



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> 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](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

19125

26 p.  
tablas

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA  
AMERICA LATINA Y EL CARIBE  
PNUD/UNESCO/ONUDI  
RLA/83/003**

**Contrato No. 90/045**

**Proyecto: Producción Industrial de Penicilin Amidasa  
y su uso para la obtención del ácido  
6-aminopenicilánico (6-APA)**

**2do. Año de Actividades**

**País: Cuba**

**Segundo Informe Técnico (Final)**

SEGUNDO REPORTE TECNICO DEL PROYECTO

ONUOI No. DP/RLA/93/003

(20 AÑO DE ACTIVIDADES)

"PRODUCCION INDUSTRIAL DE PENICILIN-AMIDASA Y SU  
USO PARA LA OBTENCION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO"

QUE PRESENTA: IMEFA-CIGB (CUBA)  
Nº DE CONTRATO ONUOI  
90/045

LA HABANA, CUBA, ABRIL DE 1991

## ANTECEDENTES

El presente informe cubre la segunda mitad del segundo año del proyecto GNUJ No. DP-PIA/83/003, "Producción industrial de penicilin-amidasa y su uso para la obtención del ácido 6-aminopenicilánico".

Durante el primer año de actividades se entrenó al personal cubano en las instalaciones de Benin S.A. de C.V. en México, en la producción del biocatalizador y del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), a nivel de laboratorio y de planta piloto. Además, se inició la producción de 0,5 kg de biocatalizador en las instalaciones del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba.

El segundo año de actividades comenzó para Cuba en marzo de 1990, por las razones ya explicadas en el primer informe, entregado en agosto pasado. Para este periodo de actividades, se programó la producción de 0,5 kg (en una primera etapa) y de 2,0 kg (en una etapa posterior), de biocatalizador de penicilin-amidasa en instalaciones cubanas; la evaluación del potencial de transferencia al sector industrial de la tecnología desarrollada; la concepción de la instalación industrial para la realización de las pruebas de hidrólisis de penicilina con el biocatalizador producido. Se programó además, la participación de un

analista cubano en la confección del Libro Negro de la tecnología escalada.

En los primeros seis meses de trabajo, se produjeron los primeros 2 kg de biocatalizador. Se comenzó la producción de los 2 kg restantes; se concluyó lo referente al potencial de transferencia al sector industrial y se efectuó la visita a México, con el objetivo de participar en la confección del Libro Negro de la tecnología a escala piloto.

En los seis meses finales del segundo año, se terminó la producción de los 2 kg de biocatalizador, incluyendo su control de calidad y se concibió la instalación para la realización de pruebas de hidrólisis de penicilina con el biocatalizador

producido. Además se participó en la reunión técnica del proyecto, realizada en Bogotá, Colombia, en agosto pasado y en el Primer Congreso Iberoamericano de Biotecnología, celebrado en San José, Costa Rica en noviembre de 1990, donde se presentaron los resultados alcanzados por los participantes en el proyecto.

Se describen los objetivos fijados para el segundo año de actividades, en mayor grado de detalle.

## OBJETIVOS

Los objetivos de trabajo y las actividades a desarrollar por Cuba en esta etapa fueron los siguientes:

B-Evaluar el potencial de transferencia al sector industrial de la tecnología desarrollada:

- B.1 Sondeo de mercado
- B.2 Ingeniería conceptual del proyecto
- B.3 Evaluación económica financiera.

C-Producir 0,5 kg de biocatalizador con las siguientes características: actividad 120-150 U/g, expresión total 50%, estabilidad en las condiciones de operación en ausencia de penicilina G 60% de retención de la actividad inicial en 800 horas.

- C.1 Producción de la enzima penicilino amidasa necesaria para producir 0,5 kg de biocatalizador
- C.2 Realizar control de calidad de la enzima producida
- C.3 Purificación de la enzima necesaria para 0,5 kg de biocatalizador
- C.4 Producción de 0,5 kg de biocatalizador

C.5 Realizar control de la calidad del biocatalizador según estándares señalados en los objetivos del proyecto.

D.1 Producir 2 kg de biocatalizador con las siguientes características: actividad 100-150 U/g. expresión total 50%. Estabilidad en las condiciones de operación en ausencia de penicilina 5 60% de retención de la actividad inicial en 900 horas.

D.1 Producción de la enzima penicilina amidasa necesaria para producir 2 kg de biocatalizador

D.2 Realizar control de calidad de la enzima producida

D.3 Compra de equipamiento necesario para la purificación de la enzima producida

D.4 Purificación de la enzima necesaria para 2 kg de biocatalizador

D.5 Producción de 2 kg de biocatalizador

D.6 Realizar el control de calidad del biocatalizador según estándares señalados en los objetivos del proyecto.

E. Concepción de la instalación industrial para la realización de las pruebas de hidrólisis de penicilina con el biocatalizador producido.

- E.1 Diseño de la instalación
- E.2 Selección de los equipos necesarios
- E.3 Solicitud de ofertas de equipamiento.

Participación de un especialista cubano durante 15 días en la operación del Libro Negro de la tecnología a escala piloto, en las instalaciones de Genin, México.

Las actividades B, C y F se cumplieron totalmente durante el primer semestre del segundo año de trabajo; la actividad D se cumplió parcialmente, quedando para este segundo semestre el cumplimiento de esta actividad y la actividad E.

## METODOLOGIA

Se emplearon las siguientes técnicas analíticas:

- Determinación de proteína (Lowry, 1951)
- Determinación de 6-APA por p-dimetilaminobenzaldehído (Rajasingham, 1972).

### Estrategia experimental

Se partió de las biomásas producidas con anterioridad y almacenadas a -20 C. Las disrupciones celulares se realizaron en



se usó un rotor de bolas Dynacell, modelo KD-15, utilizando perlas de vidrio entre 0,1 y 0,2 mm de diámetro.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Sharpless, modelo AS-16 y las precipitaciones se llevaron a cabo en tanques acrílicos encaquetados, de acero inoxidable AISI 316, de 50 L de volumen de trabajo. Como fluido de enfriamiento se utilizó una mezcla de etilenglicol-agua, enfriada a 0 C.

Las filtraciones se realizaron en un equipo Amicon DC-30, equipado con tres cartuchos de fibra hueca, con un punto de corte (cut-off) de 30 000 dalton.

La purificación cromatográfica de la enzima se efectuó en una columna K 113/15 (Farmacia-LKB), operada bajo los mismos criterios reportados con anterioridad.

Las inmovilizaciones se realizaron en dos reactores de 15 L de volumen total, en lotes de 500 g.

Las pruebas de control de calidad se realizaron siguiendo, estrictamente, la metodología establecida para ello, según se especifica en los documentos del proyecto.

En la concepción de la instalación industrial para la realización

En las pruebas de hidrólisis de penicilina, con el biocatalizador producido, se utilizó toda la información disponible del proyecto, relacionada con las pruebas de hidrólisis a escala de laboratorio. Además se tuvo en consideración el acuerdo tomado en la reunión del proyecto, de agosto de 1990, donde se modifica la cantidad de penicilina G a hidrolizar a 0,1 ton.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ACTIVIDAD D

durante la primera parte de este segundo año de trabajo, se produjeron y almacenaron a  $-20\text{ C}$ , 1 894 490 unidades de la enzima en forma de biomasa. Alícuotas de estas biomásas se testaron periódicamente durante su almacenamiento, con el objetivo de comprobar su estabilidad al almacenarse bajo estas condiciones, así como para proceder a su procesamiento inmediato, en caso de detectarse alguna anomalía.

El período transcurrido entre las fermentaciones y el procesamiento de las biomásas, osciló entre los tres y cuatro meses, verificándose la posibilidad de almacenamiento bajo estas condiciones, tal como se refleja en la Tabla 1.

TABLA 1

ESTABILIDAD DE LAS BIOMASAS ALMACENADAS

FORM. No.	ACT. ESP. INIC.	ACT. ESP. FINAL	%RECUP.
	U/ mg prot.	U/ mg prot.	
5	0,201	0,195	97,0
7	0,213	0,206	96,7
10	0,225	0,219	97,3
11	0,211	0,207	98,1

total se recuperaron 1 842 822 unidades, para un 97,3 % de recuperación.

Los cuatro lotes de biomásas almacenadas, se procesaron según lo establecido en el Libro Negro de la Tecnología, escalada a nivel de Planta Piloto. Para esto se aprovecharon las experiencias acumuladas en el primer semestre del año, cuando se produjeron 500 g de biocatalizador y se estudiaron las condiciones de producción en la planta piloto del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana.

Los lotes de biomásas se resuspendieron en el buffer indicado para su disrupción celular, a las condiciones estudiadas para la disrupción. En cada caso se obtuvieron entre 30 y 35 L de crema para la ruptura celular.

Las cremas para las disrupciones fueron sometidas a los siguientes pasos de precipitación, según lo indicado. En estos pasos se emplearon tanques encaquetados móviles, de 50 L de volumen de trabajo. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga Sharpless modelo AS-16.

De manera general, se reprodujeron los pasos de procesamiento establecidos en el Libro Negro de la Tecnología, implementados para la producción de los primeros 500 g de biocatalizador en el

como: sesestre de este año de trabajo. La única diferencia estriba en que se procesaron volúmenes ligeramente superiores, aunque en el mismo rango de trabajo. Por ejemplo, los volúmenes procesados en el primer periodo fueron de 10 a 20 L, y en este periodo de 30 a 35 L.

Para la purificación cromatográfica de los lotes de producción, se realizó en la misma columna utilizada previamente (K 113/15), cargada con 1 L de CM Sepharosa Fast Flow. Originalmente se había concebido la utilización de una columna de mayor tamaño, pero como que la entrega del equipamiento por parte de los administradores se dilataba más de lo planeado, se decidió emplear la columna anterior. Para ello, cada lote de producción se subdividió en dos partes iguales (en volumen), y se aplicó por separado. Los eluatos de cada lote se reunieron nuevamente, procediéndose a continuación al ajuste de condiciones y a la inmovilización.

La inmovilización de los lotes se llevó a cabo a las condiciones preestablecidas, esto es:

$$\text{pH} = 8,00 \pm 0,05$$

$$T = 23,0 \pm 0,2$$

$$\text{rpm} = 100 \text{ min}^{-1}$$

En continuación se muestran las tablas que resumen los resultados  
del trabajo.

**TABLA 2**

**RECORDADOS DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO**

ETAPA DEL PROCESO	RECUP %	RECUP ACUM. %	U. TOTAL
<b>ETAPA 1</b>	92	92	375 235
DISPERCION	87	80	326 454
TRATAMIENTOS	65	52	212 195
DIASFILTRACION	90	47	190 976
CROMATOGRAFIA	72	34	137 503
INMOVILIZACION	65	22	89 377
<b>ETAPA 2</b>	93	93	495 723
DISPERCION	90	84	446 151
TRATAMIENTOS	68	57	303 382
DIASFILTRACION	92	52	279 112
CROMATOGRAFIA	70	37	195 378
INMOVILIZACION	63	23	123 088
<b>ETAPA 3</b>	92	92	515 846
DISPERCION	87	80	448 786
TRATAMIENTOS	70	56	314 150
DIASFILTRACION	89	50	279 594
CROMATOGRAFIA	72	36	201 307
INMOVILIZACION	65	23	130 850



ETAPA DEL PROCESO	RECUP %	RECUP ACTM. %	U. TOTAL.
ETAPA A	93	98	456 018
DISRUPTION	93	87	424 097
TRATAMIENTOS	75	65	318 073
ULTRAFILTRACION	93	60	295 907
CROMATOGRAFIA	63	38	186 359
INMOVILIZACION	64	24	119 270

TABLA 3

RESUMEN DE RECORRIDOS

CANTIDAD	FERMENTACION		ALMACENAJE		PURIF-INMOVIL.	
	U.T.	%	U.T.	%	U.T.	%
407 200	407 200	100	375 235	92	89 377	22
534 000	534 000	100	495 723	93	123 028	23
544 000	544 000	100	515 846	92	130 850	24
489 000	489 000	100	456 018	93	119 270	24
TOTAL	1 974 200	100	1 842 822	92	462 585	23

TABLA 3

CARACTERISTICAS DE LOS LOTES DE BIOCATALIZADOR

LOTE Nº	MASA G	ACT. ESP. UNO P.H.	ESTABIL. 800 H %	OPERAC. 1100 H %	CONVERSION %
1	458	195	58	55	92.5
2	703	175	62	53	91.1
3	727	190	61	55	92.3
4	628	190	60	57	90.8
TOTAL	2516				

NOTA: El % de conversión es la media de 10 hidrólisis realizadas bajo condiciones estándar.

## ACTIVIDAD E

En esta actividad se realizó como primer aspecto el cálculo del número de reacciones a realizar. Para ello se tomaron en consideración los siguientes puntos:

Cantidad de P.G. a hidrolizar: 100 kg

Cantidad de biocatalizador disponible: 2100 g

Relación biocatalizador/P.G.: 100-120 U/g P.G.

Concentración de la P.G. a hidrolizar: 100 g/L

Actividad esp. del biocatalizador: 175-195 U/g P.H.

Pureza de la P.H. disponible: 86 %

## CÁLCULOS.

Condiciones menos favorables:

Relación biocatalizador/P.G. : 120 U/g P.G.

Actividad específica del biocatalizador : 175 U/g peso húmedo

Relación de biocatalizador/gramo de P.G. :

$$120/175 = 0,69$$

Condiciones más favorables:

Relación biocatalizador/PFK : 100 U/ g PFK

Actividad específica del biocatalizador : 195 U/g peso húmedo

Carga de biocatalizador/gramo de PFK :

$$100/195 = 0,51$$

Pureza de la PFK : 86 %

Cantidad de PFK a hidrolizar : 100 kg

Concentración de la solución de PFK a hidrolizar : 100 g/L

Volúmen de solución de PFK a 100 g/L : 860 L

Alternativas de reactor a emplear:

VOL. TOTAL	60L	25L	12,5L
VOL. TRABAJO	50L	20L	10L
BIOPFK/HIDROLISIS	5000	2000	1000
TOTAL DE HIDROLISIS	18	43	86
GRAMOS DE BIOCAT. A CARGAR:			
ALTERNATIVA A	3500	1400	700
ALTERNATIVA B	2500	1000	500

## ANÁLISIS DE LOS CÁLCULOS

En los cálculos mostrados, se han considerado tres tamaños de reactores a emplear en las pruebas piloto: 50L, 30L y 10L de volumen de trabajo. En cada caso se consideraron dos alternativas:

A.- Trabajar con un lote de menor actividad específica y una relación PGM/biocatalizador alta.

B.- Trabajar con un lote de mayor actividad específica y una relación PGM/biocatalizador baja.

A partir de los cálculos se observa que la alternativa de emplear el reactor de 50 L no es factible, ya que se necesitaría en una cantidad mayor de biocatalizador que la disponible.

Se consideró además que era preferible realizar un mayor número de hidrólisis en un reactor de menor tamaño, y no utilizar de una sola vez todo el biocatalizador disponible.

Esta decisión se sustenta por el riesgo que conlleva para la pérdida de biocatalizador cualquier falla en el sistema de control de pH. Por experiencia previa se conoce que cuando el pH del medio toma valores no muy alejados de los establecidos (7,4-7,6), puede ocurrir un deterioro de la actividad del biocatalizador. Por otra parte, se trata de un reactor de pruebas piloto a volúmenes pequeños y se estudia el proceso de hidrólisis, donde el volumen máximo de hidrólisis está limitado por el tiempo de reacción.

de las dos alternativas siguientes: 20L y 10L, es preferible emplear el reactor de 20 L. Las razones que sustentan esta decisión son las siguientes:

a) Se utilizará una carga de biocatalizador equivalente al 1% del producido, quedando una carga adicional disponible, que podría utilizarse en caso de cualquier eventualidad.

b) El número de hidrólisis a realizar es de 43. Considerando la posibilidad real de realizar 2 hidrólisis series, esto da por resultado que el tiempo de operación real del reactor es de aproximadamente de un mes.

c) El número de hidrólisis es suficientemente grande como para poder realizar un análisis estadístico de los resultados, con un buen grado de confiabilidad.

Las características del reactor a emplear deberán ser las siguientes:

Volumen total: 25 L

Volumen efectivo: 20 L

Material: Acero inoxidable AISI 316

Características generales: Tapa hermetica desmontable. Conexión de alimentación lateral. Dos entradas para base y ácido en la tapa. Vaso de 10 l. largo del vaso, con calibración de volumen. Vaso posterior para lámpara de iluminación. Puertos de conexión de entrada de pH y termómetro, ubicados en la parte inferior

del vaso. Tubería de descarga situada en el fondo de forma lateral y protegida con malla.

Sistema de agitación: Dos impelentes tipo turbina de 4 hojas aladas. Motoreductor con velocidad variable entre 30 y 150 rpm. Cuatro paletas. Relaciones geométricas estándar.

Sistema de control de temperatura: Chaqueta conectada a termostato.

Con estos detalles generales se vieron de conjunto con los diseñadores mecánicos de la firma constructora contratada. En estos momentos estamos en espera de recibir el anteproyecto del reactor para su discusión definitiva.

El resto de la instalación de hidrólisis y recobrado de producto final lo constituyen los siguientes equipos:

TANQUE DE PREPARACION DE PGK 26 L VOLUMEN AGITADO.....	1
TANQUE DE RECEPCION DE PRODUCTO 25 L VOLUMEN.....	2
TANQUE DE PROCESO DE 10 L AGITADO.....	2
KOTEEVAPORADOR DE 5 L CAPACIDAD.....	1
BOMBA PERISTALTICAS.....	3
TERMOSTATO.....	1
SISTEMA DE CONTROL Y MEDICION DE PH.....	1



Los tanques que se mencionan en la tabla anterior serán  
construidos en el país. En estos momentos se están ejecutando los  
proyectos para ser sometidos a su discusión aprobación y  
construcción. Los restantes equipos se encuentran en fase de  
licitud de ofertas, a partir de las cuales se decidirá el  
suministrador.

## REFERENCIAS

de las Indias, Warburton D., Dunnill F., y Lilly M.D.: Biochem. Technol. (eds. 276: 250 (1972).

de la Cruz, B.H., Rosebrough, J.N., Farr, L.O. y Randall, J.F.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

de la Cruz S.A. de C.V.: Libro Negro de la Tecnología escalada a nivel de Planta Piloto, México, marzo de 1970.

de la Cruz S.A. de C.V.: Primer Reporte Técnico del Proyecto ONUDI (C/PA/RLA/83/003 (29 año de actividades), México, D.F., Septiembre de 1989.

Kall, J.P., Langlykke, A.P. Cost Estimation for Biotechnology Projects, in Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Eds. A.L. Demain y N.A. Solomon, Am. Soc. Microb., Washington D.C., 1986.

Ulrich, G.D.: A Guide to Chemical Engineering Process Design and Economics, John Wiley & Sons, New York, 1984.

Peters, M.S. y Timmerhaus, K.D.: Plant Design and Economics for Chemical Engineers, Mc Graw-Hill, New York, 1980.

Perry, J.H. y Chilton, G.: Chemical Engineers' Handbook, 5th Edition, Mc Graw-Hill, New York, 1973.

## CONCLUSIONES

1.-Se produjeron 2500 g de biocatalizador de penicilino amidasa, con una actividad específica entre 175 y 195 U/g p.h. y con los restantes parámetros de calidad establecidos.

2.-Se participó en el II Congreso Iberoamericano de Biotecnología, donde se presentaron los resultados alcanzados por el Proyecto.

3.-Se realizó la ingeniería conceptual de la instalación para procesar 100 kg PCK con el biocatalizador producido. Se preparó la solicitud de ofertas y se comenzó el trabajo de proyección del reactor y los tanques.

Acosta, Ma. Teresa: Informe sobre purificación de 6APA y

En Cuernavaca, Morelos, México. Nov.-Dic. 1989.