



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20078

50 p
tables
graphs
diagrams

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA

PROYECTO ONUDI No. DP/RLA/83/003

**PRODUCCION INDUSTRIAL DE PENICILINO AMIDASA Y SU
USO PARA LA OBTENCION DE ACIDO 6 AMINO
PENICILANICO (6-APA)**

**INFORME FINAL
(ACTIVIDADES C Y D)**

**Presentado por: Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Biotecnología**

**Contrato ONUDI No.91/100 G
del 7 de Mayo 1991**

Santafé de Bogotá, D.C. 28 de Abril de 1991

21/7/92

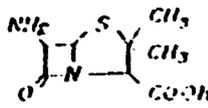
ACTIVIDAD C

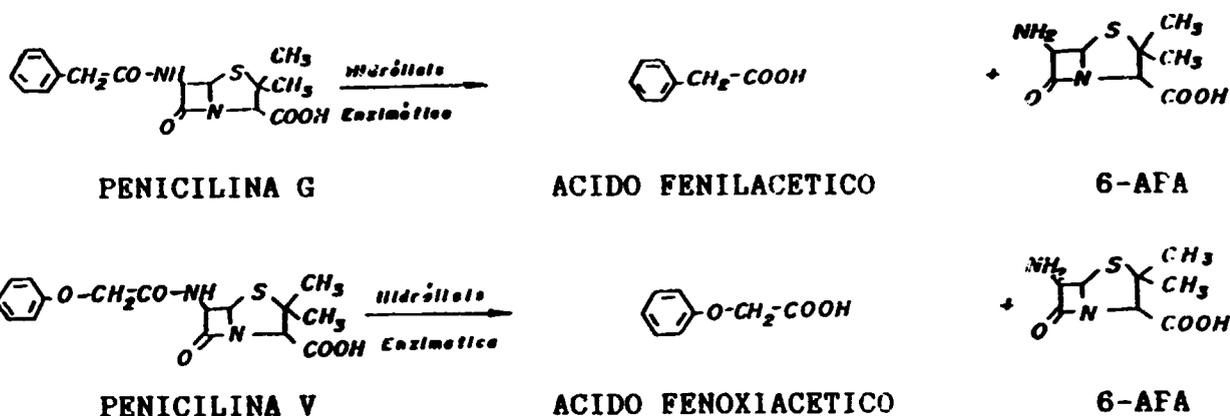
ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD TÉCNICA Y ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE 6-APA

El presente informe forma parte del estudio de prefactibilidad técnico-económica, con el cual el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, cumple con el compromiso de la Actividad C del contrato ONUDI No.91/100G. Este trabajo fue entregado a VECOL S.A. para su complementación, y comprende los siguientes tópicos:

- Generalidades: se describieron diferentes aspectos relacionados con la obtención del Acido 6-Aminopenicilámico (6-APA).
- Estudio de mercado: en razón a que no fue suministrada información de consumos para México y Cuba, se optó por evaluar el proyecto para las condiciones de Colombia. Se determinó la demanda actual y futura del 6-APA con base en los datos de importaciones y producción nacional, disponibles en el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE) y en el Instituto Colombiano de Comercio Exterior (INCOMEX).
- Localización y tamaño: la planta en estudio se localizara en las actuales instalaciones de VECOL S.A., en Santafé de Bogotá. El tamaño óptimo de la planta se determinó con base en los resultados del estudio de mercado.
- Estudio de Ingeniería: se seleccionó el proceso convencional para producir el 6-APA por vía enzimática y posteriormente se realizó el balance de materia correspondiente, a partir del cual se dimensionaron los equipos principales de la planta.
- Estudio Económico: se realizó el estudio económico del proyecto, dentro del cual se determinó la inversión total de capital requerido para la puesta en marcha de la planta y se hizo la evaluación económica del proyecto.

1. INFORMACION TECNICA DEL 6-APA

- Estructura Química: 
- Fórmula molecular : C₈H₁₂O₃N₂S
- Peso molecular : 216.4
- Obtención : es obtenido actualmente por hidrólisis enzimática de la Penicilina G o la Penicilina V, según la siguiente reacción:



La hidrólisis se realiza por la enzima penicilino acilasa o penicilino amidasa, producida por bacterias como la Escherichia coli.

- Aplicaciones: el 6-APA es usado en grandes cantidades para la producción de un gran número de penicilinas semisintéticas. Dentro de estas, las únicas que hasta el momento han presentado un valor clínico suficiente como para merecer la producción y distribución en gran escala, son : Amoxicilina, Ampicilina, Carbenicilina, Cloxacilina, Dicloxacilina, Hetacilina, Meticilina, Nafcicilina, Oxacilina, Feneticilina, Ticarcilina, Axidocilina, Azolocilina, Bacampicilina, Ciclacilina, Epicilina, Flucloxacilina, Mecilinam, Netamacilina, Mezlocilina, Pirbenicilina, Pivampicilina, Pivmecilinamo, Propicilina, Sulbenicilina y Talampicilina.
- Especificaciones comerciales: el 6-APA debe cumplir con las siguientes especificaciones:
 - . Apariencia : polvo cristalino blanco
 - . Humedad : 0.3% máximo.
 - . Rotación óptica : +280 a +300°
 - . Metales pesados: 20 ppm máximo

- . Solventes residuales: menos del 1%
- . Contenido de ácido fenilacético: menos del 0.7%
- . pH: 3.5 a 4.0
- . Densidad : 0.3 a 0.4 g/ml.
- . Estabilidad: almacenado bajo 15°C, protegido de humedad y luz, mantiene su calidad por 2 años.
- . Presentación: de 25 a 40 Kg empacados en una bolsa doble de polietileno.

2. ESTUDIO DE MERCADO

En Colombia solo se inició el consumo de 6-APA en 1987, al instalarse en la Ciudad de Barranquilla la Empresa Multinacional Andina SIFA S.A. Con el propósito de disponer de una serie histórica más amplia, se optó por estimar el consumo potencial de 6-APA teniendo en cuenta el consumo dese 1975 de penicilinas derivadas de este ácido.

2.1 FUENTES DE INFORMACION

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron las siguientes fuentes de información:

- Anuarios de Comercio Exterior (DANE e INCOMEX): de allí se extrajeron los datos de importaciones de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos" según su país de origen, destino e importadores directos, para el período comprendido entre 1975 y 1988.
- Anuarios de Industria Manufacturera (DANE): de estos se tomaron los datos de producción nacional de Ampicilina.
- Licencias de Importación (INCOMEX) : se consultaron las licencias clasificadas bajo la posición arancelaria de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos", con el fin de determinar la cantidad exacta importada de cada una de las penicilinas semisintéticas en un determinado período,

2.2 DEMANDA

La demanda de 6-APA se evaluó a través de las penicilinas semisintéticas elaboradas a partir de él y consumidas nacionalmente. Estas penicilinas son : Bacampicilina, Cloxacilina, Ticarcilina, Flucloxacilina, Amoxicilina, Oxacilina y Ampicilina, las cuales se importaban en su totalidad hasta 1986; de 1987 en adelante se tomo, además de las importaciones, la producción local. El 95% de las penicilinas semisintéticas consumidas en Colombia, corresponde a la AMPICILINA que se empezó a producir en el país a partir de 1987.

2.3 ANALISIS DE LA DEMANDA

En la Tabla 1 se muestran los kilogramos netos importados de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos" desde 1975 hasta 1991. Con el objetivo de visualizar mejor estos datos, en la Figura 1 aparecen los kilogramos netos importados, vs. Año. En esta gráfica se observa cómo en 1987 las importaciones se reducen en un 40%, debido a la producción nacional de ampicilina de 21511 kilogramos en 1987 y 41504 kilogramos en 1988.

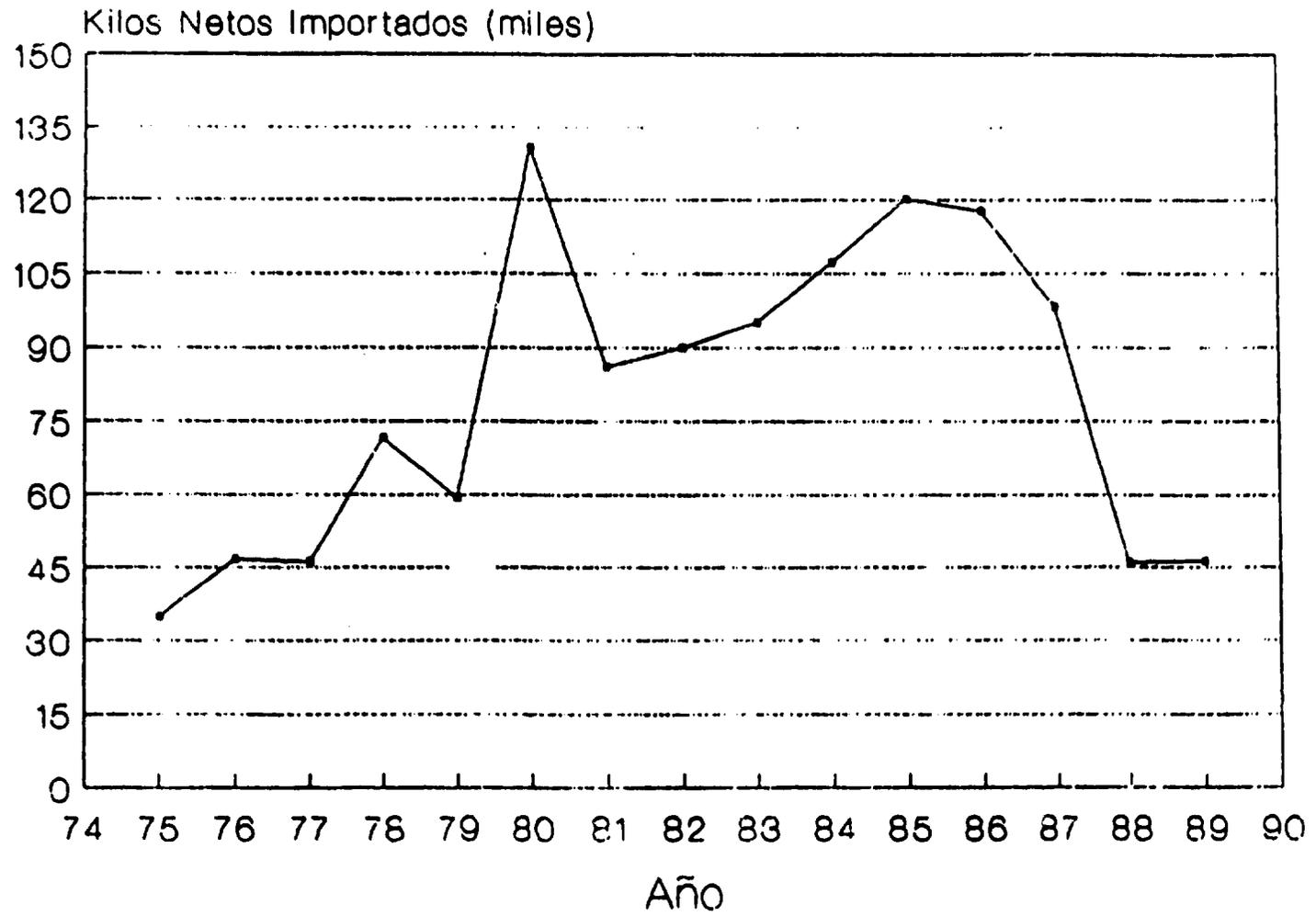
TABLA 1. CANTIDAD IMPORTADA DE "PENICILINAS, SUS SALES, DERIVADOS Y COMPUESTOS", DESDE 1975 HASTA 1988.

Año	Cantidad Importada en Kg.
1975	35011
1976	46757
1977	46123
1978	71708
1979	59398
1980	130884
1981	86100
1982	89988
1983	95035
1984	107240
1985	120183
1986	117819
1987	98202
1988	46117
1989*	38400
1990*	-----
1991*	19025

Fuente : Anuarios de Comercio Exterior del DANE (18)

* Datos correspondientes a Importaciones del 6-APA.

FIGURA 1
IMPORTACIONES DE PENICILINAS
SUS SALES, DERIVADOS Y COMPUESTOS



Una revisión de las importaciones según el país de origen y el lugar de destino de las "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos", permite observar que en Bogotá se consumen más del 80% del total importado durante todos los años.

De la información extraída de las licencias de importación, se estableció que el 52% aproximadamente del total importado de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos", corresponde a las penicilinas derivadas del 6-APA.

La producción local de ampicilina en los últimos años fué:

PRODUCCION EN Kg DE AMPICILINAS EN COLOMBIA

Producto/ año	1987	1988	1989	1990
Ampicilina anhidra	-----	2800	2500	3000
Ampicilina trihidrato	6275	20950	18.180	25000

2.4 PROYECCION DE LA DEMANDA

Para determinar la demanda futura de ácido 6-Aminopenicilánico (6-APA) en Colombia se procedió así :

- Con base en los datos extraídos del DANE, tanto de importaciones como de producción nacional, se halló la proyección de la demanda con el fin de determinar los requerimientos de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos" para el período comprendido entre 1992 y el año 2002.

Dicha proyección fue destinada para dos casos:

Primero.- suponiendo que la línea de ajuste es una línea recta de la forma $y = a + bt$.

Segundo.- suponiendo que es una curva exponencial del tipo $y = ab^t$.

El mejor ajuste por coeficiente de correlación resulto ser el lineal. En la Figura 2 se observa que efectivamente la línea recta proporciona un mejor ajuste, pues la curva exponencial se aleja de la tendencia a partir del año 1988.

Los resultados consignados en la Tabla 2 muestran la demanda futura de penicilinas en general.

- Por otra parte, se consultaron para dos años cada una de las respectivas licencias de importación, en las cuales se especifica la penicilina importada lo mismo que su cantidad.

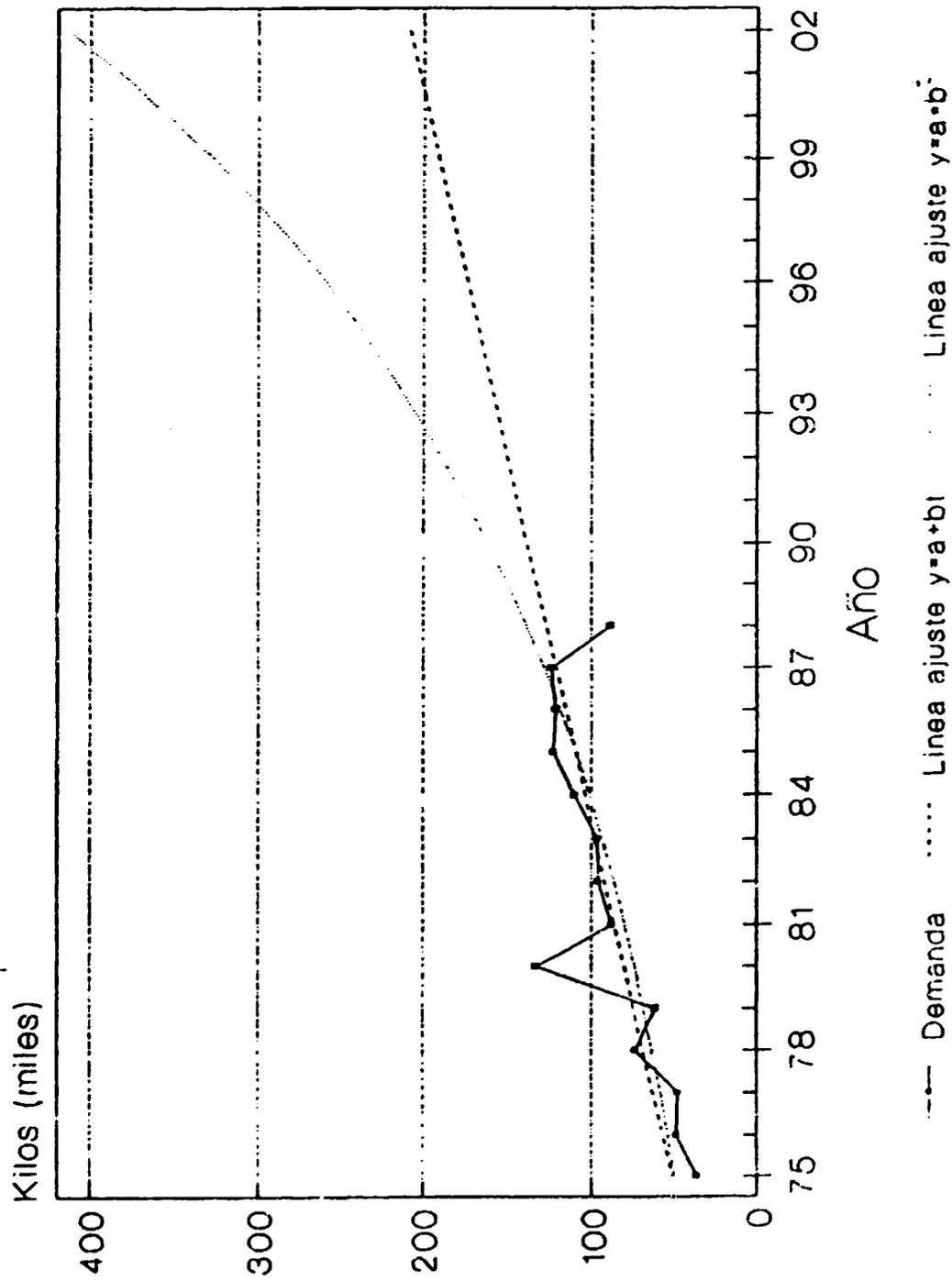
TABLA 2. PROYECCION DE LA DEMANDA DE "PENICILINAS", SUS SALES, DERIVADOS Y COMPUESTOS.

Año	Cantidad Consumida (Kg.)	Año	Cantidad Proyectada (Kg.)
1975	37011	1989	132810
1976	48757	1990	138617
1977	48123	1991	144425
1978	73708	1992	150233
1979	61398	1993	156040
1980	133074	1994	161848
1981	88071	1995	167655
1982	95923	1996	173463
1983	96458	1997	179271
1984	110359	1998	185078
1985	122821	1999	190886
1986	121393	2000	196694
1987	123883	2001	202501
1988	88554	2002	208309

Cantidad consumida = importaciones + producción nacional.

De la información contenida en las licencias de importación (23), se obtuvieron los kilogramos importados de cada una de las siguientes penicilinas semisintéticas: Ampicilina, Oxacilina, Amoxicilina, Flucloxacilina, Ticarcilina, Cloxacilina y Bacampicilina, que son de acuerdo con los datos reportados, las que se consumen en Colombia. Para el caso de la Ampicilina, se sumó la cantidad importada a la cantidad producida ese año.

FIGURA 2
PROYECCION DE LA DEMANDA



Conocida la cantidad consumida (importaciones + producción nacional) de penicilinas en general, se calculó el porcentaje de cada una de las penicilinas semisintéticas consumidas durante los dos años, para los cuales se consultaron las licencias de importación.

Los porcentajes obtenidos no variaron significativamente en los dos años consultados. En promedio dichos porcentajes con respecto al total de penicilinas y sus derivados, son los siguientes:

Bancampicilina	0.023%
Cloxacilina	0.090%
Ticarcilina	0.034%
Flucloxacilina	0.407%
Amoxicilina Sódica	0.086%
Oxacilina Sódica	1.66 %
Ampicilina Sódica	49.748%

- Una vez conocidas las penicilinas semisintéticas consumidas en Colombia, se determina exactamente por la reacción, la cantidad de 6-APA necesaria para producir una mole de cada una de ellas. Esta cantidad expresada en porcentaje se presenta así:

Bancampicilina	43.1%
Cloxacilina	49.6%
Ticarcilina	56.3%
Flucloxacilina	47.6%
Amoxicilina Sódica	55.8%
Oxacilina Sódica	49.0 %
Ampicilina Sódica	58.2%

- Finalmente se multiplica cada una de las cantidades requeridas de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos" (Tabla 2) por los dos factores hallados para cada una de las penicilinas semisintéticas, obteniendo de esta manera el 6-APA consumido anualmente para producir cada una de ellas.

La suma del 6-APA consumido anualmente para producir todas las penicilinas semisintéticas usadas en Colombia, da el total demandado en ese año (Ver Tabla 3).

TABLA 3. PROYECCION DE LA DEMANDA DE 6-APA EN COLOMBIA

Año	Cantidad 6-APA Consumida	Año	Cantidad 6-APA Proyectada
1975	11134	----	-----
1976	14667	----	-----
1977	14476	----	-----
1978	22173	1992	45193
1979	18470	1993	46940
1980	40032	1994	48687
1981	26494	1995	50434
1982	28856	1996	52181
1983	29017	1997	53929
1984	33198	1998	55675
1985	36947	1999	57423
1986	36518	2000	59170
1987	37267	2001	60917
1988	26639	2002	62664
1989	36400		
1990	-----		
1991	19025		

En la Tabla anterior se reportan los valores correspondientes a la demanda de 6-APA, los cuales serán la base fundamental para definir el tamaño de la planta. Dicha planta iniciaría producción en 1993 y tendría una vida útil de 10 años (10,14).

2.5 TAMAÑO DE LA PLANTA

Para determinar el tamaño de la planta, el elemento de juicio más importante es, generalmente, la cuantía de la demanda que ha de atenderse, por tal motivo se considera que el tamaño de planta adecuado será el que conduzca al mínimo costo unitario, para atender la demanda actual, a la vez que tenga capacidad disponible para atender la demanda futura (14).

Teniendo en cuenta lo anterior, determinamos el tamaño de la planta con base en la proyección de la demanda de 6-APA, calculada en el estudio de mercado.

Dada la naturaleza del proyecto, es conveniente asumir como factor de seguridad, que solo se abastecerá un 75% del mercado, admitiendo con esto que el 25% del 6-APA demandado indirectamente a través de las penicilinas semisintéticas se obtendrá por otras fuentes. Precisamente este porcentaje estimado de cubrimiento del mercado nacional, define el tamaño de la planta cuya capacidad de producción será de ~~40000~~ Kg/año. Con un tamaño mayor disminuirían los costos unitarios de producción, pero a su vez se correría el riesgo de sobreestimar la capacidad del mercado. Un tamaño menor haría que los costos de producción aumentaran, con lo cual disminuiría la rentabilidad del proyecto.

En la Tabla 4 se muestra la demanda de 6-APA que se espera cubrir desde el año 1993 hasta el año ~~2002~~, así como también el porcentaje de la capacidad instalada utilizado.

Debido a que año tras año se estará aumentando el porcentaje de la capacidad instalada a utilizar, los costos unitarios de producción decrecerán.

TABLA 4. TAMAÑO DE LA PLANTA - ~~40000~~ Kg/año

Año	Demanda de 6-APA (Kg)	* Demanda a Cubrir	% Capacidad Instalada
1992	45193	---	---
1993	46940	35205	88
1994	48687	36515	91
1995	50434	37825	95
1996	52181	39135	98
1997	53929	40000	100
1998	55675	40000	100
1999	57423	40000	100
2000	59170	40000	100
2001	60917	40000	100
2002	62664	40000	100

* Demanda a cubrir = 75% de la demanda real de 6-APA.
quinto año de operación de la planta.

3. ESTUDIO DE INGENIERIA

Shewale y Sivaraman (31), investigadores de "Hindustan Antibiotics Ltda", hicieron una revisión de la tecnología existente para la producción de 6-APA, considerando principalmente los procesos comerciales disponibles. Basados en la información que ellos publicaron, describimos a continuación las condiciones bajo las cuales se realiza la hidrólisis en varias compañías farmacéuticas, los resultados obtenidos en el proyecto del Programa Regional de Biotecnología y, además, los diferentes tipos de reactores que se han utilizado.

En la Tabla 5 se muestran los parámetros operacionales y las características de penicilino acilasas inmovilizadas por: Rohm Pharma, Astra, Boheringer Mannheim, Beecham, Hindustan Antibiotics Ltda, Novo y la utilizada en el proyecto producida GENIN S.A. de C.V. Los valores reportados en este último caso corresponden a trabajos realizados en reactores de laboratorio de 1 litro.

La relación enzima a penicilina debe permitir una hidrólisis completa (>97%) con mínimo sustrato e inhibición de los productos (Ver Tabla 5). El agua usada en el proceso debe ser filtrada y desionizada. La formación de ácido fenilacético hace que disminuya el pH, por lo tanto, debe adicionarse álcali empleando un sistema de control de pH.

3.1 Reactores para Hidrólisis enzimática de penicilina.

Se han estudiado diferentes tipos de reactores, que incluyen el convencional con agitación y enchaquetado en el cual la solución de penicilina G. junto con la enzima reaccionan a la temperatura deseada (Ver Figura 3). Terminada la reacción la enzima es separada por filtración a presión. La velocidad de agitación debe ser suficiente para mantener la enzima en suspensión y para distribuir rápidamente el álcali que se va agregando.

...

La estabilidad operacional reportada esta entre 100 y 620 ciclos de uso de la enzima (Ver Tabla 5). En el caso de la enzima utilizada en el proyecto, el número de ciclo es de 400 con las pruebas que se han realizado; sin embargo, este valor puede aumentarse drásticamente empleando reactores de columna empacada recirculados por lotes. (Ver informe Actividad D). Park y Ryu (31), han diseñado un sistema en el cual la enzima está empacada en una columna y la solución de penicilina se recircula (Ver Figura 4).

TABLA 5. PARÁMETROS OPERACIONALES Y CARACTERÍSTICAS DE LAS PENICILINACILASAS INMOBILIZADAS

Parámetro	BOEY PRARNA	ASTRA ALAB AB	Boehringer Mannheim (PGA)	Beechman	NOVO (Sonnacilasa)	HINDUSTAN ACTIBIOTICS LYDA	GENIE
Origen de la Enzima	E. coli	E. coli	E. coli (Recombinante)	E. coli	ED	E. coli	E. coli
Soporte	Empergit C.	Sephadex 6200	Poliacrilamida. 310-300	Sephadex	ED	Celulosa	Resina acrilica 120-150
Actividad (U g-1)	100 - 150	200 - 250	ED	ED	60	300	ED
pH Operacional	8.0	7.0	8.0	7.0-8.0	7.0-7.5	7.0-8.0	7.5
Temperatura Operacional (°C)	37	37	28	35 - 40	35	37	37
Vida operacional (h)	1000	ED	1000-1500	2000-4000	2000	600	1300
Concentración del Sustrato (%)	8	ED	7.2-10.0	4.0-13.0	4.0 - 6.0	7.0	10
Reactor	Tanque Agitado	Tanque agitado Columna empacada	Tanque Agitado	Columna	Tanque agitado Columna empacada	Tanque Agitado	Tanque Agitado
Conversión (%)	99	97	97	ED	90-99	97-99	97
Número de Ciclos	620	165	600	ED	500-550	100	400
Kg 6-APA/Kg enz.	250-300	257	1000	1000-2000	200	100	300-400
Almacenamiento	6 meses (4°C)	12 meses (20°C)	16 meses (4°C)	ED	6 meses (4°C)	6 meses (4°C)	N.D.

N.D. Información no disponible

Fuente: Process Biochemistry, Agosto 1989 (31)
Instituto de Biotecnología (35).

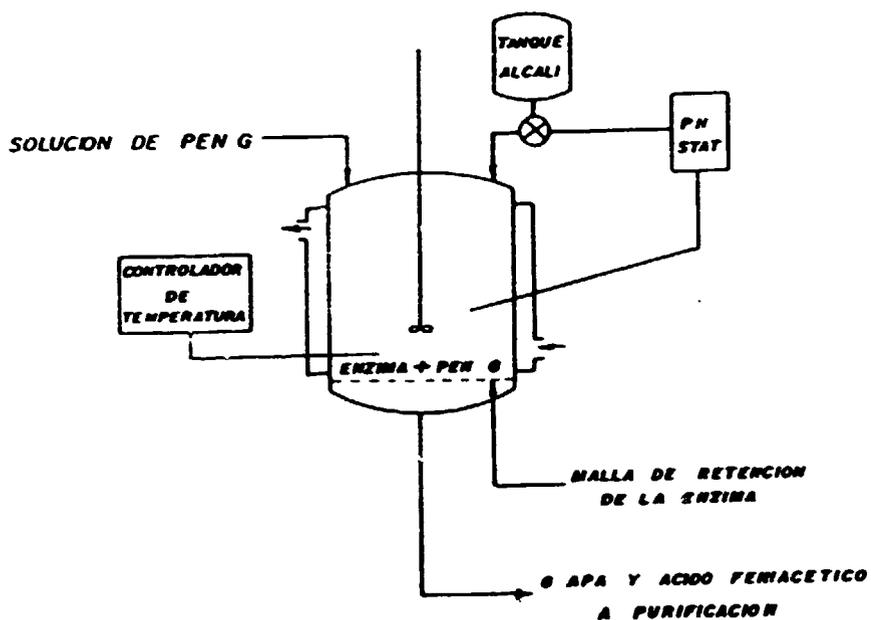


FIGURA 3 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL REACTOR CON TANQUE AGITADO USADO EN HIDROLISIS DE PEN G (31)

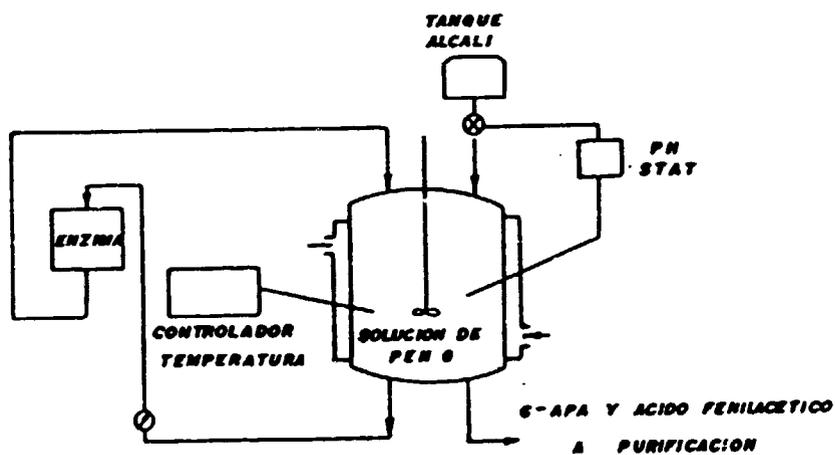


FIGURA 4 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN REACTOR CON COLUMNA EMPACADA USADO EN HIDROLISIS DE PEN-G (31)

Una comparación entre el reactor con agitación y el reactor con columna empacada fue hecha por Mollgard (31), para la hidrólisis de Penicilina V usando semacilasa (enzima inmovilizada preparada por Novo). El reactor con agitación dió los mejores resultados.

3.2 PURIFICACION DEL 6-APA

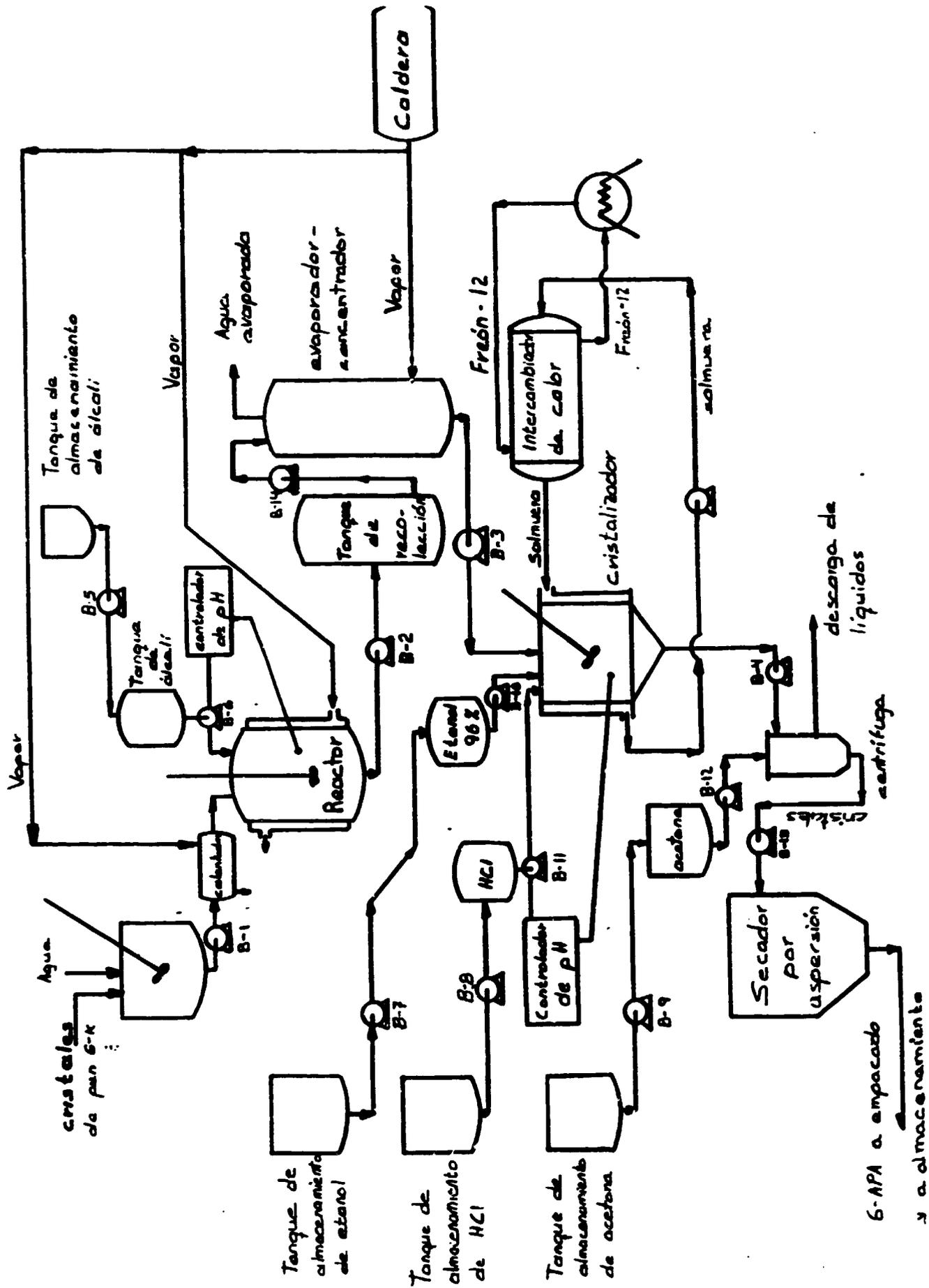
La purificación del 6-APA presente en la mezcla reaccionante, después de la separación de la enzima, es el paso final en el proceso de producción del 6-APA.

De acuerdo con la información publicada en el artículo presentado por industrias Novo (27), en la IX Conferencia Internacional de Ingeniería de Enzimas y en el informe presentado por el Instituto de Biotecnología al Programa Regional (ONUDI) (29), el procedimiento más adecuado para la purificación del 6-APA es el siguiente :

- Concentrar el 6-APA por evaporación al vacío sin exceder una temperatura de 30°C.
- Enfriar la solución hasta que la temperatura se mantenga en 15°C.
- Lentamente adicionar una solución de ácido clorhídrico hasta llegar a un pH de 4.3 (pH isoeléctrico del 6-APA). Durante este proceso de precipitación es importante mantener una agitación vigorosa.
- Posteriormente la mezcla se enfría hasta que la temperatura permanezca en 5°C y se adiciona el etanol al 96% (la mitad del volumen que se tenga). Este etanol se debe enfriar a 11°C antes de ser adicionado a la mezcla. la adición debe hacerse lentamente para evitar que durante esta operación se eleve la temperatura y con ello se redisuelva el 6-APA.
- La solución se mantiene refrigerada y con agitación por espacio de una hora.
- Del cristalizador se lleva la mezcla a una centrifuga, donde además de separar el 6-APA se hace un lavado con acetona (1 l acetona/Kg 6-APA).

- El proceso de secado final se realiza en un secador por aspersión.
- El almacenamiento del producto obtenido deberá efectuarse en recipientes herméticamente cerrados.

En la Figura 5 se presenta el diagrama de flujo propuesto para la planta productora de 40 toneladas/año de 6-APA, obtenido a partir del análisis de la información técnica anterior.



3.3 BALANCE DE MATERIA

Las condiciones de proceso que se tomaron para emprender el balance de materia, se obtuvieron de las tablas 5 y 6 en las que se reportan valores para plantas industriales y se comparan con los valores obtenidos para el catalizador empleado en el proyecto 6-APA del Programa Regional, producido por GENIN. Para este último caso la información se ha generado en un reactor operando con un volumen útil de un l litro. También se tuvieron en cuenta los datos de un informe técnico de la empresa SCLAVO S.p.A. (Milán - Italia) los cuales se presentan a continuación:

Capacidad del Reactor :	1000 l.
Solución de penicilina:	8%
Enzima inicial :	7.200.000 U
Intervalo de pH :	7.5 - 7.9
Tiempo prom. de Hidrólisis :	3 hr.
Tiempo prom. proceso :	4.5 hr.

Los valores empleados en el balance de materia son :

Capacidad de la planta	40 ton/año
Días de operación /año	330
Número promedio de lotes/día	4
Numero de lotes /año	1320
Kg producidos de 6-APA/día	121.2
Kg producidos de 6-APA/lote	30.31
Actividad de la enzima	125 U/gr.
pH operación	7.4-7.6
Temperatura operación	37°C
Tiempo de vida media	1000 h.
Concentración del sustrato	10%
Reactor	Tanque agitado
Conversión	97%
Rendimiento	275 Kg 6-APA/kg. enzima.

Utilizando estos valores se obtuvo el balance de materia por lote y por año, el cual se muestra en la Tabla 7.

TABLA 6. CONDICIONES DE PROCESO DE PLANTAS INDUSTRIALES PRODUCTORAS DE 6-APA

	Orsabe (México)	Northong	Singapore	Brasil	GENIB *
Rendimiento del proceso	86	87.6 - 90	87.8 - 89.6	88	89
Penic-G cargada (Kg)	300	670 - 650	450 - 550	100	100 (gr)
Reactor Capacidad total (l)	6250	15.000	13.000-24.000	3.500	1
rpm	85	50 - 75	120 - 130	35	350
Forma del fondo	Cónico	Toroide	Cónico-toroide	Cónico	Toroide
Penicilina G1 (95% pureza)					
Origen	Irvine	Irvine	Irvine	Squibb	Quinonas
Agua (l)/pen G (Kg)	12	12.8	12.1	13	10
Forma de Adición de Pen G (perfil)	Velocidad Constante	29.5 l/min 20 min 6.5 l/min	Velocidad Constante	Velocidad constante	Velocidad constante
Penicilina ad. en	Solución	Solución	Sólido	Solución	Solución
Basino Inicial NB	110.000	200.000	166.000	87.000	12.000 (U)
Pureza 6-APA	94.5	96 - 96.5	95.5	---	82 - 97
Intervalo pH	7.9 - 8	7.9 - 8.2	7.8 - 8.2	7.9-8.1	7.4 - 7.6
Tiempo de hidrólisis (h)	5-8	7	5-7	3-5	2 - 4
Punto final	5 l de soda en 30 min	7 h	96.5 %	4 rep. de pH	97%
Control de pH	Manual	Automático	Automático	Manual	Automático

Fuente : ORSABE - México

* Informes Técnicos, proyectos 6-APA, ONUDI.

TABLA 7. BALANCE DE MATERIA POR LOTE Y POR AÑO, PARA UNA PLANTA PRODUCTORA DE 40 TON/AÑO DE 6-APA.

Materias Primas	Indicador	Por lote	Por Año
Penicilina G-K	2 Kg/Kg 6-APA	60.62 Kg.	80.000 Kg
Agua tratada para: dilución de PGK y dilución de NH ₄ OH	22.2 L/ kg 6-APA	672.88 l	888 m ³
Amoniaco (25%)	18.76 ml/l mezcla R1*	11.37 l	15 m ³
HCl (37%)	40.5 ml/l mezcla R2**	28 l	37 m ³
Etanol (96%)	0.27 l/l mezcla R2**	186.6 l	246.3 m ³
Acetona	1 l/Kg 6-APA	30.31 l	40 m ³
Agua	1 l/Kg 6-APA	30.31 l	40 m ³
Consumo de Enzima Inmovilizada/año.	275 Kg 6-APA/ Kg. biocatalizador	---	145.5 Kg.
Enzima cargada inicialmente	120 U/g Pen GK.	58.2 Kg.	---

* Mezcla R1 : Solución de PGK/lote

** Mezcla R2 : Mezcla de solución después de la hidrólisis: solución PGK + Amoniaco 2N adicionado.

3.4 DIMENSIONAMIENTO Y COSTO DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES

Los equipos utilizados para la producción y purificación del 6-APA por el proceso enzimático convencional, de acuerdo con el diagrama de flujo (Fig. 5) son los siguientes:

- Un reactor enzimático con control de pH.
- Un evaporador al vacío
- Un cristizador
- Un equipo de refrigeración
- Una centrífuga
- Un secador por aspersión
- Tanques de dilución
- Tanques de almacenamiento
- Bombas de proceso
- Un generador de vapor
- Un intercambiador de calor.

Se procedió a dimensionar estos equipos (7,9,11,15), con el propósito de calcular la variable principal que permita, a su vez, obtener el costo de adquisición de cada uno. La Tabla 8 resume el dimensionamiento y la Tabla 9 presenta el valor actualizado de los equipos, empleando los índices de Marshal y Stevens. El error probable de este cálculo es menor a 15% (12).

De acuerdo con este procedimiento, el valor del equipamiento para una planta nueva dedicada a la producción de 6-APA es de US\$ 532.900. Se evaluará por parte de VECOL el caso de ampliación de su planta, integrando a esta una unidad de producción de 6-APA.

TABLA 8. DIMENSIONAMIENTO DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES DE LA PLANTA

EQUIPO	Cant.	Material	Variable Principal	Valor variable princip.
Reactor enzimático	1	AI	Volumen	1000 L
Evaporador	1	AI	Area	3.2 m ²
Cristalizador	1	AI	Capacidad	1000 l
Centrífuga	1	AI	Diámetro canasta	60 cm.
Secador por aspersion	1	AI	Cap. evap. agua	500 lb/h
Equipo de refrigeración	1	-	Ton frío	41
Bombas de diferentes características	13	-	Flujo	-----
Tanques de dilución	-	-		
Fenicilina G-K	1	AI	Volumen	1000 l
Hidróxido de amonio	1	AI	Volumen	500 l
Tanques de almacenamiento				
Acetona	1	AC	Volumen	3000 l
Etanol	1	AC	Volumen	12000 l
Hidróxido de amonio	1	AC	Volumen	7000 l
Acido clorhídrico	1	P	Volumen	4000 l
Tanques de recolección	1	AI	Volumen	2000 l
Intercambiador de calor	1	AI	Area	1.1 m ²
Generador de vapor	1	--	Cap.generac. vapor	60 HP

AI: Acero inoxidable; AC: Acero al carbono; P:plástico reforzado.

TABLA 9. DETERMINACION DEL COSTO DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES

EQUIPO	COSTO AÑO FIGURA (US\$)	MRS 1991 MRS AÑO FIG.	COSTO ACTUAL (US \$)
Evaporador (11): Pag. 11-42 Fig. 11-26	12.000	1170/606	23.200
Cristalizador (12): Pag. 593 Fig. 13-77	50.000	1170/576.5	101.500
Centrífuga (12): Pag. 592 Fig. 13-74	13.000	1170/576.5	26.400
Secador por Aspersión (12): Pag. 774 Tabla: 15-29	60.000	1170/576.5	121.800
Bombas (en total 13) (12): Pag. 557 Fig. 13-42	10.000	1170/576.5	20.500
Tanques de Dilución penicilina G-K	7.000	1170/576.5	14.200
Hidróxido de amonio (12). Pag. 572 Fig. 13-58	2.000	1170/576.5	4.000
Tanques de Almacena- miento			
Etanol	10.000	1170/606	19.300
Acido Clorhídrico	8.250	1170/606	16.000
Hidróxido de amonio	7.000	1170/606	13.500
Acetona	4.000	1170/606	7.800
Tanque de recolección (11): Pag. 6-111 Fig. 6-141	10.000	1170/606	19.300
Intercambiador de Calor (12): Pag. 671 Fig. 14-17	1.000	1170/576.5	3.300
Reactor enzimático (12): Pag. 791 Fig. 15-37	10.000	1170/576.5	20.300
Equipo refrigeración (12): Pag. 886 Fig. B-7	50.000	1170/576.5	101.500
Caldera (12): Pag. 885 Fig. B-4	10.000	1170/576.5	20.300

FUENTE : (11) PERRY - Manual del Ingeniero Químico.
(12) PETERS & TIMMERHAUS

BIBLIOGRAFIA

LIBROS Y PROYECTOS DE GRADO

- (1) CHACON, Gustavo y JIMENEZ, Gonzalo. Estudio de orefactibilidad para la producción de dimetiltereftalato en Colombia. Proyecto de grado Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1981.
- (2) ROSENSTEIN, Emilie. Diccionario de Especialidades Farmaceuticas. PLM, Editorial para los médicos, S.A. Décimo octava edición 1990.
- (3) DIRECTORIO INDUSTRIAL DE COLOMBIA. Publicaciones Legis 1991.
- (4) FOYE, William O. Principios de Química Farmacéutica. Editorial Reverte. Segunda edición. España 1984.
- (5) GUARIN, Ernesto y DELGADO, Jairo O. Evaluación de alternativas de producción de butanol y estudio económico de la fermentación con células inmovilizadas. Proyecto de grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1990.

- (6) THE MERCK INDEX. Publicado por Merck and Company Inc.
Novena edición 1976.
- (7) KERN, Donald G. Procesos de Transferencia de Calor.
Editorial Mc Graw-Hill Book Company. Décimo novena
edición. New York. USA 1979.
- (8) LITTER, Manuel. Farmacología Experimental y Clínica.
Editorial El Ateneo. Sexta edición. Buenos Aires.
Argentina 1980.
- (9) Mc CABE, Warren L. y SMITH, Julián C. Operaciones
Básicas de Ingeniería Química. Editorial Reverte.
España 1981.
- (10) NACIONES UNIDAS. Manual de Proyectos de Desarrollo
Económico. 1972.
- (11) PERRY, R.H y CHILTON, C.H. Manual del Ingeniero
Químico. Editorial McGraw-Hill Book Company. Quinta
edición. 1982.
- (12) PETERS, M. y TIMMERHAUS, K. Plant Design and
Economics for Chemical Engineers. Editorial McGraw-
Hill Book Company. Tercera edición. New York, USA
1980.

(13) PINZON v SERRANO. Estudio de prefactibilidad tecnico economica para la producción de butanol y acetona por fermentacion batch. Provento de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1987.

(14) SAFAG, N. v SAFAG, O. Fundamentos de Preparación y Evaluación de Proventos. Editorial McGraw-Hill Book Company. 1986.

(15) FREYBAL, Robert E. Operaciones de Transferencia de Masa. Editorial McGraw-Hill Book Company. Segunda edición. 1980.

ARTICULOS Y BOLETINES

(16) ASOCIACION BANCARIA DE COLOMBIA. Regimen Legal de las Instituciones Financieras. Febrero 1990.

(17) BANCO DEL COMERCIO. Boletín Informativo. Febrero 1991.

(18) DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Anuarios de Comercio Exterior. Bogota 1975 a 1988

(19) DANE. Departamento Administrativo Nacional de

Estadística. Anuarios de industria manufacturera.
Bogotá 1975 a 1986.

- (20) GIACOBBE, F., JASONNA, A. v. CECERE, F. Novel developments for the production of 6-APW in the penicillin G fermentation plant by using fiber-entrapped penicillin amidase. Journal of Solid Phase Biochemistry, Vol 2, No 3, 1978. Pag. 195-201
- (21) HARRISON, F.G. v. GIBSON, E.D. Approaches for reducing the manufacturing costs of 6-Aminopenicillanic Acid. Process Biochemistry. Febrero 1984. Pag. 33-36.
- (22) INCUMEX. Instituto Colombiano de Comercio Exterior. Anuarios de Comercio Exterior. Bogota 1987 a 1989.
- (23) INCOMEX. Instituto Colombiano de Comercio Exterior. Licencias de importación de "penicilinas, sus sales, derivados y compuestos". durante 1987 y 1988.
- (24) LOWE, ROMANCIK y ELANDER. Enzymatic hydrolysis of penicillin V to o-Aminopenicillanic Acid by fusarium oxysporum. Biotechnology Letters, Vol 8, No 3, 1986. Pag. 151-156.
- (25) MARCONI, CECERE, MORISI, DELLA PENNA y RAPPUOLI. The

hydrolysis of penicillin G to 6-Aminopenicillanic Acid by entrapped penicillin acylase. The Journal of Antibiotics, Abril 1970. Pag. 228-232.

(26) MARSHALL v STEVENS. M&S Equipment Cost Index. Chemical Engineering.

(27) MOLLGAARD, Henrick v FARLSEN, Lars. 6-APA production in pilot plant with an immobilized penicillin acylase (semacylase). Poster presented at the 9th International Enzyme Engineering Conference. Santa Barbara, California, USA. Octubre 1987.

(28) NOVO ENZYME INFORMATION. Production of 6-APA from penicillin-V in a stirred batch system using semacylase from Novo industria a/s. Julio 1987.

(29) REGUERO, Maria Teresa. Informe sobre la purificación del 6-APA y AFA. México. Noviembre-Diciembre 1989.

(30) SOLAVO - BIOCHEMICAL DIVISION DEBI. Penicillin-G amidase beads immobilized. Milan, Italia. Mayo 1990.

(31) SHEWALE, J.G. v SIVARAMAN, H. Penicillin acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. Process Biochemistry, Agosto 1989. Pag. 146-154.

OTROS

(12) COMERCIALIZADORA- División Cacao.

(13) BANCO DE LA REPUBLICA. División de Investigaciones Económicas.

(14) ACUERDO (UNIDO No 87/126) ENTRE: La Organización para el Desarrollo Industrial de las Naciones Unidas (UNIDO) y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.

(15) GRUPO DE INVESTIGACION DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

(16) LATORRE, Germán. Asesor en Comercio Exterior de T.V.A. Representaciones.

ACTIVIDAD D

ACTIVIDAD D

Para el cumplimiento de esta actividad, se envió al Ingeniero Edgar Alfonso Gómez Aguirre a México. El desarrollo de su labor fue dirigida por el Dr. Agustín López-Munguía C. y por el Dr. Rodolfo Quintero (Investigadores del Instituto de Biotecnología de la UMAM).

Un aspecto crítico, en la hidrólisis enzimática de la penicilina, es el precio de la enzima, el cual influye considerablemente en el costo total del proceso de producción del 6-APA. Se requiere entonces evaluar los diferentes sistemas de reacción para determinar cual es el que permite un uso eficiente de la enzima inmovilizada. Por esta razón se planteó realizar el siguiente estudio de Ingeniería Básica: " Ingeniería de Reactores para la Evaluación de la Estabilidad de la Penicilino amidasa en la producción del 6-APA"

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del pH en la estabilidad de la enzima penbencilino-amidasa inmovilizada, durante la reacción de hidrólisis de la penicilina G, en diferentes sistemas de reacción.

1.2. Objetivos Específicos

1.2.1 Desarrollar programas de computador que permitan simular la hidrólisis enzimática de la penicilina G y evaluar la estabilidad en los siguientes reactores:

- a. Reactor por lotes de tanque agitado
- b. Reactor continuo de columna empacada
- c. Reactor continuo de tanque agitado
- d. Reactor por lotes de múltiples columnas empacadas recirculado (RMER)

1.2.2 llevar a cabo estudios básicos en un Reactor por lotes de Múltiples Columnas Empacadas Recirculado (RMER)

2. RESULTADOS

Para realizar la simulación de la hidrólisis de la penicilina G-K se tuvo en cuenta: el balance de materia, la variación del pH, su respectiva neutralización y la desactivación de la enzima por efecto del pH

Para el biocatalizador de penicilino-acilasa producido por GENIN S.A. de C.V. (México) ya se tiene definido el modelo cinético y el de desactivación por efecto del pH⁽¹⁾. Durante la hidrólisis, la penicilina es transformada a ácido fenil acético y a 6-APA causando una caída de pH, esto junto con el efecto de la temperatura afectan la actividad y por ende la vida media del biocatalizador^(2,3,4,5,6,7). Uno de los aportes importantes de este trabajo fue el desarrollar el siguiente modelo de variación del pH:

$$X = \frac{F_{10} S_0 + (C_1 + C_2)(3F_{40} + 2F_{41} + F_{42}) - K + M + CA (F_{50} - 1)}{S_0 (F_{10} - F_{32} - F_{20} - F_{30})} \quad (1)$$

Donde:

- X = conversión
- S₀ = concentración inicial de penicilina
- C₁, C₂ = concentración de KH₂PO₄ y K₂HPO₄ respectivamente
- F_i = Funciones complejas de pKa y del pH

La ecuación 1 describe la variación del pH como una función de la conversión. También se obtuvo una función que permite conocer la concentración requerida de amoníaco para mantener el pH en un valor dado:

$$CA = \frac{F_{10} S_0 + (C_1 + C_2)(3F_{40} + 2F_{41} + F_{42}) - X S (F_{10} + F_{32} - F_{20} - F_{30}) - K + M}{(1 - F_{50})} \quad (2)$$

2.1 Reactor por lotes

Se desarrolló un programa de computación para simular la hidrólisis de la penicilina en el reactor por lotes. En esencia la simulación trata de describir los resultados de estabilidad operacional a partir de datos experimentales de estabilidad en almacenamiento, adicionando el efecto de la fluctuación de pH en el medio de reacción.

Los resultados de la simulación de la variación del pH como una función de la conversión y comparados con los datos experimentales se ilustran en la fig. 1. El modelo de generación del pH, ec. 1 predice, tal y como sucede en la reacción, una drástica caída del pH aún para conversiones muy pequeñas para posteriormente estabilizarse en un valor cercano a 4.8.

La conversión en función del tiempo de hidrólisis se presenta en la figura 2, donde se muestran los datos experimentales y los obtenidos con la simulación. Es evidente que la descripción del modelo cinético se ajusta satisfactoriamente a los datos experimentales. Al llevar a cabo la simulación de la estabilidad del biocatalizador, los resultados experimentales quedan perfectamente descritos cuando la regulación se hace a valores de $pH = 7.5 \pm 0.1$, según se muestra en la figura 3.

Resulta interesante poder observar lo que podrían ser diferentes eficiencias en los sistemas de regulación de pH y su efecto en la estabilidad del biocatalizador. En la figura 4 se muestran los resultados de las simulaciones para procesos sucesivos de reacción por lote en los que el pH es regulado a 7.5 con intervalos superiores e inferiores iguales a: 0.1, 0.2, 0.3, 0.6. Dichos resultados se presentan como la caída de actividad del biocatalizador conforme se suceden los lotes. Se observa como al aumentar el intervalo de control del pH, la estabilidad del biocatalizador disminuye. Lo anterior pone de manifiesto que el sistema de control de pH debe ser preciso y exacto para evitar la desactivación de la enzima.

Además se realizaron simulaciones para procesos sucesivos de reacción por lote en los que el pH se reguló en 7.5 con un intervalo fijo inferior de 0.1 e intervalos superiores iguales a: 0.1, 0.3, 0.5, y 0.7. Tales simulaciones dan información de lo que le puede suceder al biocatalizador cuando se llevan a cabo las hidrólisis en un reactor con un sistema deficiente de adición de álcali. Los resultados se muestran en la figura 5.

Como conclusión general podemos establecer que el reactor agitado por lotes, a pesar de ser el más usado en la industria, presenta diversos inconvenientes para el caso particular de la penicilino-amidasa, dadas las características de estabilidad al pH de la enzima. Es evidente que la concepción del sistema de regulación del pH juega un papel fundamental en el diseño del reactor, ya que existe un amplio margen entre el tiempo de vida media de operación y el de almacenamiento del que puede beneficiarse el proceso con un adecuado diseño del sistema de regulación.

2.2 Reactor de flujo pistón

Bajo la suposición de operación isotérmica se realizó la simulación del reactor empacado. Se evaluó la estabilidad del biocatalizador en función de la posición en el reactor, para posteriormente calcular un valor promedio integral. En la figura 6 se presentan estos datos en función del tiempo de residencia. Es importante resaltar que solo a tiempos de residencia muy cortos, donde el cambio de pH es despreciable, se estaría protegiendo al

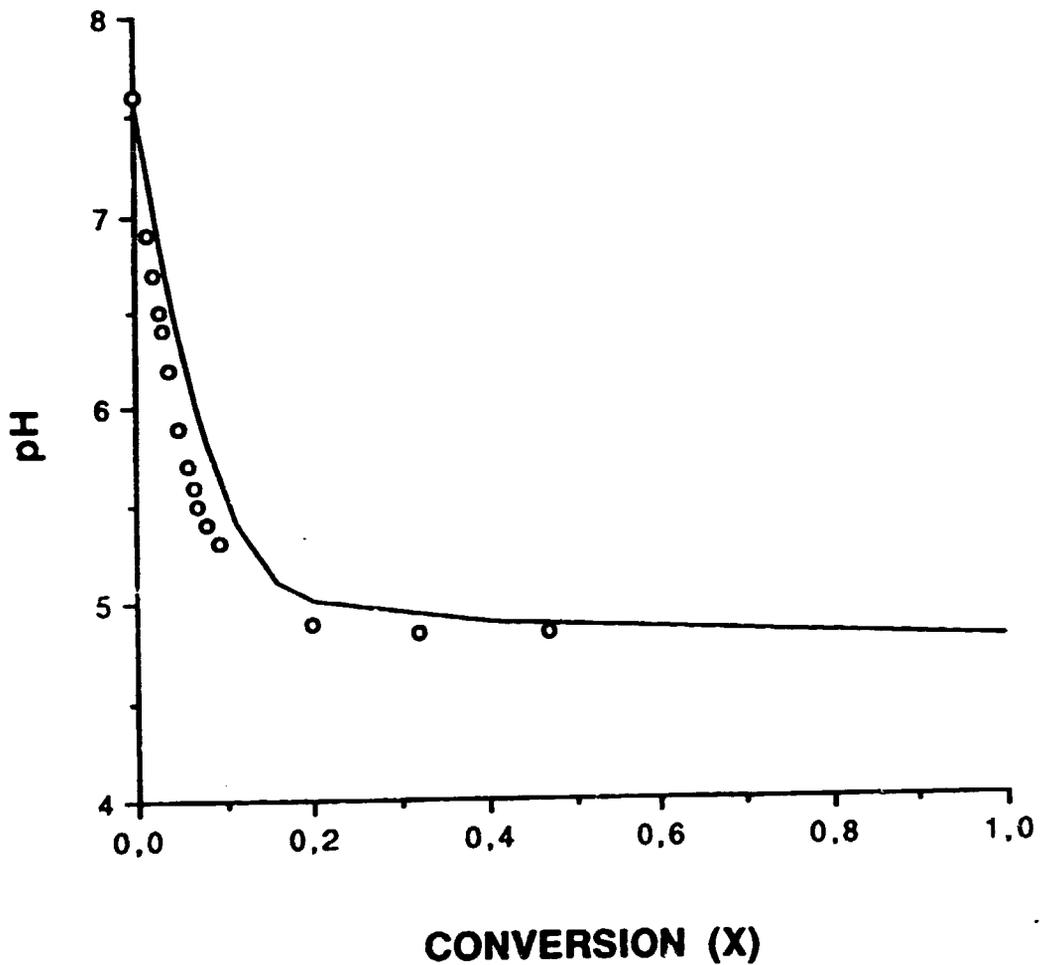


Figura 1 . Simulación de la variación del pH en función de la conversión, para la hidrólisis de penicilina G-K en un reactor por lotes de tanque agitado. De acuerdo con la ecuación 33. (o) resultados experimentales, (—) simulación. Los resultados de la simulación y los experimentales se obtienen sin realizar la neutralización.

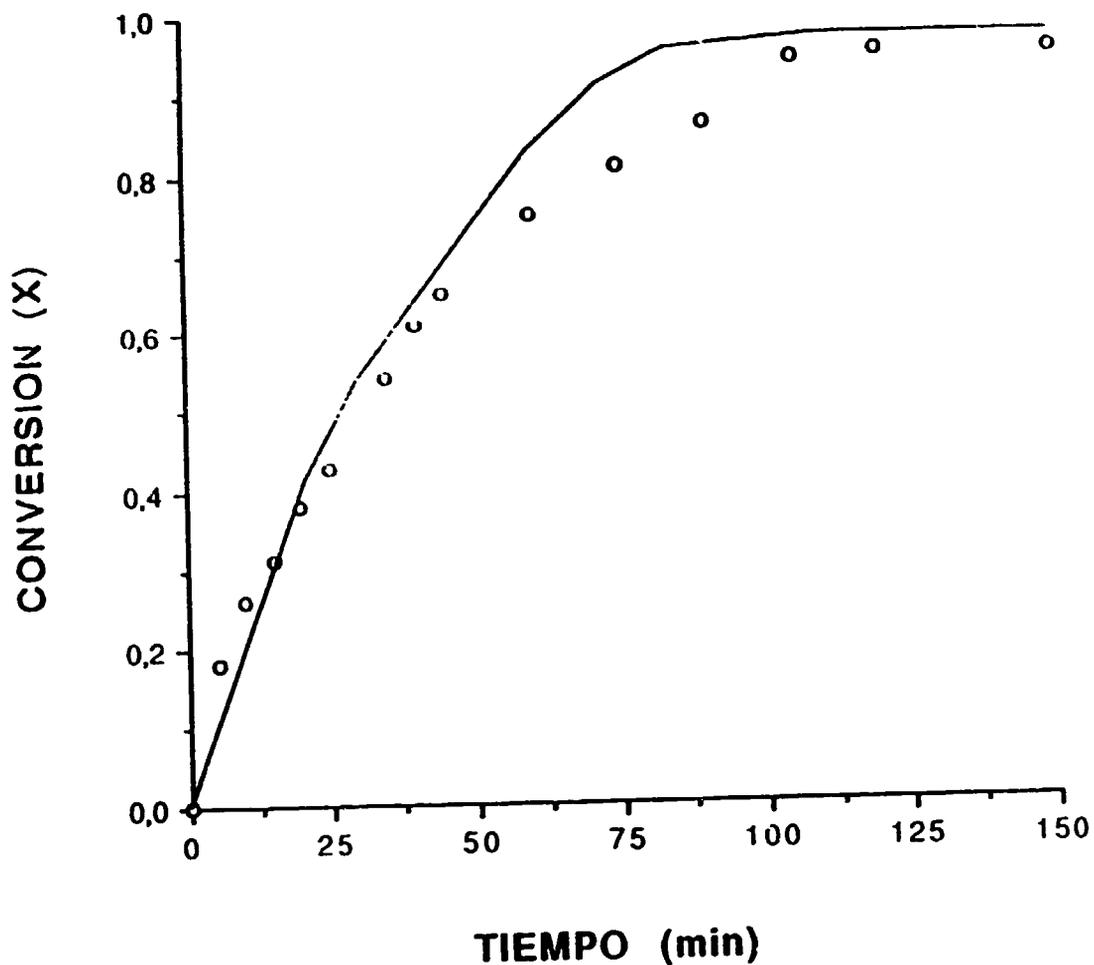


Figura 2. Hidrólisis de la penicilina en un reactor por lotes de tanque agitado, de acuerdo al modelo cinético dado por la ecuación 1.
 Condiciones en el reactor: $\text{pH} = 7.5 \pm 0.1$, regulado con H_2PO_4^- 2N, 10 % de penicilina G-K en amortiguador de fosfatos 0.03M.
 (—) resultados de la simulación, (o) resultados experimentales.

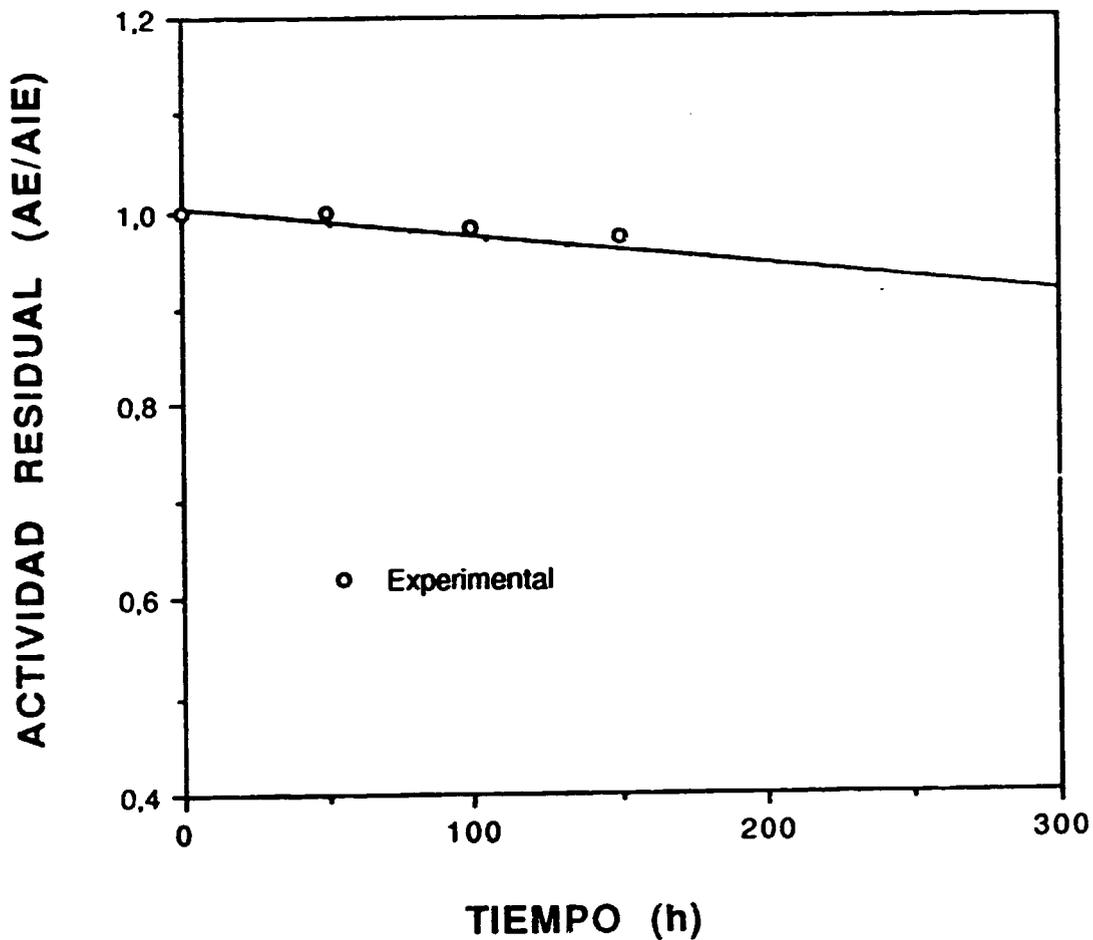


Figura 3 . Actividad residual de la penicilino-acilasa en un reactor por lotes de tanque agitado en función del tiempo de uso del biocatalizador. $T = 37^{\circ}\text{C}$, amortiguador de fosfatos 0.03M , ajuste del pH con $\text{NH}_4\text{OH } 2\text{N}$, 10% de penicilina G-K, 120 U/g de penicilina, volumen de reacción = 50 ml, control del pH entre 7.4 y 7.6, (—) simulación, (o) experimental.

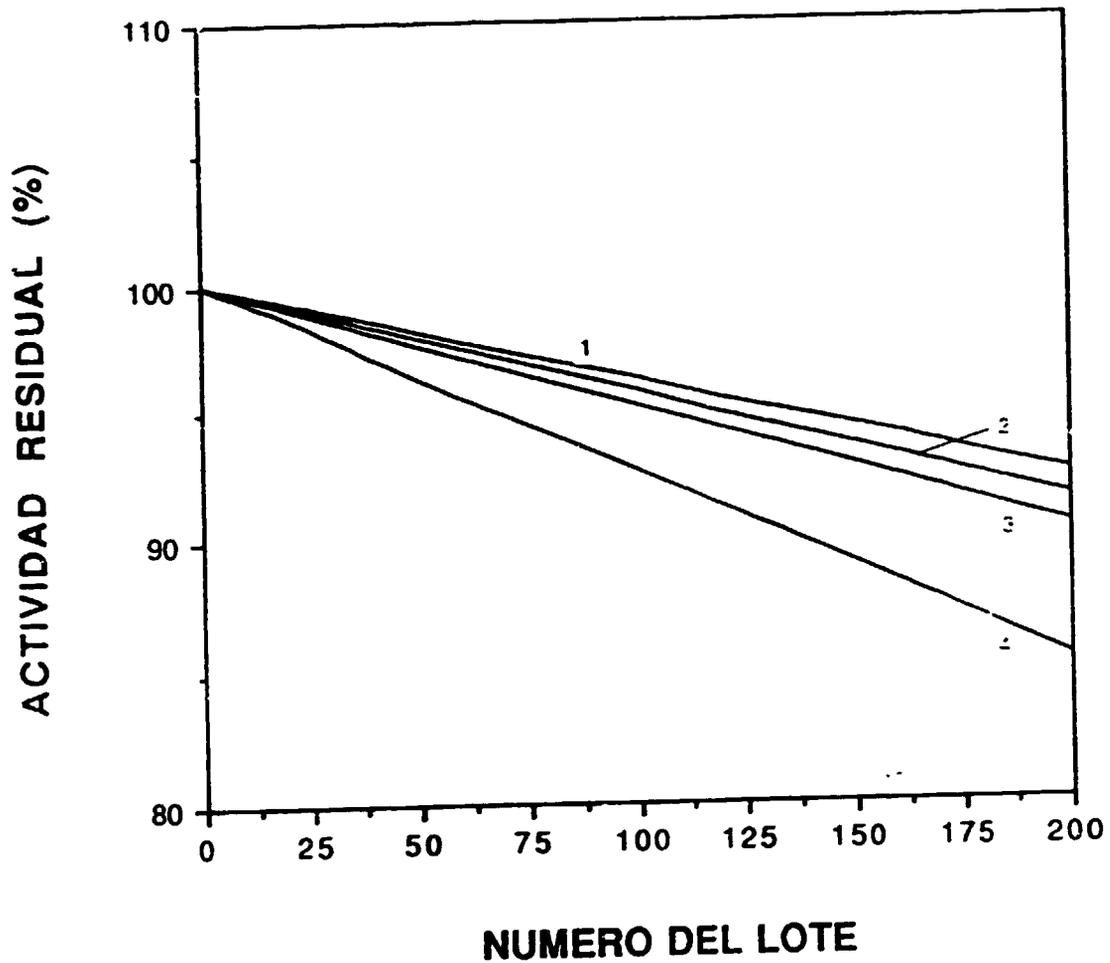


Figura 4 . Actividad residual de la penicilino-acilasa en un reactor por lotes de tanque agitado en función del número del lote. Resultados de la simulación a las siguientes condiciones: $T = 37^{\circ}\text{C}$, amortiguador de fosfatos 0.03M , la neutralización se realiza con NH_4OH 2N , 10% de penicilina G-K, volumen de reacción = 50 ml . Control de pH: $7.5 \pm \Delta$ de regulación: 1 ($\Delta = 0.1$), 2 ($\Delta = 0.2$), 3 ($\Delta = 0.3$), 4 ($\Delta = 0.6$).

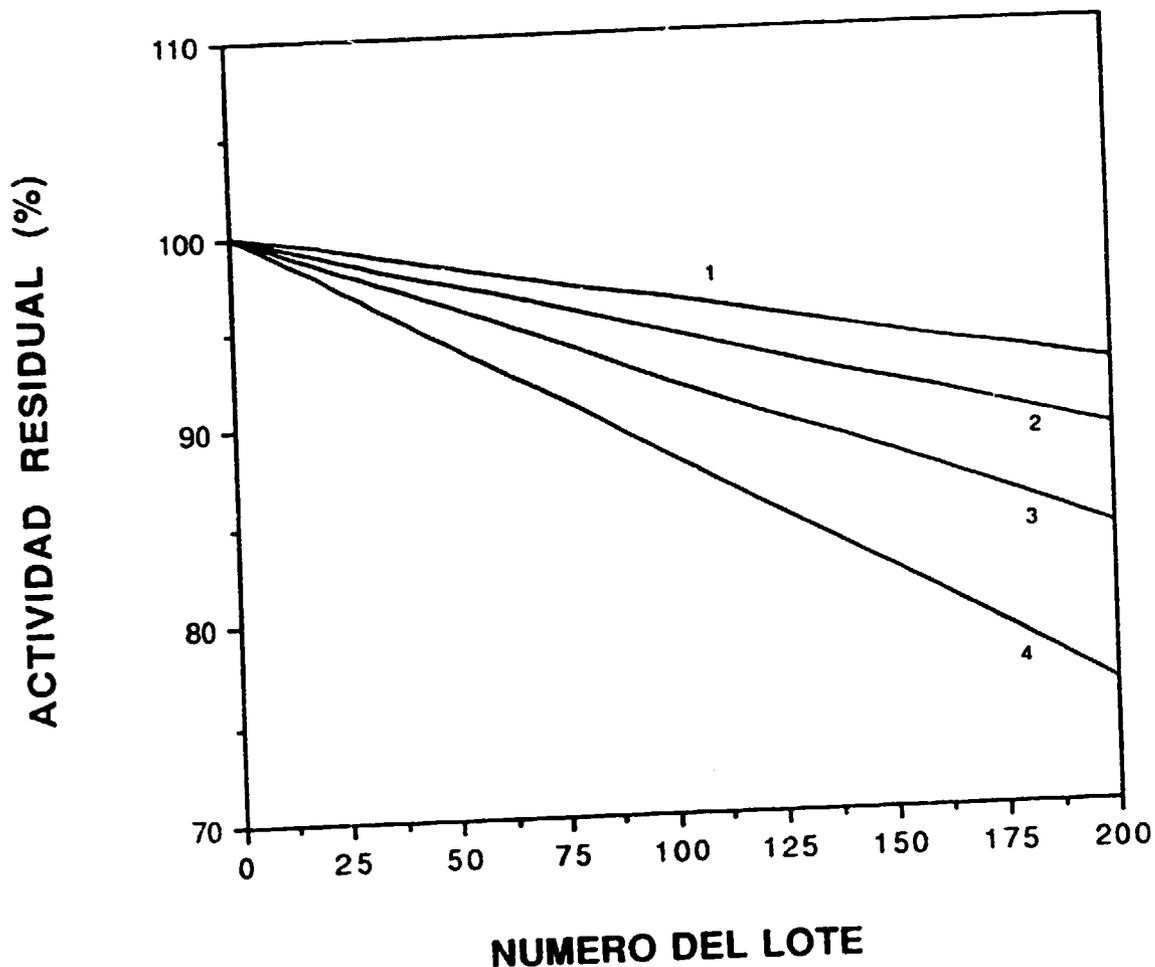


Figura 5 . Actividad residual de la penicilino-acilasa en un reactor por lotes de tanque agitado en función del número del lote. Resultados de la simulación a las siguientes condiciones: $T = 37^{\circ}\text{C}$, amortiguador de fosfatos 0.03M , neutralización con NH_4OH 2N , 10% de penicilina G-K, 120 U/g de penicilina, volumen del reacción = 50 ml , intervalo de regulación del pH para la simulación:
 pH inferior = 7.4 (constante)
 pH superior = $7.5 + \Delta$ de regulación: 1($\Delta = 0.1$), 2($\Delta = 0.3$), 3($\Delta = 0.5$), 4($\Delta = 0.7$).

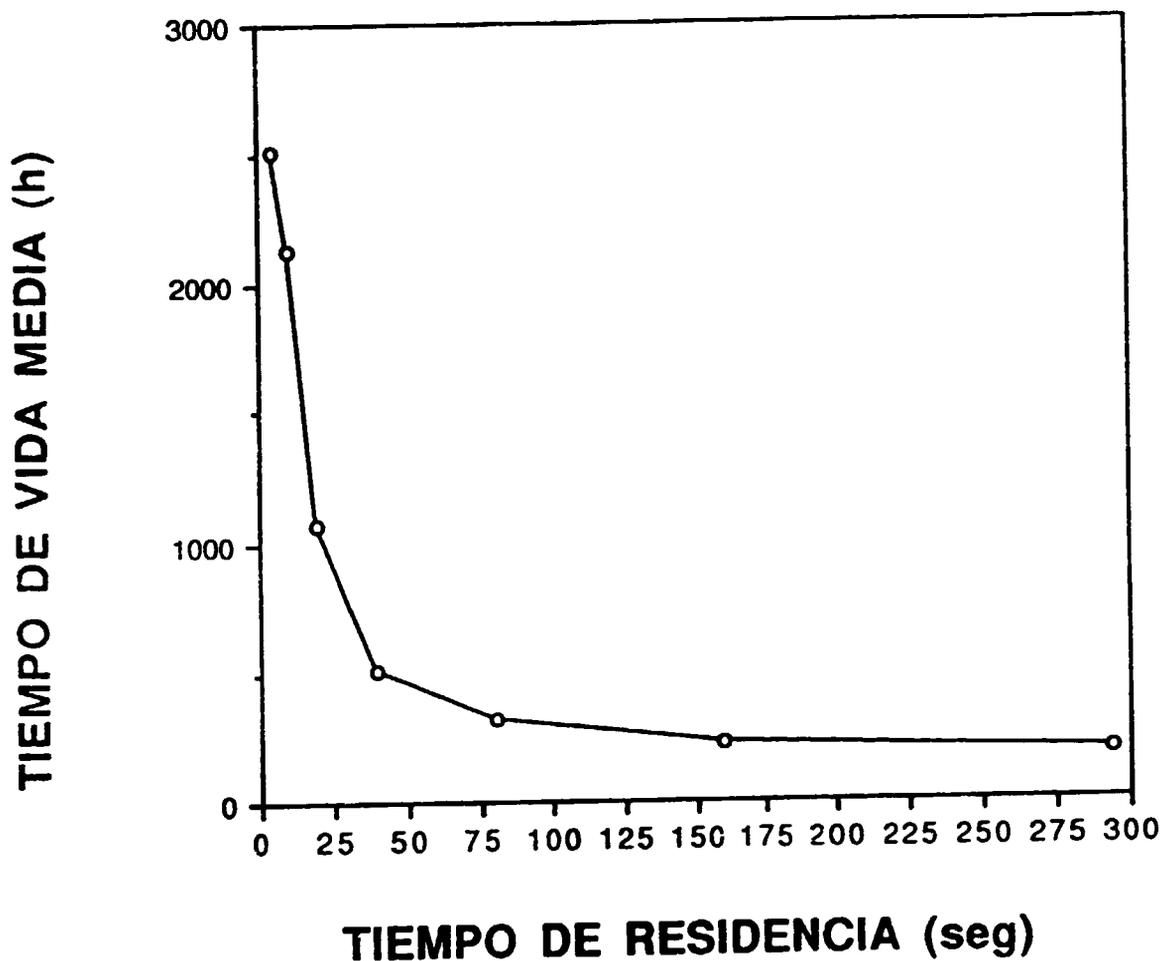


Figura 6 . Simulación del tiempo de vida media en un reactor de flujo pistón en función del tiempo de residencia. El volumen del reactor es de 3.5 ml. Las condiciones de la mezcla de reacción a la entrada del reactor son: $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7.6$, 10% de penicilina G-K, amortiguador de fosfatos 0.03M. Se tiene en cuenta el modelo de variación del pH, el cinético y el de desactivación de la enzima por efecto del pH.

biocatalizador, aunque evidentemente se obtienen bajas conversiones. Esta es la razón por la cual el reactor de flujo pistón es inadecuado para este tipo de procesos. Sin embargo los resultados de esta simulación pueden utilizarse para definir tiempos de residencia en un reactor por lotes de columnas empacadas recirculado que permitan operar en condiciones de alta estabilidad.

2.3 Reactor continuo de tanque agitado

Otra alternativa que resulta interesante analizar es la del reactor continuo de tanque agitado. Como resultado de la simulación, las productividades en el reactor continuo de tanque agitado son iguales o menores a 0.25 g 6-APA/(g biocatalizador h) mientras que las productividades del reactor por lotes, sin considerar los tiempos muertos, son cercanas a 0.65 g 6-APA/(g biocatalizador h), lo que permite concluir que el reactor continuo de tanque agitado no es el más adecuado para la hidrólisis enzimática de la penicilina G-K (figura 7).

2.4 Reactor Múltiple Empacado Recirculado por lotes (R.M.E.R)

Una importante ventaja de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de la penicilina en un reactor empacado recirculado por lotes (figura 8) es la de tener un mejor control del pH. La caída de pH puede controlarse operando flujos de alimentación al reactor tales que el tiempo de residencia sea muy pequeño, evitando así exponer la enzima a un medio muy ácido. El pH superior será el de la solución reaccionante en el tanque de neutralización, sin presentarse el problema de tener el biocatalizador en microambientes muy alcalinos. Todo lo anterior permite pensar que en este tipo de reactor la enzima inmovilizada tendrá un tiempo de vida media mayor. Por otro lado, al realizar la recirculación se pueden alcanzar las mismas conversiones en iguales tiempos de hidrólisis que en el reactor por lotes. Sin embargo, al mantener la misma relación de unidades de actividad por gramo de sustrato, la cantidad de catalizador resultante es tal que para evitar caídas de presión elevadas, es necesario distribuir el catalizador en varios reactores de columna empacada (al menos dos).

Para la evaluación experimental de la estabilidad del biocatalizador se efectuaron hidrólisis de 3 horas cada una (conversión final del 70%) en un RMER con dos columnas empacadas hasta alcanzar 100 horas de uso del biocatalizador, a 3 diferentes tiempos de residencia. Se midió la actividad a diferentes tiempos de operación. Los resultados se presentan en la tabla 1.

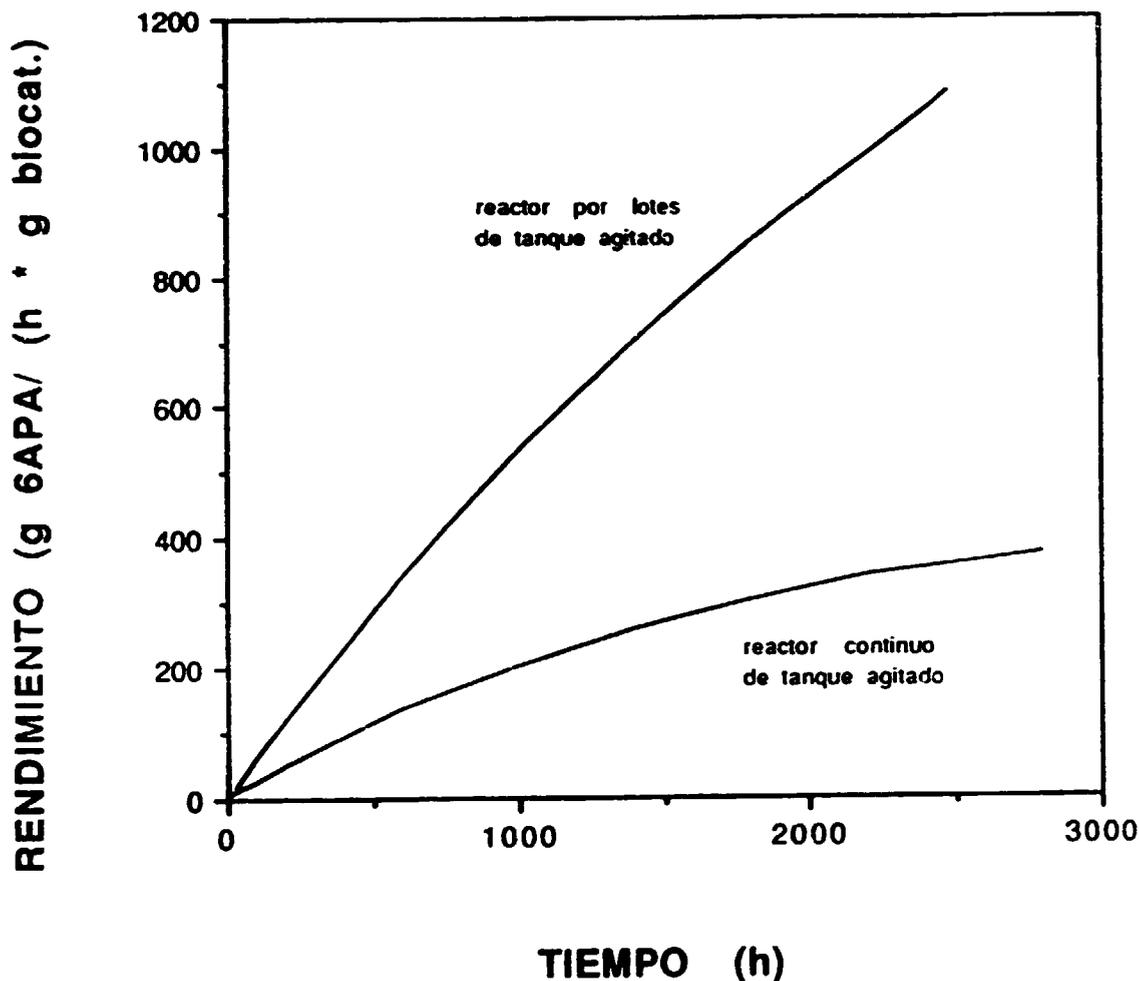


Figura 7. Comparación de los rendimientos de la hidrólisis de penicilina G-K obtenidos en un reactor por lotes y en un reactor continuo de tanque agitado. Resultados de la simulación. En los dos reactores se obtiene una conversión final del 95% y están bajo las siguientes condiciones de reacción: $T = 37^{\circ}\text{C}$, 10% de penicilina G-K, 120 U/g de penicilina, volumen del reactor: 50 ml. La única diferencia es que en el caso del reactor por lotes se tuvo en cuenta la variación del pH (pH 7.4 - 7.6) mientras que el continuo de tanque agitado se mantuvo constante. No se consideraron los tiempos muertos en reactor por lotes. Se usó el modelo de desactivación por efecto del pH (28).

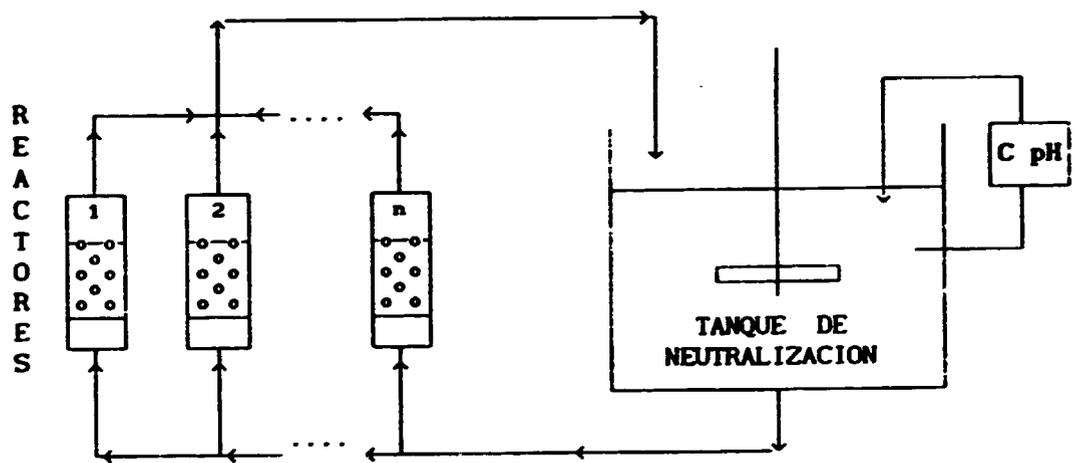


Figura 8. Reactor empacado recirculado por lotes

Tabla 1. Estabilidad operacional del biocatalizador en un reactor empacado recirculado por lotes, despues de 100 horas de uso.

(Número de columnas empacadas = 2)

(Tiempo de hidrólisis = 3 horas)

θ (Tiempo de residencia) (s)	Velocidad lineal (cm/min)	Caida de presión (psi)	actividad residual (%)	tiempo de vida media (h)
0.04**	1447	14.18	95.2	1250
0.14	453	1.74	100	
0.25	250	0.66	100	

** La alta caída de presión dificultó el control de temperatura

El tiempo de vida media del biocatalizador en función del tiempo de residencia en el RMER se presenta en la figura 9. Se observa que para obtener un tiempo de vida media elevado se requiere un tiempo de residencia menor a un segundo en el reactor de columna empacada. Para el caso del tiempo de residencia igual a 0.25 s. se obtiene experimentalmente una estabilidad mayor ($t_{1/2} = 3400h$) a la esperada según la simulación ($t_{1/2} = 2500 h$).

La actividad del biocatalizador en función del tiempo de uso se representa en la figura 10. En este caso los tiempos de cada hidrólisis tanto experimentales como de simulación fueron los mismos (3h). Los resultados presentados en la figura 10 permiten apreciar una buena correlación entre los datos experimentales y las predicciones.

Los resultados experimentales y de simulación permiten afirmar que el RMER es un sistema adecuado para lograr una buena estabilidad del biocatalizador. Con este tipo de reactor, se pueden obtener experimentalmente tiempos de vida media alrededor de 3400 horas, los cuales son mayores a los obtenidos con el reactor por lotes (1155 h).

Otra ventaja del RMER es que permite mantener casi constantes los tiempos de hidrólisis. Esto se debe a que solo la columna con el biocatalizador que ya ha cumplido su tiempo de vida util es reemplazada por una con biocatalizador fresco. Durante la anterior manipulación las demás columnas no dejen de funcionar.

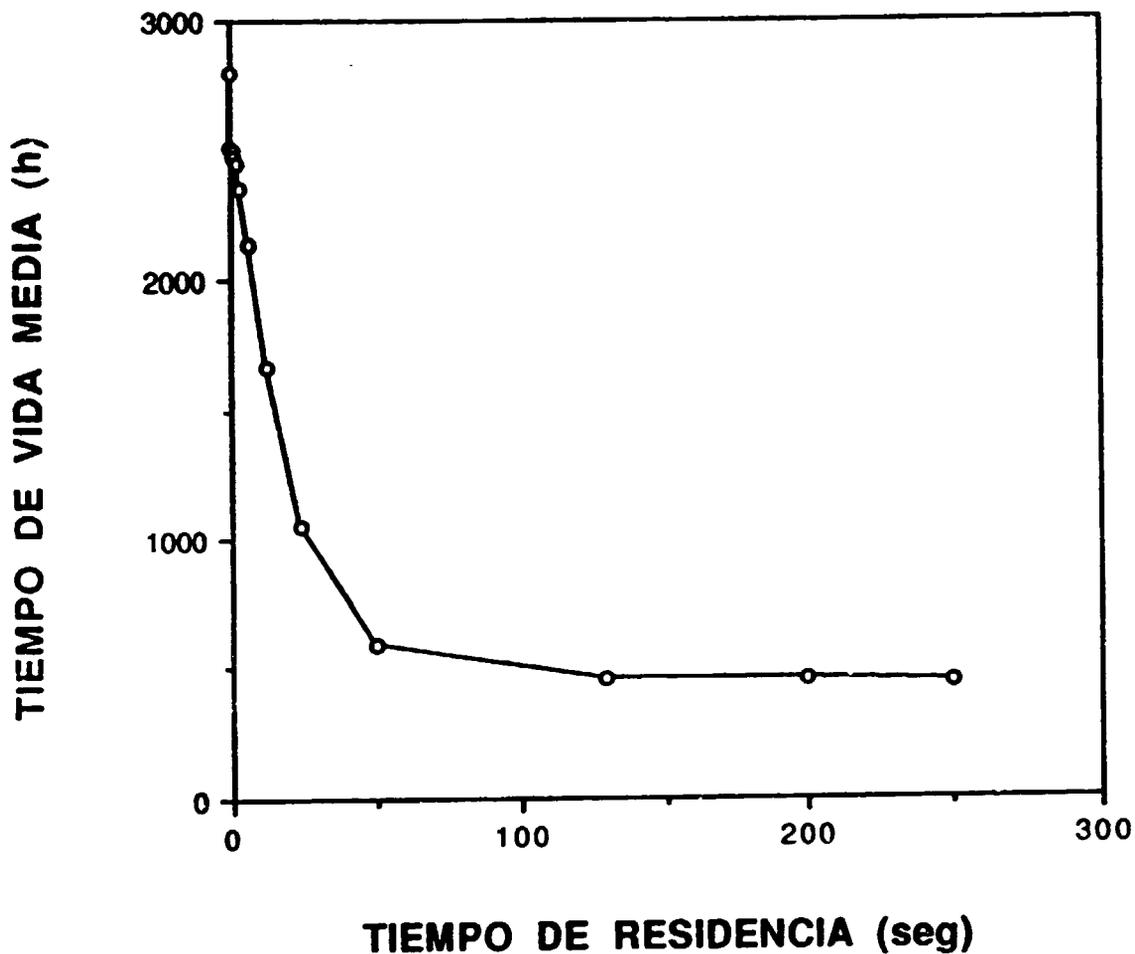


Figura 9. Estabilidad del biocatalizador en un reactor múltiple empacado recirculado por lotes (RMER). Resultados de la simulación. $T = 37^{\circ}\text{C}$, pH regulado con NH_4OH 2N, 10% de penicilina G-K, 44.5 U/g de penicilina, volumen del tanque de neutralización: 30 ml, volumen del reactor = 0.78 ml, fracción del volumen vacío = 0.5, control del pH entre 7.4 y 7.6. Tiempo de cada hidrólisis = 3 h.

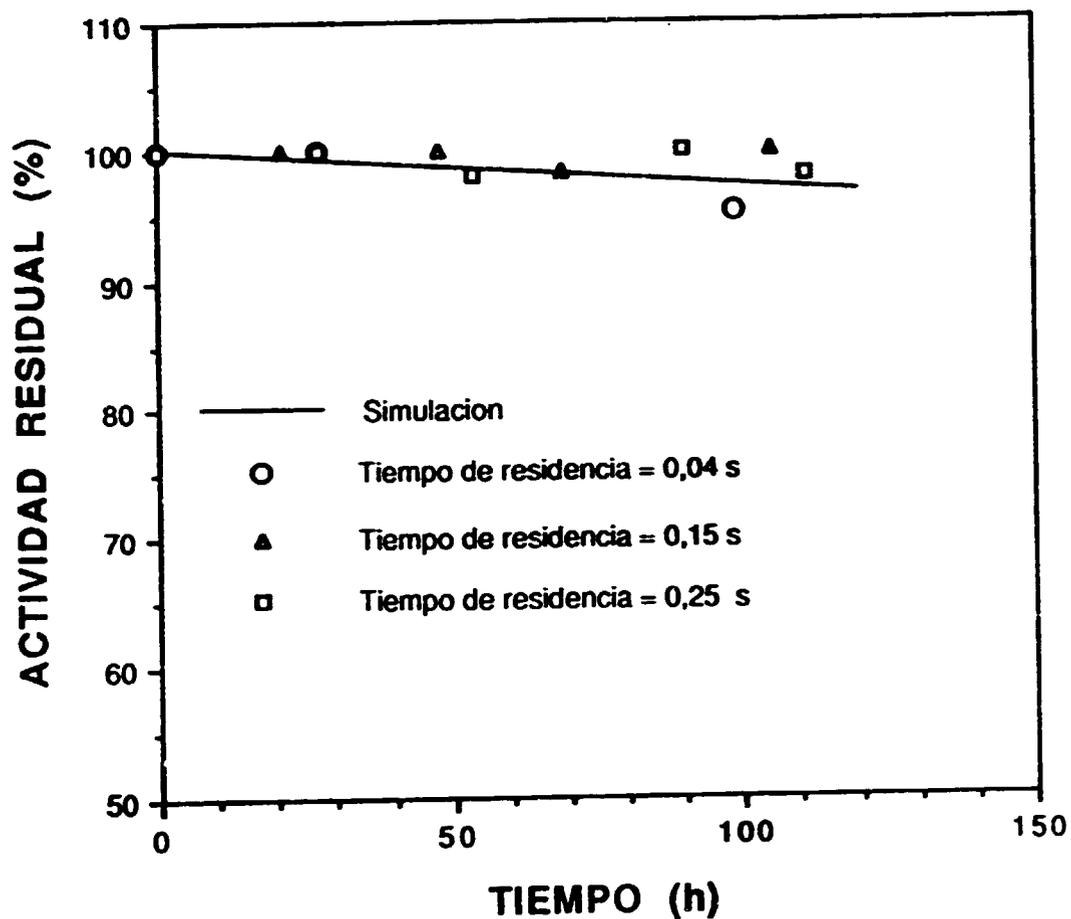


Figura 10. Actividad residual del biocatalizador en función del tiempo de uso en un reactor múltiple empacado recirculado por lotes (RMER).
 $T = 37^{\circ}\text{C}$, pH regulado con NH_4OH , 10% de penicilina G-K, 44.5 U/g de penicilina, volumen del tanque de neutralización = 30 ml, volumen del reactor = 0.78 ml, fracción de volumen vacío = 0.5, control del pH entre 7.4 y 7.6. (—) simulación. Los símbolos son resultados experimentales.

3 CONCLUSIONES

Los resultados presentados resaltan la importancia de un adecuado sistema de mezclado, de control de pH y de suministro de la base de neutralización para poder tener un tiempo de vida media de la enzima elevado y de esta manera ser más eficientes en el uso del catalizador. La simulación permite suponer que la estabilidad del catalizador puede incrementarse, a condición de contar con un adecuado sistema de regulación del pH.

La simulación permite igualmente cuantificar la desactivación a la que está sujeta la enzima en el reactor de flujo pistón. Se muestra, por medio del modelo de generación de acidez, que el pH no decrece más allá de 4.8 lo que abre las posibilidades de este tipo de reactor para nuevas PA de mayor estabilidad a la acidez, obtenidas mediante las nuevas técnicas de Ingeniería de proteínas.

Por medio de la simulación se pudo cuantificar y comparar la productividad del reactor continuo de tanque agitado con la del reactor por lotes, corroborando que para una reacción en donde la inhibición por parte del producto es importante, no es adecuado llevarla a cabo en un reactor continuo de tanque agitado.

Los resultados obtenidos de la experimentación y de la simulación del reactor empacado recirculado por lotes permiten concluir que este es el mejor sistema de reacción de los cuatro analizados en el presente trabajo. Experimentalmente, el tiempo de vida media (3400 h) del biocatalizador operando en este reactor es mucho mayor al alcanzado con el reactor por lotes (1155 h). Este hecho corrobora la hipótesis de que trabajando con el reactor empacado recirculado por lotes y a condiciones de tiempo de residencia adecuados, se evita que la enzima esté sometida a pH alcalinos. Tal situación trae como consecuencia una mayor estabilidad del biocatalizador. La simulación permite seleccionar las condiciones de tiempo de residencia adecuado para obtener una buena estabilidad.

La selección del tiempo de residencia, del número de columnas empacadas y de las dimensiones de los mismos debe ser un compromiso entre la estabilidad de la enzima, la caída de presión y los problemas difusionales.

4. BIBLIOGRAFIA

1. S. Ospina, A. López-Munguía, R. Gonzalez and R. Quintero. "Characterization and use of a penicillin acylase catalyst". J. Chem. tech. Biotechnol., (in press).
2. J. Braun, P. Le Chanu and F. Le Goffic. "The immobilization of penicillin G acylase on Chitosan". Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33 (1989), pg 242-246.
3. J. Bryjak, A. Trochimezuk and A. Noworyta. "Immobilization of penicillin acylase on acrylic carries". Bioprocess Engineering, 4 (1989), pg 99-102.
4. N. Burteau, S. Burton and R.R. Crichton. "Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase". Federation of European Biochemical Societies, Vol 258, number 2 (1989), pg 185-189.
5. L. Koilpillai, R. A. Gadre, S. Bhatnagar, R. Raman and S. Ponrathnam. "Immobilization of penicillin G acylase on methacrylate polymers". J. Chem. Tech. Biotechnol., 49 (1990), pg 173-182.
6. J. Shewale and H. Sivaraman H. "Penicillin acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA". Pocess Biochemistry, August (1989), 146-154.
7. H. Mollgaard. "Choice of reactor for semacylase: an industrial penicillin V. acylase". Enz. Eng, Vol. 501, N° 8 (1987), pg 473-476.
8. J. Park, Ch. Choi, B. Seongand M. Han. "The production of 6-aminopenicillanic acid bya multistage tubular reactor packed with immobilized penicillin amidase". Biotechnol. and Bioeng. Vol. XXIV (1982), pg 1623-1637.
9. D. Ryu, C. Bruno, B. Lee and K. Venkatasubramaniam. "Microbial penicillin amidohidrolase and the performance of a contionuos enzyme reactors system". Ferment Tecnology Today, (1972), pg 307-314.