 40°C.

- La enzima penicilino amidasa contenida en células de E. coli ATCC 9637, libres e inmovilizadas obedece a una cinética de Michaelis-Menten respecto a bencilcefalosporina. Los valores de K_m obtenidos fueron $2.775 \times 10^{-4} M$ y de $4.38 \times 10^{-3} M$ para sistema soluble e inmovilizado respectivamente y en el mismo orden una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.165 μ moles de 7-ADCA/mg de proteína/min y 0.107 μ moles de 7-ADCA/g de biocatalizador p.h./min.
- Es evidente que el biocatalizador presenta serios problemas difusionales y esto se pone de manifiesto en la disminución de la energía de activación e incremento de su K_m con respecto al sistema soluble.
- El porciento de conversión de la bencilcefalosporina a 7-ADCA fue de 72.04 en un tiempo de 4 a 4.5 hrs de reacción. Para la conversión de penicilina G a 6-APA empleando el mismo sistema y las mismas condiciones de reacción el porciento de conversión fue de 74.03 en un tiempo de 6 a 8 horas.

VII. RECOMENDACIONES

- Con el objetivo de disminuir los problemas difusionales en el biocatalizador se recomienda hacer estudios en cuanto a su forma, a su tamaño y a la técnica de su elaboración.
- Hacer estudios más profundos acerca de la influencia de la concentración de oxígeno en la producción de la penicilino amidasa en E. coli ATCC 9637.
- Tratar de obtener un biocatalizador con una actividad enzimática mayor, lo cual puede lograrse usando una cepa hiperproductora de la enzima.
- Realizar estudios para determinar si la bencilcefalosporina y 7-ADCA causan algún tipo de inhibición en la enzima, y si es así obtener los valores numéricos de dichas constantes y de esta forma obtener la ecuación matemática que rige el comportamiento de la reacción de hidrólisis de la bencilcefalosporina.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abbot B.J. Preparation of pharmaceutical compound by immobilized enzymes and cells. *Adv. Microbiol.* 20: 203-257 (1976).
- Abrahm E.P. y Newton G.G.F. *Biochem. J.* 79: 377 (1961).
- Aviron V. Penicilline amidse en les enzymes production utilizations industrilles. Collection dirigee. Pierre Monsan (editor) (1982).
- Badui D. Química de los Alimentos. 1a. edición. Alhambra (1981).
- Balansingham K., Warburton D., Dunnill P., y Lilly M.D. *Biochem. Biophys. Acta* 276: 250-256 (1972).
- Banyu. Pharmaceutical Co. Ltd. Patente Japonesa No. J5-2038-092 (1977).
- Bautista, D., Diseño, construcción y aplicación de un electrodo para la detección de penicilinas. Tesis. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla (1983).
- Bayer, A.G. Patente Alemana No. 409569 (1975).
- Bayer, A.C. Patente Alemana No. 2528622 (1977).
- Belmar C. Revisión bibliográfica, análisis y evaluación sobre la aplicación de los criterios de escalamiento en fermentaciones aerobias. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. (1984).
- Casas T.L. Producción del ácido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de penicilina G. Tesis. I.I.B.M. U.N.A.M. (1981).
- Chemical Economics Handbook. Producción y Costos. Edición actualizada a 1984.
- Chibata I., Tosa T., y Sato. *Applied Microbiol.* 27. 878-885 (1974).
- Chibata I. (editor). *Immobilized Enzymes*. John Wiley & Sons. N.Y.
- Choi W.G., Lee S.B. y Ryu D.D.Y. Cephalalexin synthesis by partially purified and immobilized enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 361-371 (1981).

- Claridge C.A., Gourevitch A. y Lein J. Bacterial penicillin amidase. *Nature* 187: 237-238 (1960).
- Cole M. Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of Escherichia coli. *Biochem. J.* 115: 733-739 (1969 a).
- Cole M. Penicillins and other acrylamino compounds synthesized by the cell-bound penicillin acylase of Escherichia coli. *Biochem. J.* 115: 747-756 (1969).
- Cooper R.D.G. y Spry D.O. Rearrangements of cephalosporins and penicillins. En cephalosporin and Penicillins. Chemistry and Biology. E.H. Flynn (editor). Academic N.Y. pp. 183-254 (1973).
- De Main A.L., Walton B., Newkirk J.F. y Miller I.M. *Nature* (London) 199: 909 (1963).
- Flyn E.H. (editor). En Cephalosporin and Penicillins. Chemistry and Biology. Academic N.Y. (1972).
- Fleming I.D., Turner M.K. y Napier E.J. Patente Británica No. 1 473 100. (1977).
- Fujii T., Matsumoto K. y Watanabe T. Enzymatic synthesis of cephalixin. *Proc. Biochem.* 11: 21-24 (1976).
- Godfrey T. y Reichelt J. Industrial Enzymology the Nature Press USA (1983).
- Goldstein L. Methods in Enzymology (ed. Mosbach K.). Academic Press NY. 44: 397-443 (1976).
- Hamill y Robert L.J. of Chromatography Library. 15: 76-77 (1978).
- Hamilton-Miller T.M.J. Penicillinacilase. *Bacteriology Review.* 30: (4) 761-766 (1966).
- Hamilton-Miller T.M.T., Newton G.G.F. y Abraham E.P. *Biochem. J.* 116: 371 (1970).
- Huang H.T., Seto T.A. y Shull G.M. Distribution and substrate specificity of benzylpenicillin acylase. *Appl. Microbiol.* 11: 1-6 (1963).
- Klein J. y Eng. H. Immobilization of microbial cells in epoxy carrier systems. *Biotechnol. Lett.* 1: 171-176 (1979).

- Kutzbach C. y Rauenbusch E. Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from Escherichi coli. ATCC 11105. Hoppe Seler's Z. Physiol. Chem. 354: 45-54 (1974).
- Lagerlöf E., Nathorst-Westfeld L., Ekström B. y Sjöberg, B. Production of 6-aminopenicillanic acid with immobilized Escherichia coli acylase. En Methods in Enzymology. Vol. 44. K. Mosbach (editor). Academic. N.Y. pp. 759-768.
- Lehinger A.L. Biochemistry. 2a. edición. Worth Publishers Inc., N.Y. (1975).
- Laidlel R. y Bunting S. The Chemical Kinetics of Enzyme Action. 2a. edición. Clarendon Press. Oxford (1973).
- Linko P. y Linkari J. (editores). Food Process Engineering. Vol. 2. Appl. Sci. Publ. London (1979).
- Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 5a. edición. El Ateneo (1979).
- López L. Síntesis enzimática de ampicilina. Tesis. Facultad de Química. UNAM (1982).
- Lowry O.H., Rosebrough J.N., Farr L.A. y Randall J.R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological Chemistry 193: 265-272 (1951).
- Marconi W. y F. Morisi. Applied Biochemistry and Bioengineering Enzyme Technology. Academic Press. Vol. 2 (1979).
- Martinek K., Mozhaeu V.U. y Berezin I.V. Enzyme Engineering Wingars L.B. (editor). Plenum Press. N.Y. Vol. 3, pp. 54 (1978).
- Meiji Seika Co. Ltd. Patente Japonesa No. J5-3094-093. (1978).
- Nara T., Okachi R. y Misawa H. Journal of Antibiotics 24: 321 (1971).
- Pelczar M.J. y Reid R.D. Microbiología. Traducido de la 2a. edición en inglés de Microbiology. McGraw-Hill. U.S.A. (1958).
- Romero I.G. Caracterización e inmovilización de naranginasa en fibras de henequén. Tesis. Universidad Iberoamericana (1983).
- Ryu D.Y., Bruno C.F., Lee B.K. y Venkatasubramanian K. - - Microbial penicillin amidohydrolase and the performance of a continuous enzyme reactor system. En: Fermentation Technology Today. G. Terui (editor). Society of Fermentation Technology Tokyo, pp. 307. (1972).

- Sandoval H. Cinética que rige la reacción de hidrólisis de la penicilina G, por penicilino amidasa. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM (1980).
- Sassiver M.L. y Lewis A. *Advances Appl. Microbiol.* 13: 163-236 (1970).
- Sato T., Tosa T., y Chibata I. Continuous production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by immobilized microbial cells. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2: 153-160 (1976).
- Savidge T.A. y Cole M. Penicillin acylase (bacterial). En *Methods in Enzymology*, vol. 43. J. Hash (editor). Academic N.Y. pp. 705-721 (1975).
- Savidge T.A. En *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Vandamme (editor). N.Y. pp. 172-224 (1984).
- Saviskaya M., Mys P.S., Levitov M.B. y Shellenberg E.H. Application of immobilized microbial acylase for the synthesis of 6-APA. *Advances in Enzyme Engineering* 1 (1975).
- Segel I.H. *Enzyme Kinetics*. edition. John Wiley & Sons, N.Y. (1975).
- Self D.A., Kay G., y Lilly M.D. *Biotechnology and Bioengineering* 11: 337-348 (1969).
- Shibuya Y., Matusumoto K., y Fujii T. Insolation and properties of 7B (-4-carboxybutamido) cephalosporanic acid acylase producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 45: 1561-1567 (1981).
- Shimizu M., Okachi R., Kimura K. y Nara T. *Agricultural and Biological Chemistry* 39: 1655 (1977).
- Sjöberg G., Narhorst-Wesfelt L. y Ortengren B. *Acta Chemica Scandinavica* 21: 547 (1967).
- Vandamme, E.J. Penicillin acylases and β -lactamases. En *Economic Microbiology*. Vol. 5. A.H. Rose (editor). Academic. N.Y. pp. 467-522 (1981).
- Vandamme E.J. y Voets J.P. Microbial penicillin acylase. *Adv. Appl. Microbiol.* 17: 311-369 (1974).
- Van't Riet K., Review of measuring methods and results in non viscous gas liquid mass transfer in stirred vassels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 18: (3), 357-363 (1979).

- Venkatasubramanian (editor). Immobilized Microbial Cells. American Chemical Society/Washington D.C., pp. 187-202 (1979).
- Yamamoto K., Sato T., Tosa y Chibata. Biotechnol. Bioeng. 16: 1589-1599 (1974a).
- Yamamoto K., Sato T., Tosa T., y Chibata I. Biotechnol. Bioeng. 16: 1601-1610 (1974b).
- Yamamoto K., Tosa, T., Yamashita K. y Chibata I. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 169-183 (1976).
- Walton R.B. Search for microorganisms producing cephalosporin C. amidase. Dev. Ind. Microbiol. 5: 349-353 (1964).
- Wang D.I.C. Fermentation & Enzyme Technology. John Wiley & Sons. N.Y. (1979). (edición).
- Warburton D., Balasingham K., Dunill P. y Lilly M.D. Biochem. Biophys. Acta. 284: 278-284 (1972).