



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

20097

SEXTO REPORTE DE AVANCE DE ACTIVIDADES DEL PROYECTO ONUDI
N° DP/RLA/83/003

PRODUCCION INDUSTRIAL DE PENICILINO AMIDASA Y SU USO PARA LA
OBTENCION DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO 6-APA

PRESENTADO POR
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CONTRATO ONUDI N°89/164
BOGOTA, Enero de 1991

ANTECEDENTES.

El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia inició su segundo año de participación en el Proyecto ONUDI N°DP/RLA/83/003, "Producción de penicilino amidasa y su uso para la obtención de ácido 6-aminopenicilánico, 6-APA" en enero de 1990. En se entregó el primer reporte del año (5° Reporte de avance de actividades), donde se informó acerca de las actividades de entrenamiento de una persona en México.

En el presente informe se hará un resumen de avance de cada una de las actividades.

ESTADO DE AVANCE DEL PROYECTO EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE ENERO Y JUNIO DE 1990 (Segundo año).

Según el contrato firmado entre la Universidad Nacional de Colombia y ONUDI las actividades a realizar durante este año fueron las siguientes:

- A. Firma del contrato.
- B. Entrenamiento en México en separación y purificación.
- C. Adquisición de equipos y reactivos.
- D. Colaboración con Vecol en hidrólisis de penicilina.
- E. Colaboración con Vecol en separación y purificación de 6-APA.
- F. Colaboración con Vecol en estudio de factibilidad técnico-económica.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Los resultados para cada una de las actividades son los siguientes:

A. Se firmó el contrato entre la Universidad Nacional y ONUDI en noviembre de 1989.

B. Se realizó el entrenamiento de una persona en México por 1 año. En junio se presentó el informe correspondiente al primer semestre y adjunto se envía el informe del segundo semestre.

C. Adquisición de equipos y reactivos.

Se compraron 100 g de catalizador a la empresa Genin S.A. de C.V. y reactivos necesarios para iniciar los ensayos preliminares.

Las actividades D. E. y F. fueron iniciadas conjuntamente con Vecol para ser finalizadas en el tercer año, según los términos de referencia de la reunión de evaluación realizada en mayo/90 en Bogotá.

Se estandarizaron las técnicas analíticas para la determinación de 6-APA y actividad del biocatalizador, así como técnicas de determinación de la calidad de las materias primas para el proceso de hidrólisis: agua y penicilina.

INFORME ECONOMICO

FECHA	PROGRAMADO (US DOLARES)	RECIBIDO (US DOLARES)
Marzo/90 Primer desembolso	4,800	4,800
Enero/91 Segundo desembolso	4,000	2,000
Tercer desembolso	700	--
TOTAL	<u>US\$ 9.500</u>	<u>US\$ 6,900</u>
Falta por recibir	<u>US\$ 2,700</u>	

INFORME DE ENTRENAMIENTO EN MEXICO

Para el entrenamiento de una persona en México se establecieron 5 actividades; el informe de junio/90 cubrió las primeras 4. Este informe corresponde a la actividad 5 del programa de trabajo.

Los objetivos de esta actividad fueron los siguientes:

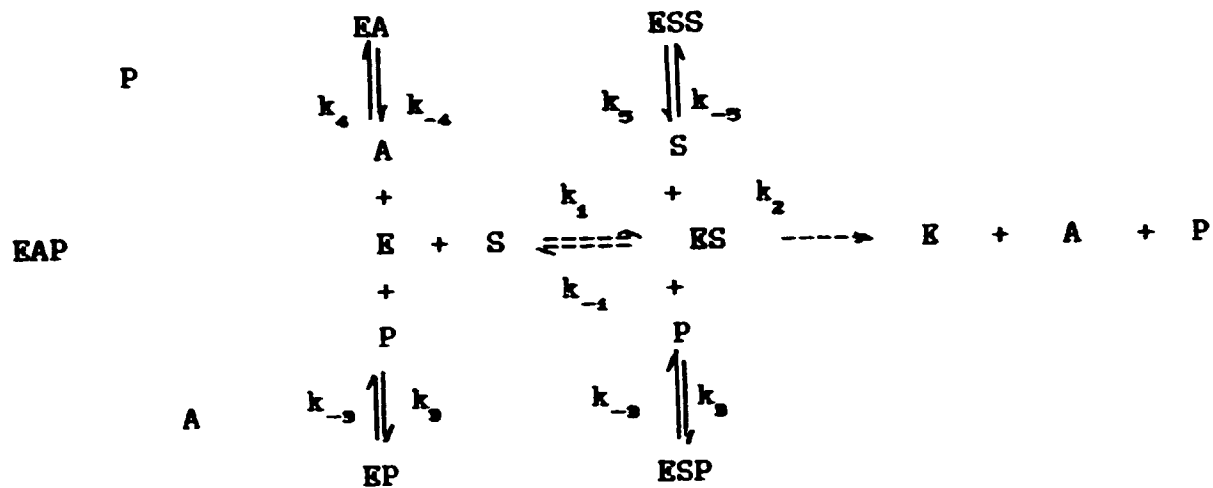
- 1) Establecer un modelo cinético que prediga el comportamiento del sistema.
- 2) Realizar una comparación del comportamiento del biocatalizador en sistema de tanque agitado operando en lotes y operando en forma continua.
- 3) Comparar el sistema de tanque agitado con el sistema en columna.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

1) MODELO CINETICO DEL BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA.

En la literatura se han reportado básicamente 3 modelos cinéticos para los biocatalizadores de penicilino amidasa: el modelo de doble inhibición, o sea la inhibición por los dos productos de la reacción, el modelo de triple inhibición, que incluye además el efecto inhibitorio de la penicilina y el modelo de triple inhibición modificado que contempla la formación de un complejo entre la enzima y los 2 productos (6-APA y AFA). Para este trabajo se utilizaron las constantes cinéticas determinadas experimentalmente y las ecuaciones de estos tres modelos fueron resueltas numéricamente con ayuda del lenguaje de simulación ISIM[®] desarrollado por Salford University Industrial Center, LTD, Salford, Inglaterra. Se analizaron estos 3 modelos y el que más se ajustó a los resultados experimentales correspondió al tercero de ellos.

Modelo de triple inhibicion modificado.



Ecuacion cinetica.

$$V_i = \frac{V_{max} S}{K_m (1 + A/K_{a5} + P/K_{a3} + P A / (K_{a3} K_{a5})) + S (1 + P/K_{a3} + S/K_5)}$$

Sin embargo, en los experimentos realizados se observó que las hidrólisis no alcanzaban el 100% de conversión, sino que se estabilizaron en un valor menor; en la literatura se cita que la reacción es reversible y que dicha reversibilidad es altamente dependiente del pH (1); se determinó la constante de equilibrio colocando una mezcla de 6-APA y AFA en presencia del biocatalizador en las condiciones de la reacción, y se observó la aparición de penicilina; se midió la concentración de 6-APA, AFA y penicilina por HPLC y se encontró una constante de equilibrio de 6295 mM.

Debido a la dificultad para introducir la constante de equilibrio en la ecuación cinética, se realizó una corrección a la ecuación, posterior a su integración, teniendo en cuenta que la conversión final no es 100 sino la diferencia con la concentración que se alcanza en el equilibrio, definida como

$$X_{eq} = \frac{S_0 - S_{eq}}{S_0}$$

siendo S_{eq} = concentración de penicilina en el equilibrio.

S_0 = concentración inicial de penicilina.

X_{eq} = conversión de penicilina en equilibrio

Utilizando la constante de equilibrio encontrada, se calculó la concentración S_{eq} para diferentes concentraciones de penicilina y posteriormente se realizó la corrección en el modelo, y se halló en cada momento la conversión corregida por el equilibrio que se define como \bar{X} que se calcula como:

$$\bar{S} = S - S_{eq}$$

$$\bar{S}_0 = S_0 - S_{eq}$$

$$\bar{X} = \frac{\bar{S}_0 - \bar{S}}{\bar{S}_0}$$

En la Tabla 1 se observan las concentraciones de penicilina S_{eq} y conversiones X_{eq} en equilibrio, calculadas para diferentes concentraciones de penicilina, así como las obtenidas experimentalmente y se observa que las segundas son menores, lo que indica que probablemente existe otro tipo de reacción.

Se decidió entonces utilizar el modelo de triple inhibición modificado y corregido por el equilibrio, pero empleando las concentraciones en equilibrio determinadas experimentalmente y resumidas en la Tabla 1, para corregir el % de conversión. Se procedió entonces a realizar ensayos de hidrólisis en tanque agitado operando en lote, y a compararlo con el modelo establecido.

2. Comparación del sistema de tanque agitado operando en lotes y el sistema de tanque continuo agitado.

TABLA 1
CONCENTRACIONES DE PENICILINA EN EQUILIBRIO EN LA REACCION DE
HIDROLISIS DE PENICILINA EN TANQUE AGITADO EN LOTE

EXPERIMENTAL			TEORICO PARA $K_{eq}=6295$ mM	
S (%)	Seq (mM)	X (%)	Seq (mM)	X (%)
2	0.0	100.0	0.0	100.0
4	4.8	95.0	1.6	98.3
6	11.5	94.6	2.9	97.9
8	19.4	93.5	5.6	97.1
10	8.2	96.5	8.2	96.5
12	15.0	94.6	10.8	95.9
15	37.0	89.0	16.1	95.2

S = concentración de penicilina inicial

Seq = concentración de penicilina en equilibrio

X = % de conversión de penicilina

2.1. Reacción en tanque agitado operando en lote.

Se realizaron ensayos de hidrólisis en tanque agitado en lote a diferentes concentraciones de penicilina (de 2 a 10%) con una concentración constante de enzima de 4.8 U/ml; estos resultados se observan en la figura 1, encontrándose buena correlación en bajas concentraciones de sustrato aunque existen desviaciones a concentraciones altas (mayores a 8%) especialmente en conversiones mayores a 80% donde el modelo predice mayores conversiones a las obtenidas experimentalmente; así, por ejemplo, realizamos una comparación a 90% de conversión, donde existen las mayores diferencias, encontramos una desviación entre 2 y 7%.

Posteriormente se realizó un ensayo a una carga constante (U de actividad/g de penicilina) y diferentes concentraciones de penicilina, como puede observarse en la figura 2. Conservando esta carga enzimática se alcanza una conversión mayor a 93% a concentraciones hasta de 12%; a 15% solo se alcanza un 88% de conversión, aún en un tiempo de 3 horas, donde la conversión se estabiliza en este valor; esto puede deberse al efecto inhibitorio de los productos (ahora en mayor concentración), razón por la cual, es aconsejable trabajar a una concentración de penicilina menor a 12%, ya que concentraciones menores producen problemas en las etapas de purificación, resultando en una menor calidad en el 6-APA obtenido. Nuevamente, la diferencia entre el modelo y los resultados experimentales, en la zona en que más se alejan es del orden de 6-10%..

2.2. Sistema de tanque agitado alimentado.

Para evitar el problema de la inhibición por sustrato a altas concentraciones de penicilina, se diseñó un sistema de tanque agitado alimentado, para lo cual se colocó inicialmente en el tanque agitado un volumen de 30 ml de buffer de reacción junto con la enzima; se adicionó la penicilina concentrada correspondiente a un 15% de PGK, a un flujo tal que al final

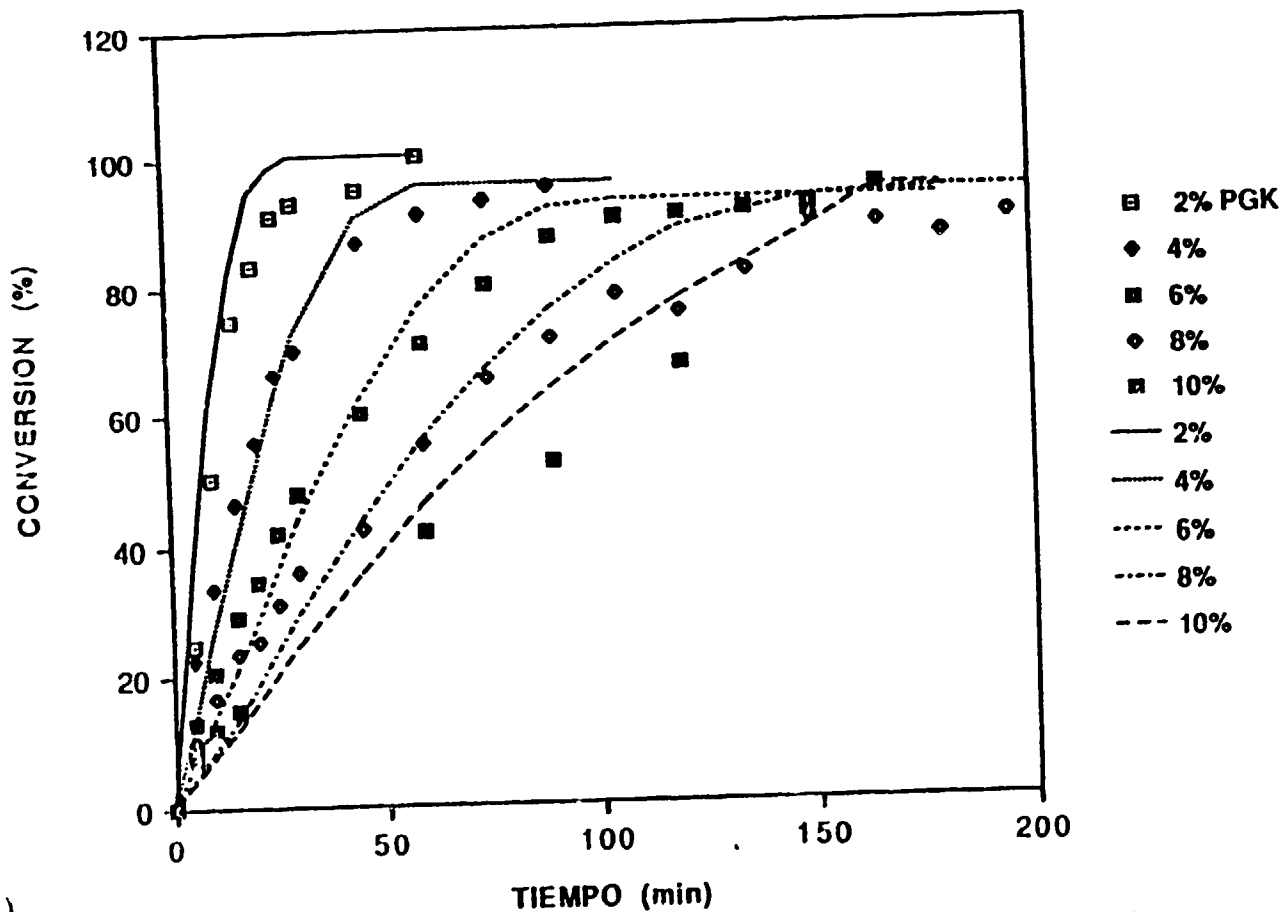


FIGURA 1 Descripción mediante el modelo de triple inhibición modificado con corrección por equilibrio (líneas continuas) de la evolución de la hidrólisis de penicilina en tanque agitado en lote a diferentes concentraciones de sustrato. 4.8 U/ml, carga variable U de enzima/ g PGK- 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M. Promedio de determinaciones.

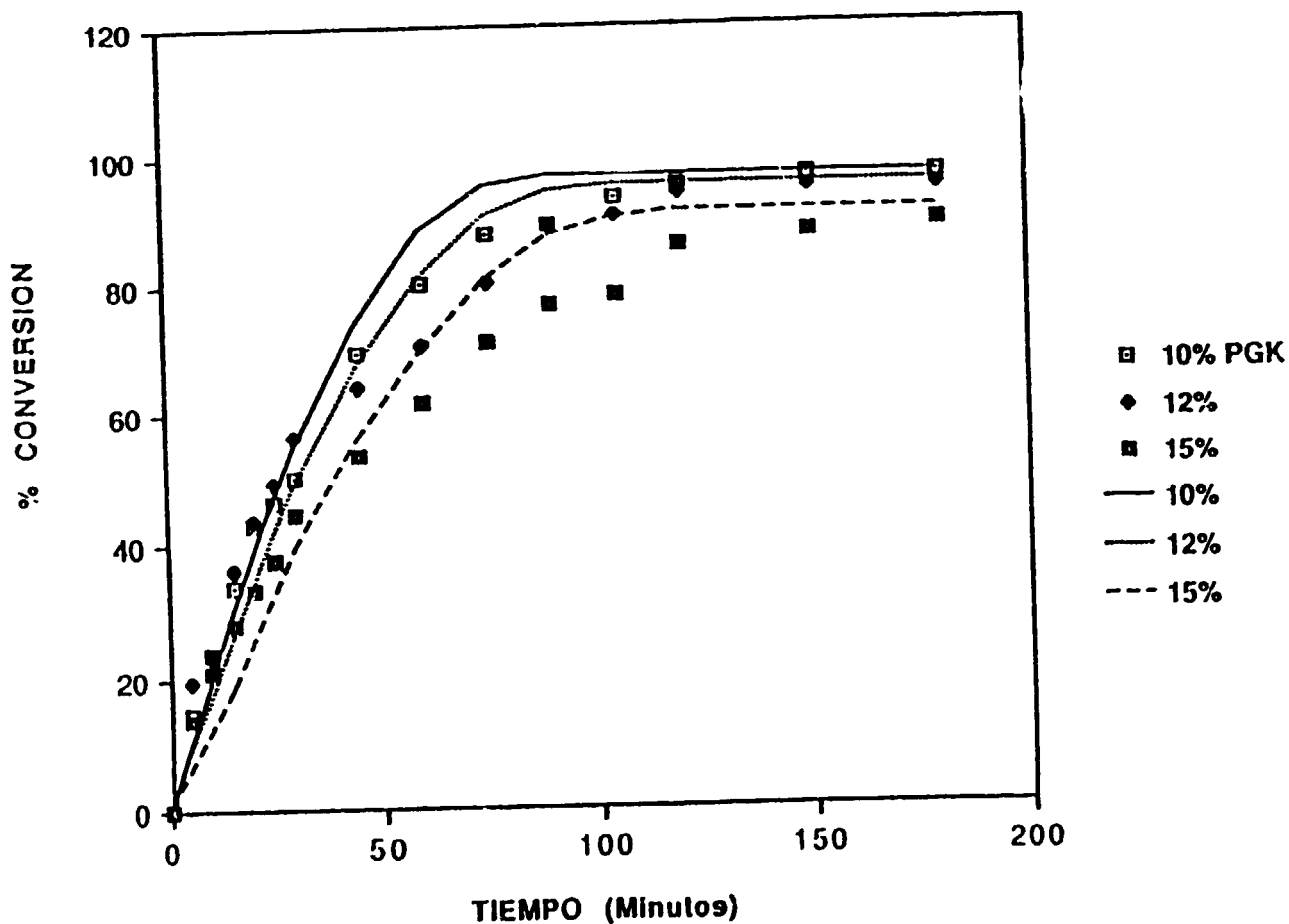


FIGURA 2 Descripción mediante el modelo de triple inhibición modificado con corrección por equilibrio (líneas continuas), de la evolución de la hidrólisis de penicilina en tanque agitado en lote a diferentes concentraciones de sustrato. 120 U/g de PGK, 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M. Promedio de 2 determinaciones.

de 2 horas (tiempo de duración del lote) se hubiera adicionado el total de la penicilina. De esta forma, la concentración de penicilina en contacto con la enzima se mantiene baja. Sin embargo, se obtuvo una conversión menor a la obtenida en el sistema en lote; este resultado indica que aunque de esta forma se elimina el efecto del exceso de sustrato, no se elimina el principal efecto que es el de inhibición por producto y la velocidad global con que se desarrolla el proceso es menor.

2.3. Sistema de tanque continuo agitado.

Para este sistema se colocó la solución de penicilina en un recipiente enfriado a 4°C de donde se transportó mediante una bomba peristáltica a un tanque donde se calentó a 37°C para ser llevada al reactor a flujo constante, y la succión se realizó por medio de otra bomba a un mayor flujo al de entrada, manteniendo el volumen constante por medio del nivel de salida.

El modelo empleado para la comparación fue el utilizado anteriormente para el sistema en lote, pero teniendo en cuenta que en estado estable el sistema permanece a una concentración de sustrato y productos constante, por lo cual la conversión es constante, la ecuación de Michaelis-Menten con las 3 inhibiciones no se integra sino que se emplea directamente para calcular el tiempo de residencia necesario para obtener determinada conversión. La ecuación de diseño para un tanque continuo agitado es la siguiente:

$$\theta = \frac{S_0 X}{V_i}$$

donde θ es el tiempo de residencia y la ecuación cinética es:

$$V_i = \frac{V_{max} S}{\left\{ K_m \left(1 + \frac{A}{K_{af}} + \frac{P}{K_{ap}} + \frac{P A}{(K_{ap} K_a)} \right) + S \left(1 + \frac{P}{K_{ap}} + \frac{S}{K_s} \right) \right\}}$$

por lo cuál:

$$\theta = \frac{X \{K_m (1 + S_0 X (1/K_{afa} + 1/K_{\alpha pa} + S_0 X / K_{\alpha pa} K_{\alpha pa})) + [S_0 (1-X)] [1 + S_0 X / K_{\alpha pa} + (S_0 (1-X)) / K_{\alpha}] \}}{V_{max} (1-X)}$$

Se realizaron ensayos a 3 concentraciones de penicilina utilizando una carga de 120 U/g de penicilina y se encontró que solo a 5% se alcanzaba una conversión mayor a 93%, con un tiempo de residencia de 200 minutos (3.3 horas), a concentraciones mayores la conversión alcanzada era menor. Estos resultados se aprecian en la figura 3; el modelo describe adecuadamente el sistema a concentraciones bajas de sustrato alejándose de los resultados experimentales especialmente a conversiones altas (tiempos de residencia altos).

Posteriormente se realizaron ensayos a 10% de penicilina, variando ahora la carga de enzima, observando que un aumento en la carga de enzima de 120 a 160 U/g no produjo un incremento en la conversión. Los resultados se aprecian en la figura 4.

En general se observa que las conversiones obtenidas en el sistema de tanque agitado continuo en todos los casos son menores a las alcanzadas en sistema en lote, lo cual se debe a que en el estado estacionario, la enzima está siempre en contacto con una alta concentración de productos, que es la concentración a la salida, por lo que en todo momento, el efecto inhibitorio de los mismos es elevado; esto no ocurre en el sistema en lote, en el cuál la concentración de productos aumenta a medida que avanza la reacción por lo que la inhibición al principio es baja y se alcanzan mayores velocidades de reacción (2).

Los experimentos realizados, permiten concluir que el sistema óptimo para la utilización del biocatalizador de penicilino amidasa es el tanque agitado operando en lotes, con el cuál es posible alcanzar la conversión requerida en un tiempo adecuado,

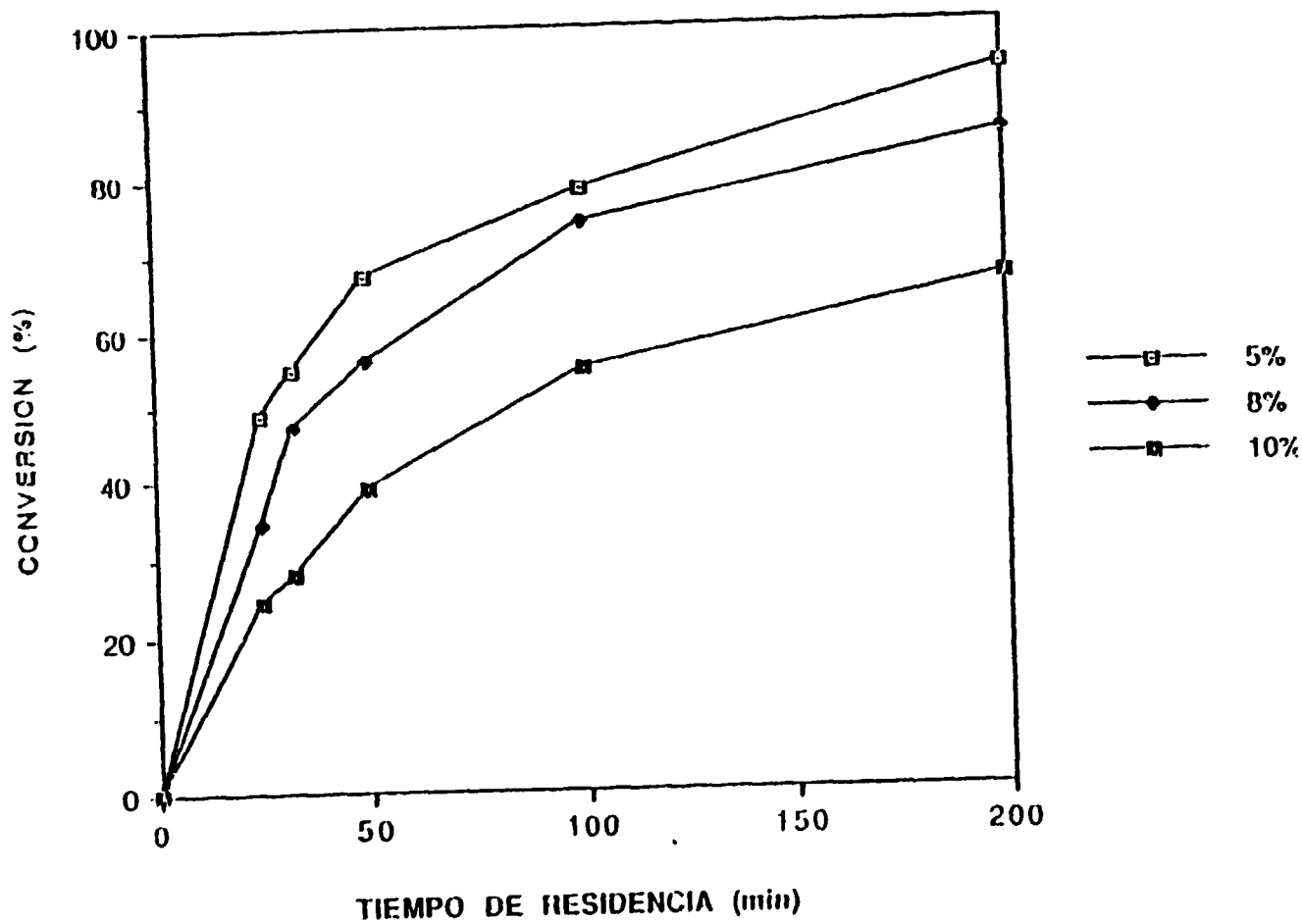


FIGURA 3 Reacción de hidrólisis de penicilina en reactor de tanque continuo agitado. Efecto del tiempo de residencia en el % de conversión a diferentes concentraciones de sustrato. 120 U/g de PGK, 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con NH₄OH 2 M. Promedio de 5 determinaciones.

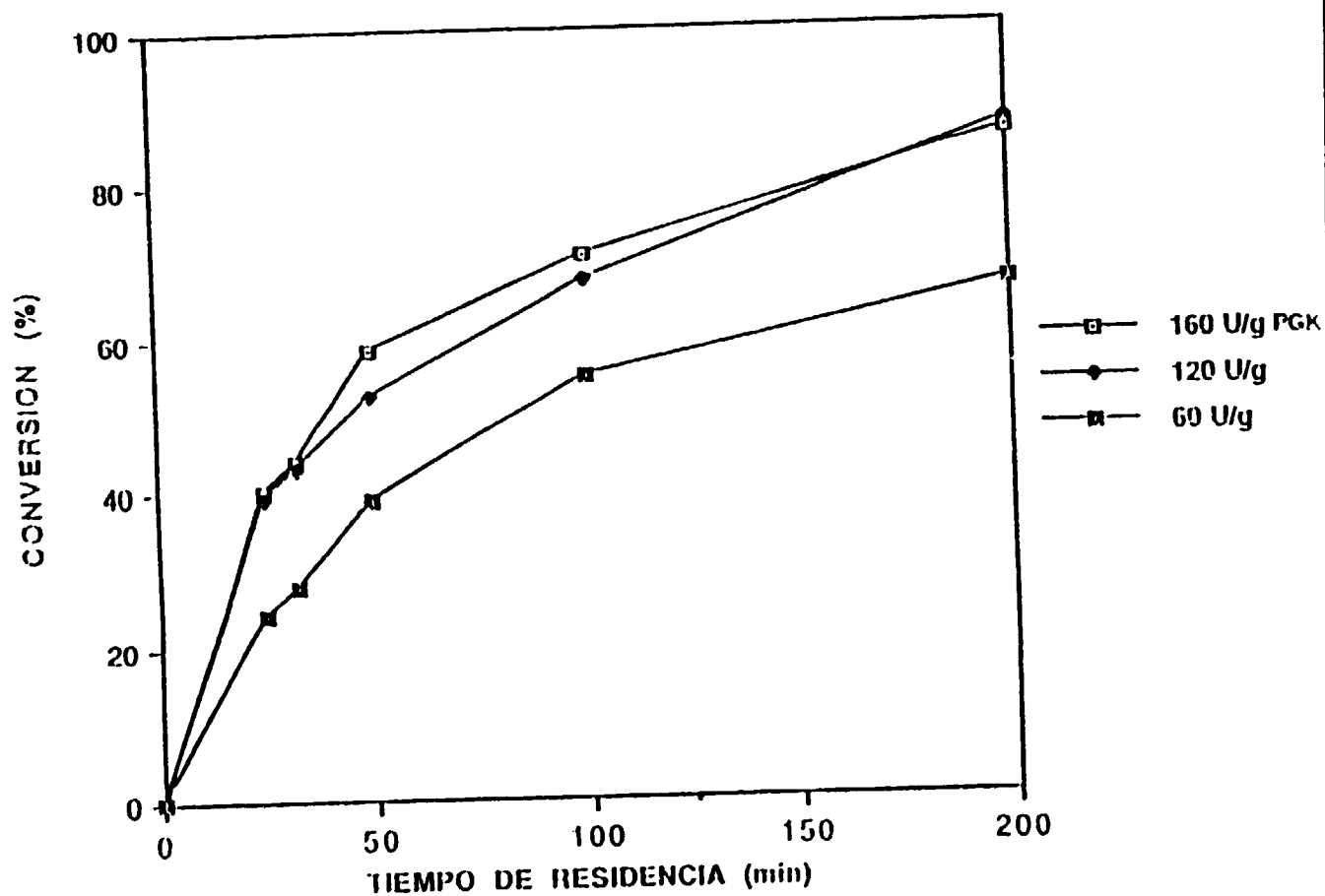


FIGURA 4 Reacción de hidrólisis de penicilina en el reactor de tanque continuo agitado. Efecto del tiempo de residencia en el % de conversión a diferentes cargas de enzima. 12 U/mL, 10% de PGK, 37°C, pH 7.5, amortiguador de fosfatos 0.03 M, ajuste de pH con HClO₄ 2 M. Promedio de 5 determinaciones.

para obtener un producto de calidad aceptable. La concentración de penicilina que debe ser empleada es 10 a 12 %, para obtener, por una parte una concentración suficiente de 6-APA que permita una recuperación adecuada (ya que el empleo de menores concentraciones produce un 6-APA diluido que aumenta los costos de extracción) y por otra parte evitar la inhibición por exceso de sustrato.

No se realizaron ensayos en reactor en columna, ya que la literatura indica que el uso de una columna produce un perfil de pH que disminuye la velocidad de reacción a la vez que produce una mayor degradación del biocatalizador; por otra parte, para realizar el montaje de columnas en serie se requieren varios sistemas de control de pH y un sistema en paralelo requiere de un sistema complejo (3,4,5).

2.4. Productividad del sistema en lote.

Un factor muy importante que permite la evaluación del biocatalizador frente a otros del mismo tipo es la productividad, definida como los Kg de 6-APA que se pueden producir por Kg de biocatalizador empleado.

Este parámetro depende de varios factores:

1. De la cinética de la reacción, siendo variables importantes la carga enzimática (que define la V_{max}), la concentración de sustrato empleada, y la conversión requerida.
2. De la estabilidad del biocatalizador, que depende como se pudo apreciar, de la temperatura y el pH.

Se consideró por esta razón que la mejor forma de evaluar este parámetro era mediante la utilización del modelo cinético acoplado al modelo de desactivación de la enzima. Para ello se realizaron los siguientes cálculos, mediante el lenguaje de simulación ISIM, como se observa en el anexo.

1. Se definió la productividad por lote, como los g de 6-APA/g de catalizador.h.

2. Se definió el rendimiento por lote, como los g de 6-APA/g de catalizador correspondientes al 95% de conversión, empleando una concentración de penicilina de 10%, pH 7.5 y temperatura de 37°C.

2. Con el modelo cinético se calculó el tiempo requerido para alcanzar el 95% de conversión para cada lote.

3. Mediante el modelo de desactivación de primer orden se calculó la pérdida de actividad que ocurre conforme transcurre cada ciclo, considerando el tiempo transcurrido desde el primer ciclo.

4. Se sumó el rendimiento correspondiente a cada ciclo, para obtener el rendimiento total, que en los catalizadores industriales es denominado productividad.

En la figura 5 se observa la variación del rendimiento con el número de ciclos. El rendimiento obtenido para un tiempo de vida media (1155 horas) es de 510 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, que es un valor que se encuentra dentro de los reportados para los catalizadores industriales; la productividad promedio es 0.450 g 6-APA/g biocatalizador.h. Esto indica que el catalizador puede competir con los biocatalizadores industriales, si se emplea al menos durante un tiempo de vida media. En este tiempo se llega a ciclos de 2.5 horas, que es un tiempo adecuado para la reacción. Si el biocatalizador se emplea por dos tiempos de vida media, se logra un rendimiento de 780 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador, sin embargo el ciclo se extiende a 5 h, que ya es un tiempo demasiado largo y con riesgo para el producto, si se tiene en cuenta que al prolongarse la reacción, ocurren reacciones secundarias indeseables; además, la productividad disminuye a 0.33 g de 6-APA/g de biocatalizador.h.

Por esta razón se considera que el biocatalizador debe ser empleado por un tiempo de vida media (1155 horas), a pH 7.5 y 37°C

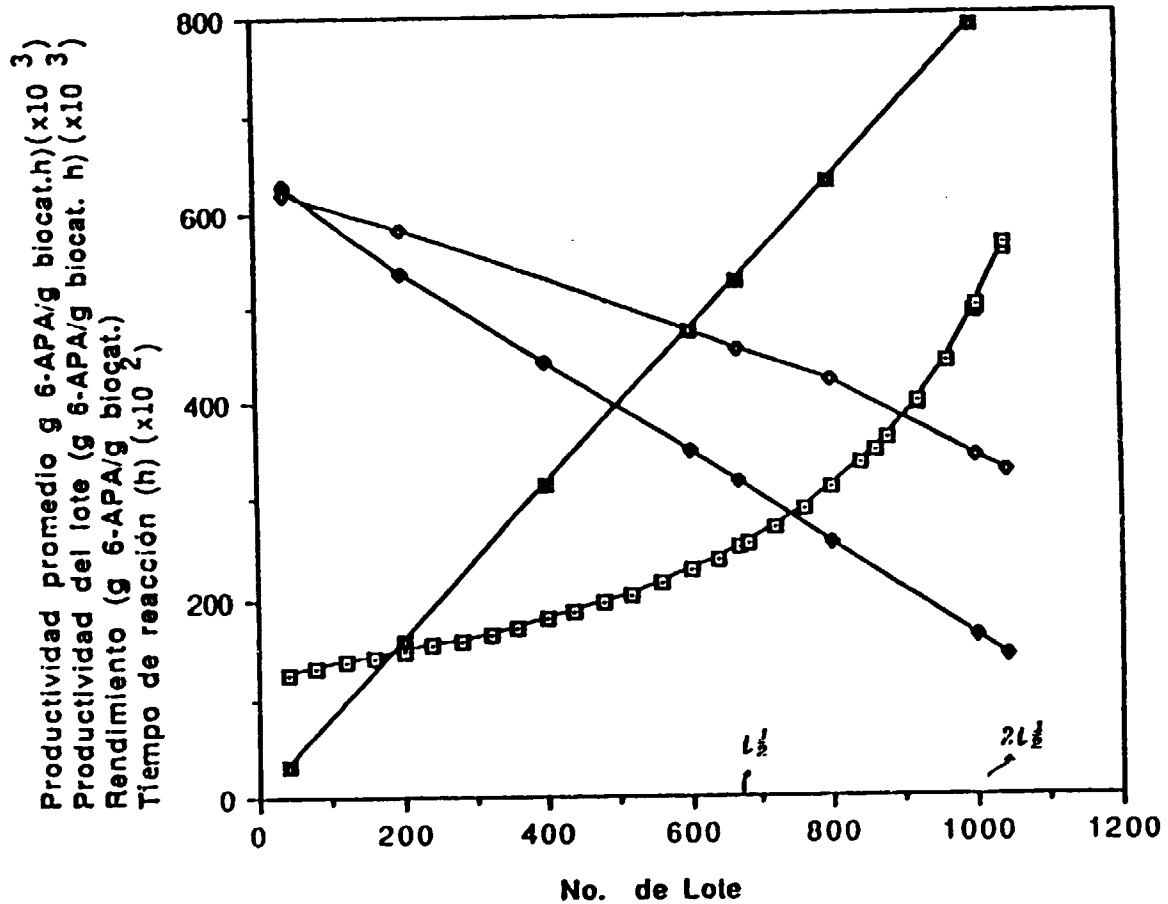


FIGURA 5 Efecto del número de lotes en la productividad del biocatalizador de penicilino amidasa y en el tiempo de la reacción tomando en cuenta su desactivación. Estudio realizado por simulación empleando el modelo de triple inhibición con equilibrio y la desactivación de primer orden. Condiciones de cálculo: 10% de PGK, 37°C, pH 7.5, carga de enzima 120 U/g de PGK.

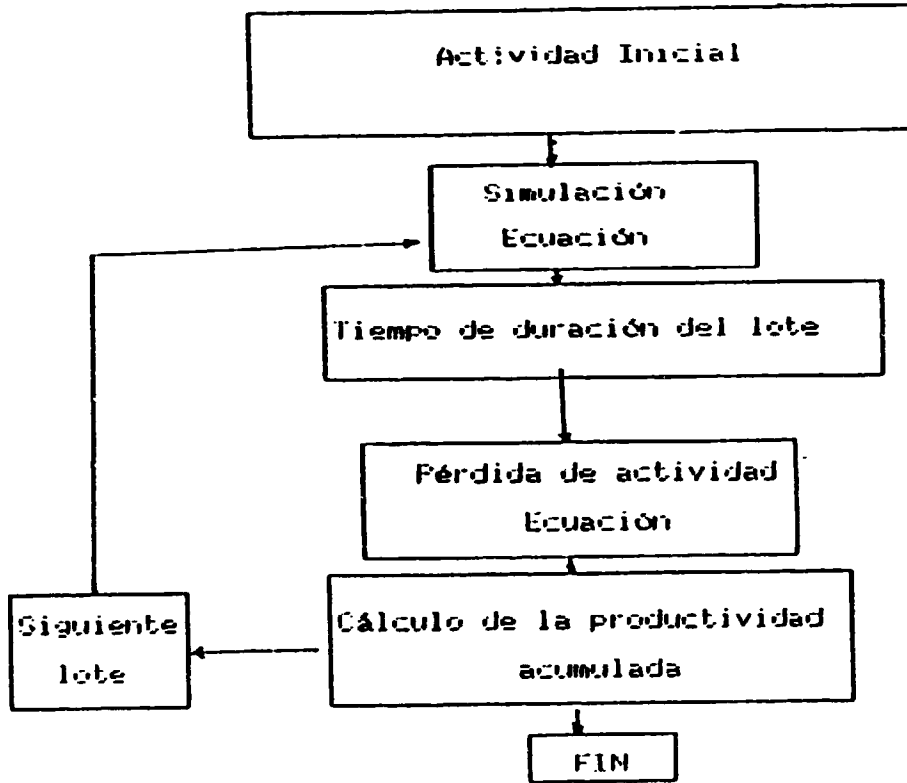
con bencilpenicilina potásica al 10% en reactor de tanque agitado por lote, para obtener un rendimiento de 510 Kg de 6-APA/Kg de biocatalizador y una productividad promedio de 0.45 g de 6-APA/g de biocatalizador.h para un 95 % de conversión, empleando una concentración de penicilina de 10%. Bajo estas condiciones el biocatalizador se compara favorablemente con los biocatalizadores industriales (5).

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Haagensen, P., *et al.* (1983). The kinetics of penicillin V deacylation on an immobilized enzyme. *Biotechnol. and Bioeng.* 25: 1873-1895.
- (2) Warburton, D., Dunnill, P., and Lilly, M.D. (1973). Conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid in batch reactor and continuous feed stirred tank reactor using immobilized penicillin amidase. *Biotechnol. and Bioeng.* 15: 13-25.
- (3) Savidge, T.A. (1984). Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. en: Vandame, E.J. (Ed). *Biotech. of Ind. Antib.* Marcel Dekker. New York. 172-224.
- (4) Mollgaard, H. (1987). Choice of reactor for semacylaseTM. An industrial penicillin V acylase. *Enz. Eng.* 501, 8: 473-476.
- (5) Shewale, J.G. and Sivaraman, H. (1989). Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. *Proc. Biochem.* 146-154.

ANEXO 3

PROGRAMA DE SIMULACION PARA DETERMINAR LA PRODUCTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR DE PENICILINO AMIDASA



ANEXO :

PROGRAMA DE SIMULACION PARA DETERMINAR LA PRODUCTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR
DE PENICILINA AMIDASA

```

3 1
1 : ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA PENICILINA ACILASA
2 : BASADO EN CINETICA DE DESACTIVACION DE PRIMER ORDEN
3 : DE LA ENZIMA. UN MODELO DE TRIPLE INHIBICION CORREGIDO
4 : POR EL EQUILIBRIO Y REACCIONES EN LOTE.
5 CONSTANT VFO=0. KF=0. CF=0. FO=0. CS=0. CP=0. SEQ=0
6 CONSTANT H=0. TV=0. PD=0. PR=0. VFO=0
7 CONSTANT CINT=5. T=0. TFIN= 500
8 PRINT "Especifique VFO (Vmax mM/min). KF (Km mM). CF "
9 PRINT "(Ki del fenilacetico mM). CP (Ki del 6-APA mM)"
10 PRINT "CS (Ki del sustrato mM). FO (S0 de penicilina. mM)"
11 PRINT "SEQ (Concn. penicilina en equilibrio, mM)"
12 PRINT "KD (cte desactivacion 1er orden min-1)"
13 : Para la carga recomendada de catalizador (120U/g pen) y con
14 : la actividad del catalizador GENIN (170 U/gcat) con 95% de
15 : conversion. El rendimiento por lote es de 0.787 g 6apa/g cat. y

16 : la productividad es este valor dividido entre el tiempo de
17 : duracion del lote: R es rendimiento y PR productividad.
18 : PL es la productividad de cada lote. equivalente a 0.787 g
19 : de 6 apa que se producen por lote entre TC, su tiempo de
20 : reaccion.
21 :
22 PRINT "PRO (productividad g 6APA/g cat. lote)"
23 N=0
24 PD=0
25 TC=0
26 PL=0
27 TV=0
28 1 RESET
29 INTERACT
30 :
31 20 H=N+1
32 TV=TV+TC
33 VF=VFO*EXP(-KD*TV)
34 IF(N.EQ.1) GOTO 50
35 PD=(60*PRO*(N-1))/TV
36 R=0.787*(N-1)
37 PL=(0.787*60)/TC
38 GO TO 51
39 50 PR=0
40 PL=0
41 R=0
42 51 TAH=TV/60
43 PRINT " "

```

```

44 PRINT "Tiempo acumulado (hr)=" .TAH
45 PRINT "lote #", N-1."duracion (min)=" .TC. "Vmax=" .VF
46 PRINT "Productividad del lote (Kg bapa/Kg cat^h)=" .PL
47 PRINT "Productividad acumulada (Kg bapa/Kg cat^h)=" .PD
48 PRINT "Rendimiento acumulado (Kg bapa/Kg cat)=" .R
49 :
50 :
51 SIM
52 GO TO 1
53 :
54 INITIAL
55 T=0: YZ=FO
56 DYNAMIC
57 : Inhibicion Competitiva, Nocompetitiva y Sustrato
58 I=FO-YZ
59 R1=1+I/CP
60 R3=1+I/CF+I/CP+I^2/(CF*CP)
61 :Modelo 11.....Enz. Microb. Technol. 1982.4.35
62 YZ'=- (VF*YZ)/((YZ*R1)+(KF*R3)+(YZ*YZ/CS))
63 X2=(FO-YZ)/FO
64 :
65 :tres inhibiciones. correccion por equilibrio
66 X2=(FO*X2-SEQ)/FO
67 TERMINATE (X3.GT.0.95)
68 TC=T
69 PREPARE T,X3
$ VAL VFO = 12.000
$ VAL KF = 4.1700
$ VAL PRO = 0.78700
$ VAL ED = 0.10000E-04
$ VAL CP = 100.70
$ VAL VF = 12.000
$ VAL CF = 68.600
$ VAL CS = 430.00
$ VAL SEQ = 8.2000
$ VAL FO = 268.00

```