



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Producción de cefalosporinas usando un método
semisintético con el uso de la enzima glutaril 7-ACA
acilasa.**

Autor: Diego Coletto Martínez
Tutor: Andrés R. Alcántara León
Convocatoria: Junio

Resumen

La producción de antibióticos β -lactámicos es la más grande de todos los medicamentos. Las cefalosporinas son una parte importante de esta producción, estos antibióticos son muy utilizados y han demostrado su efectividad más que de sobra, usándose tanto como preventivos, para evitar infecciones en pacientes inmunosuprimidos o para tratar infecciones. En este trabajo se propone un método semisintético para la producción de estos β -lactámicos, a partir del ácido 7 amino-cefalosporánico (7-ACA) obtenido mediante el uso de una enzima inmovilizada en una resina epóxido, la glutaril ácido 7 amino-cefalosporánico acilasa o cefalosporina C acilasa, usando como precursor la cefalosporina C (CPC). El método propuesto pretende que al final del proceso el rendimiento sea alto y que su producción sea rentable. Llegando a la conclusión de que el mismo no sólo posee un alto rendimiento, sino que también no genera residuos contaminantes y evita prácticamente en todo su recorrido el uso de disolventes orgánicos y el uso de catalizadores, que son altamente persistentes en el medio ambiente y muchos de ellos nocivos para los seres vivos. El método propuesto en este trabajo para la generación de 7-ACA posee un rendimiento del 92%, afirmando que el proceso se encuentra optimizado y su rendimiento es elevado.

Introducción y antecedentes

La producción de medicamentos o remedios para tratar y curar enfermedades es una práctica que se remonta a los orígenes de la raza humana. Sin embargo, la producción actual de medicamentos es muy diferente a la que se realizaba en aquel entonces. Más concretamente, la producción de antibióticos ha cambiado mucho desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming.

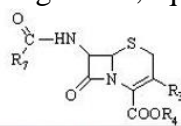
La producción sintética de medicamentos a gran escala por un método exclusivamente químico es muy costosa y, además, genera una gran cantidad de residuos y subproductos que pueden ser una molestia, incluso algunos de ellos son altamente contaminantes o irrecuperables al final del proceso. En el mercado actual de producción de medicamentos este método no es rentable y, por lo tanto, no es competitivo, por ello la industria actual opta por una ruta más barata que genere mayor rendimiento y que no sea tan contaminante ¹.

En este trabajo se observará cómo se lleva a cabo una de estas rutas semisintética, la producción de antibióticos β -lactámicos, más concretamente la producción de cefalosporinas.

Los antibióticos β -lactámicos son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en el ámbito hospitalario. El aumento incesante de las resistencias a ellos y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares, han condicionado que exista una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos ³. Dentro de esta familia, se encuentran las cefalosporinas, las cuales inhiben la formación de la pared celular bacteriana ya que interfieren en la síntesis del peptidoglicano, uno de los componentes fundamentales en esta pared. El peptidoglicano se compone por largas cadenas polisacáridicas en las que se alternan residuos de N-acetil glucosamina (NAG) y ácido N-acetil murámico (NAM). Entre estas cadenas hay una serie de entrecruzamientos o puentes de naturaleza polipeptídica que determinan una estructura similar a una malla y confieren rigidez a la pared celular. Tanto el NAG como el NAM y los polipéptidos, son sintetizados en el citoplasma bacteriano y luego transportados a través de la membrana. Después, se ensamblan fuera de ella mediante diversas enzimas denominadas transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas, que son responsables de las últimas etapas de la síntesis del peptidoglicano. Estas enzimas se localizan a nivel de la membrana citoplásmica y son el blanco de las cefalosporinas ².

Actualmente existe una gran variedad de este tipo de antibióticos, los cuales se clasifican:

En primer lugar, las cefalosporinas de primera generación: las de administración oral son llamadas fenilglicinas o derivados hidroxifenilglicinas, que son la cefalexina, cefadroxilo y cefradina; entre las de administración parenteral se encuentran la cefalotina, cefazolina, cefradina y cefapirina (las tres primeras también se pueden administrar por vía oral). Todos ellos tienen una



Nombre genérico	Nombre comercial	R ₇	R ₃	R ₄
Cefazolina	Ancef, Kefzol			Na
Cefalotina	Keflin			Na
Cefapirina	Cefadyl			Na
Cefalexina	Keflex		CH ₃	H
Cefadroxilo	Duricef		CH ₃	H

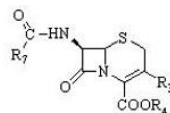
buena actividad contra bacterias aerobias Gram-positivas y algunos organismos Gram-negativos.

En segundo lugar, las cefalosporinas de segunda generación: tienen una mejor cobertura frente a los bacilos Gram-negativos que las de primera generación. Existe un subgrupo dentro de estas cefalosporinas, compuesto por cefoxitina, cefotetan y cefmetazole.

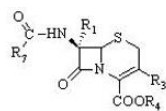
Las de administración oral se denominan como ésteres-prodrogas e incluyen al Loracarbef (droga de abuso), cefaclor, cefuroxime, axetil y cefprozil. Las de administración parenteral son, el cefamandol, cefonicid, cefoxitina, ceforinida, cefuroxime, cefotetan y el cefmetazole ³.

En tercer lugar, las cefalosporinas de tercera generación: suelen resultar más eficaces in vitro frente a los bacilos Gram-negativos y frente a los cocos Gram-positivos (excepto *Staphylococcus Aureus*) que los fármacos de primera y segunda generación. Este grupo de fármacos es extremadamente activo contra la mayoría de las bacterias Gram-negativas y también contra bacterias productoras de β-lactamasas (enzima que inhibe el efecto de los antibióticos β-lactámicos).

Las de administración oral son Cefixime, cefdinir, cefpodoxima proxetil y ceftibuten. Las de administración por vía parenteral son, cefoperazone, ceftazidime, moxalactam, cefotaxime, ceftizoxime, cefmenoxime y ceftriaxone.

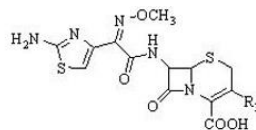


Nombre genérico	Nombre comercial	R ₂	R ₃	R ₄
Ceftioxima	Cefizox		H	Na
Cefotaxima	Claforan			Na
Ceftriaxona	Rocephin			Na
Cefoperazona	Cefobid			H



Nombre genérico	Nombre comercial	R ₂	R ₃	R ₄
Cefuroxima	Ceftin			H
Cefamandol	Mandol			H
Cefaclor	Ceclor		Cl	H
Cefoxitina*	Mefoxin			OCH ₃
Cefotetan*	Cefotan			OCH ₃
Cefmetazol*	Cemetol			OCH ₃

En último lugar, las cefalosporinas de cuarta generación incluyen el cefepime y el cefpirone (ambas de administración parenteral). Tienen un extenso espectro de acción comparadas con las de anteriores generaciones y una gran estabilidad contra β -lactamasas, además de poca o ninguna capacidad para inducir la producción de β -lactamasas tipo I. Tienen una alta efectividad en el tratamiento de infecciones debidas a bacilos aerobios Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de tercera generación, con lo cual se logra su erradicación y tienen mejor actividad contra algunos Gram-positivos (actualmente se encuentra en estudio un nuevo grupo de cefalosporinas inyectables: el ceftazolidim y el cefpiramide).



Nombre Genérico	Comercial	R ₃
Cefoselis (FK-037)	Wincef	
Cefpiroma (HR-S10)	Cefrom	
Cefepima (BMY- 28142)	Maxipime	
Cefaclidina (E1040)	Cefclidin	

Todas estas cefalosporinas tienen diferente composición química, sin embargo, comparten una estructura común que deriva del ácido-7-aminocefalosporánico (7-ACA), que posee un anillo beta-lactámico y, además, un anillo dihidrotiazínico. En lo que difieren es en la sustitución de los diferentes radicales (R y R₁), que cambian las características farmacodinámicas y farmacocinéticas.

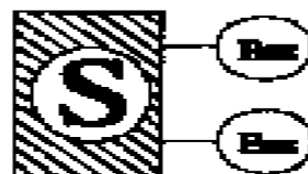
Este 7-ACA se obtiene actualmente a partir de la cefalosporina C mediante un método enzimático que la transforma en el primero. El proceso químico es mucho más costoso y largo que el uso de esta enzima, glutaril 7-ACA acilasa. En un principio se obtenía del hongo *Acremonium chrysogenum*, posteriormente, y gracias a la ayuda de la biotecnología y las técnicas de modificación genética mediante el uso de vectores, se obtuvo una cepa de *Escherichia coli* que era capaz de producir con un mayor rendimiento esta misma enzima. Aunque la producción de la enzima se aumentó considerablemente surgió un problema, la enzima se queda en el interior celular formando cuerpos de inclusión y hay que lisar las células para poder recuperarla. En la actualidad, se están desarrollando sistemas para que se pueda recuperar la enzima de una forma más sencilla. Estos sistemas se están llevando a cabo en una levadura, *Pichia pastoris*, ya que posee mecanismos de excreción muy semejantes al de las células eucariotas y se puede acoplar

a este mismo sistema la excreción de cualquier molécula que se genere en el interior celular, incluida esta enzima ⁴. Este sistema tiene la ventaja de que no es necesaria la lisis celular para poder obtener la glutaril 7-ACA acilasa ya que se expulsa al exterior celular y se puede obtener fácilmente de éste. Además, tiene la ventaja de que se puede usar en un sistema que permita una producción continua, por lo que se puede obtener un alto rendimiento del mismo.

La glutaril 7-ACA acilasa no se puede usar como tal, sino que debe de estar acoplada a un andamio o “scaffold”, consistente en una estructura que sirve como soporte para la inmovilización de la enzima y facilita la recuperación de la misma al final del proceso de una manera sencilla, pudiendo ser reutilizada varias veces. Estos “scaffold” en su mayoría están compuestos por polímeros que permiten una funcionalización del mismo para que los productos químicos se puedan adherir a su superficie. O, por otro lado, estos polímeros son capaces de atrapar a esos productos químicos en el interior de ellos mismos, ya que pueden formar una red tridimensional que permite el intercambio de sustancias con el medio externo, pero evita que pueda escapar el contenido del interior.

Actualmente, el método más usado para inmovilización de la glutaril 7-ACA acilasa, es la unión química mediante un enlace covalente a un soporte polimérico ya sea de origen natural, como un alginato (poco usado porque se degrada rápidamente por microorganismos), o sintético, como el poliestireno (más resistente, pero necesita de funcionalización). Se ha observado que, aunque la unión al soporte sea covalente, no se altera la estructura del centro activo por lo que no varía la actividad respecto a una unión de tipo no covalente.

Unión Covalente



La unión covalente se da porque en la superficie del polímero se encuentran residuos hidroxilos (que se generan normalmente mediante funcionalización) $\text{CH}_2\text{-OH}$, a su vez, la enzima posee en su superficie varios residuos carboxílicos -CO-OH , y mediante una sencilla reacción de esterificación en medio ácido, quedan unidos de manera permanente por un enlace de tipo covalente, más concretamente por un enlace éster -CO-O-CH_2 .

En la actualidad, se están desarrollando nuevos sistemas más complejos pero que permiten una mejor estabilidad de la enzima y una mejora a la hora de recuperarla del

medio de producción. Por ejemplo, se ha desarrollado un sistema de nanopartículas ferromagnéticas basado en un núcleo de Fe_3O_4 con un recubrimiento de quitosán (polisacárido lineal que se encuentra en los caparzones de algunos crustáceos), que permite la unión covalente a la enzima de forma muy efectiva ⁵.

Objetivos

Los objetivos del trabajo son:

- Proponer una ruta semisintética de cefalosporinas que tenga un alto rendimiento.
- Que la ruta propuesta evite el uso de sustancias o disolventes que sean poco contaminantes.
- Escoger un sistema para la producción de 7-ACA acilasa que se encuentre optimizado y que permita un rendimiento para la producción del precursor de la síntesis de cefalosporinas, el 7-ACA.
- Proponer un sistema de inmovilización óptimo para la producción y que permita una reutilización de la enzima.

Metodología

Obtención de glutaril 7-ACA acilasa

En primer lugar, la obtención de la enzima necesaria para realizar la conversión de la cefalosporina C (CPC) en el 7-ACA, a través de un único paso gracias a la glutaril 7-ACA acilasa o CPC acilasa (AC). En un primer estadio, se generó un cultivo de *E. coli* de la cepa productora de la enzima, más concretamente la cepa ACPGA001, ese cultivo se fue traspasando de unos recipientes de menor a mayor tamaño hasta llegar a un tanque de producción de 100 m³ ⁶.

Se observó que la producción óptima de la enzima era entre los 40-50 grados C° de temperatura. El medio de cultivo estaba compuesto por: un extracto de carne y levadura con NaCl. Triptófano (ya que la cepa es deficiente en la producción de éste cuando se encuentra transformada con el gen que permite la producción de la CPC acilasa), glucosa, y como inductor para la producción de la enzima, el ácido fenilacético, que pone en marcha los mecanismos moleculares activando los genes necesarios para producción de AC ⁷.

La adición de fenilacético se realizó para controlar el inicio de la producción de la encima porque es contraproducente que se dé desde un comienzo la producción enzimática, debido a que se formaban cuerpos de inclusión por la aglomeración de la AC en el interior celular. Esto se debe a que *E. coli* no posee mecanismos para expulsar la enzima al exterior celular, interfiriendo con el proceso de mitosis ².

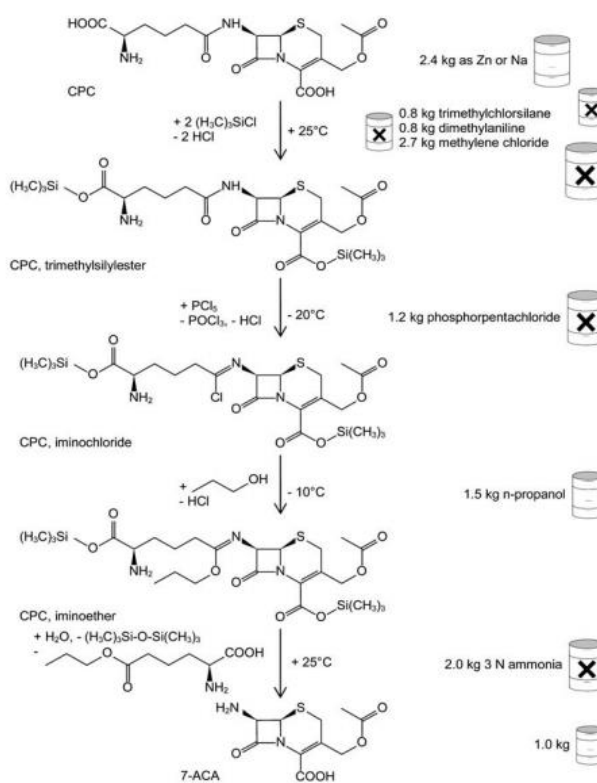
Una vez la producción enzimática finalizó, fue necesaria la lisis celular para poder recoger la glutaril 7-ACA acilasa, que se llevó a cabo por el uso de detergentes que rompen la membrana bacteriana, sin alterar las proteínas del interior celular, entre las que se encuentra la AC.

Posteriormente fue necesaria una purificación para separar la AC del resto de componentes celulares. Este proceso consistió en una centrifugación, en primera instancia, a 1500 rpm durante 2 minutos, en la que se recogió el sobrenadante, y seguidamente se le sometió a otra segunda centrifugación, ésta a 5000 rpm durante 2 minutos más.

Más tarde se sometió al sobrenadante a un proceso de cristalización y purificación mediante el uso de una columna de HPLC, obteniendo de este modo cerca de un 90% de pureza la glutaril 7-ACA acilasa ¹⁻⁷.

El método químico para la obtención del 7-ACA es un proceso largo que necesita de disolventes y catalizadores de reacción que son altamente contaminantes, como el amoniaco o el pentacloruro de fósforo ¹.

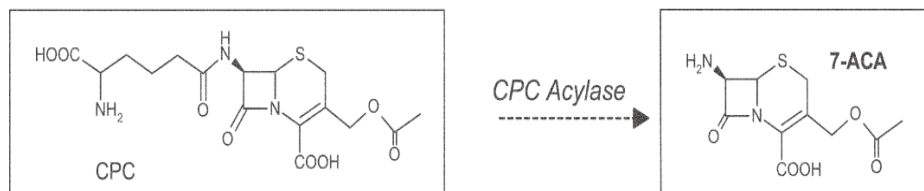
Como se puede observar por la ruta sintética anterior, la producción realizada, exclusivamente, por un método químico es muy compleja y además genera una producción con un porcentaje relativamente bajo, cercano a un 70%. Además, es necesario un



proceso posterior de eliminación del disolvente, de purificación y eliminación de residuos.

Este proceso tiene tan alta complejidad que no es comparable a la ruta semisintética de la glutaril 7-ACA acilasa o CPC acilasa, que es más sencillo y eficiente

8.



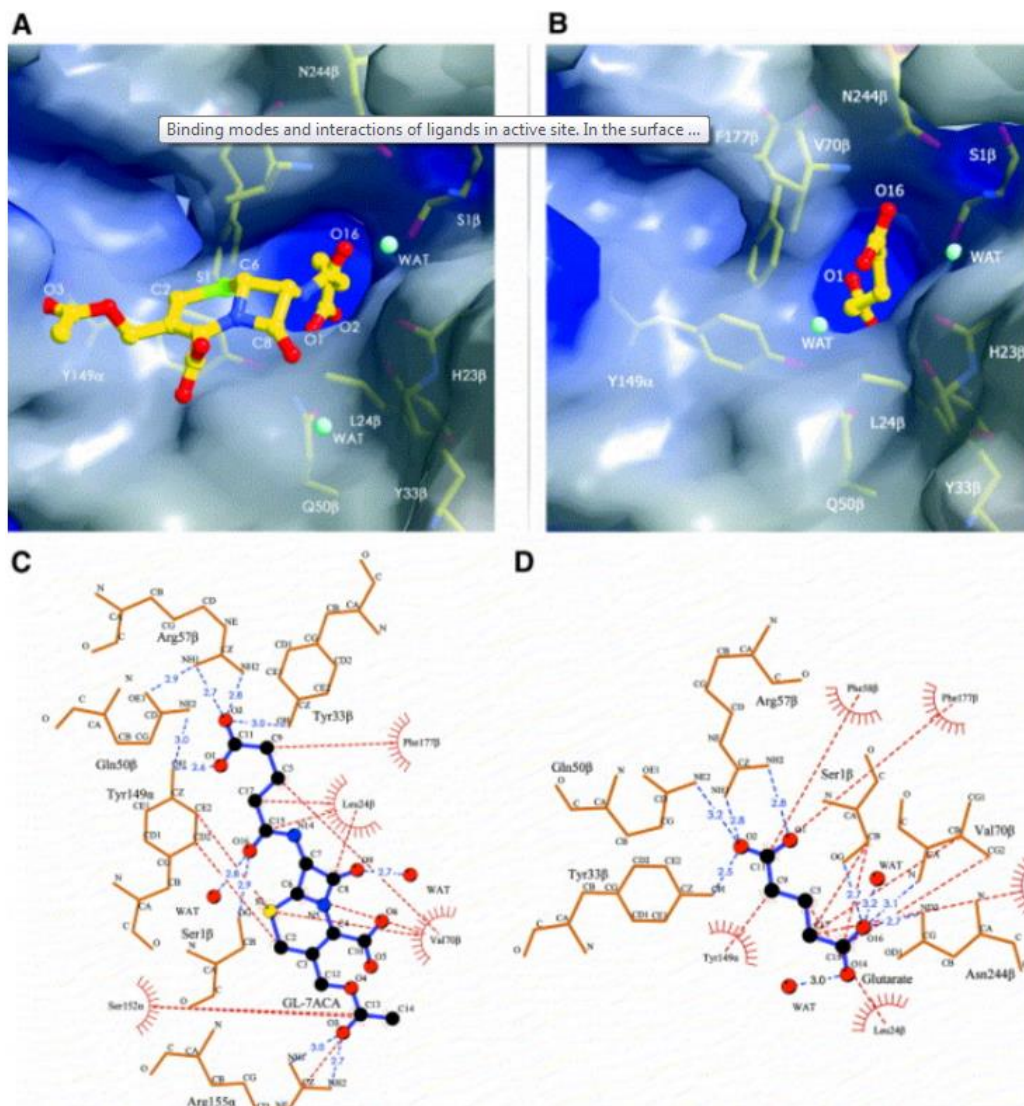
Reacción de AC

Como se puede observar, esta reacción es mucho más sencilla y permite la obtención con un rendimiento muy alto del 7-ACA, concretamente un 92%. Debido a esto, se escogió este método para la producción de cefalosporinas, ya que, además, se evita el uso de catalizadores y de disolventes, dañinos para el medio ambiente ⁸. La reacción que cataliza es una desacilación en el N de la amina secundaria de la cadena lateral, que se une directamente al anillo β -lactámico y no genera subproductos contaminantes, a diferencia de la síntesis química.

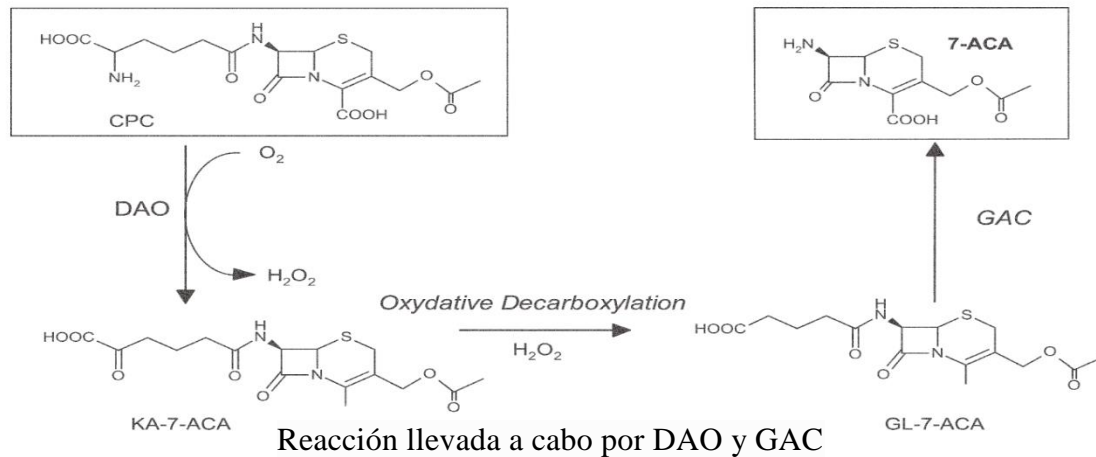
La enzima solo es capaz de reconocer como sustrato al CPC, que es el isómero S porque es el que encaja en el centro activo.

La estructura del centro activo interacciona con el sustrato de la siguiente forma:

1. El lugar donde se sitúa la cadena lateral del sustrato se une a un resto de glutamato (glu), que a su vez interacciona con el C7 del anillo β -lactámico del CPC ⁹⁻¹⁰.
2. El anillo de 4 y de seis de CPC, que pertenecen a la estructura β -lactámica, se une a la enzima mediante fuerzas hidrofóbicas y fuerzas de Van Der Waals ⁹⁻¹⁰.
3. Las dos cadenas laterales que nacen del anillo β -lactámico interaccionan para unirse a la enzima mediante un resto carboxílico procedente de un aspartato (Asp) y un resto acetoximetilo. En ambos complejos de unión, dichas cadenas se encuentran posicionadas en lo que se denominan bolsillos hidrofóbicos ⁹⁻¹⁰.



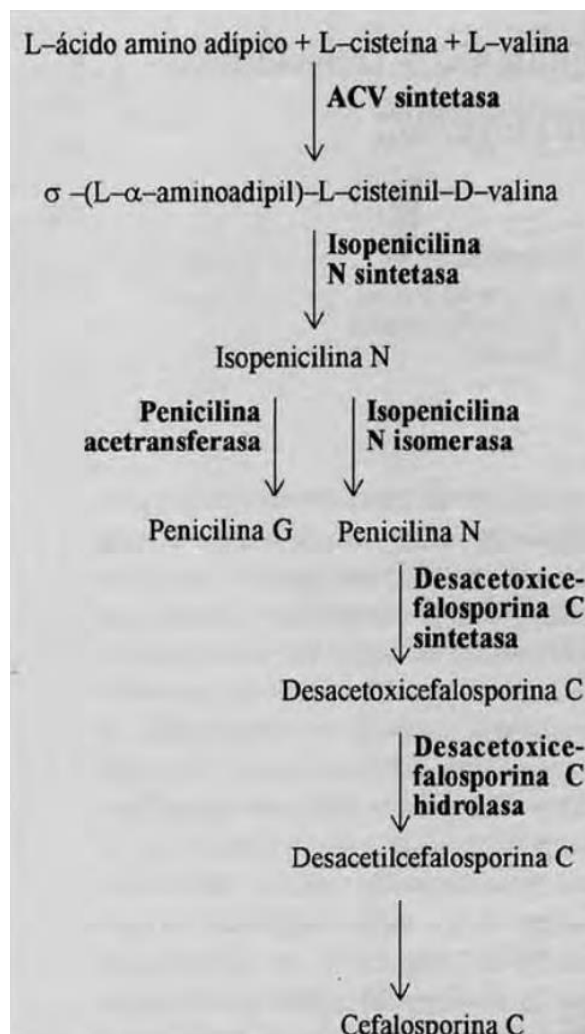
De forma paralela existe otra forma de obtener el 7-ACA, por un método enzimático. Se diferencia en que, en lugar de ser en un único paso, son dos y se usan dos enzimas diferentes para cada uno de los pasos. En el primer paso, se utiliza la D-aminoácido oxidasa (DAO), generando una oxidación del NH₂ de la cadena lateral hasta un carbonilo. En el segundo paso, se usa otra enzima, la glutaril acilasa (GAC), responsable de la desacilación. Como paso intermedio debe producirse una descarboxilación oxidativa, porque si no la GAC no es capaz de actuar al no reconocer el sitio activo de la enzima. Es una reacción en dos pasos, pero no se profundizará más en este trabajo ya que el método que se escogió para la producción fue el primer método semisintético enzimático ¹⁻⁸.



Producción de CPC

En segundo lugar, y para que la reacción se produzca, es necesario la obtención del CPC, sustrato de la reacción de proveedores indios y chinos. Curiosamente es el mismo organismo en el que se descubrió la CPC acilasa, *Acremonium chrysogenum*, usado actualmente como productor de la cefalosporina C, además de otras especies de *Penicilium*.¹

La elaboración microbiana de β -lactámicos se lleva a cabo por una serie de reacciones que incluyen: la formación del tripéptido U-(L-O-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), por medio de una enzima la ACV sintetasa, y la isopenicilina N sintasa o ciclasa, que transforma el ACV es isopenicilina N. Ésta se convierte en la penicilina G gracias a la penicilil aciltransferasa, en el caso de que se generen penicilinas o sus derivados¹⁰.

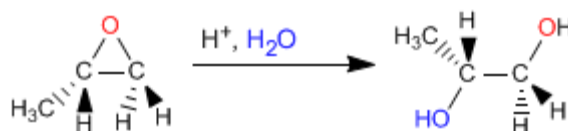


Para la producción de cefalosporinas por una ruta biosintética, la isopenicilina N no se convierte en penicilina G por la penicilil aciltransferasa. Esto se debe a que, en vez de actuar esta enzima, quien actúa es la isopenicilina N isomerasa, convirtiendo esta isopenicilina N en penicilina N. Posteriormente, esta penicilina N es convertida a deacetoxicefalosporina C (DAOC) por acción de la desacetoxicefalosporina C sintasa o expandasa. La DAOC sufre una hidroxilación por la DAOC hidrolasa que genera la desacetoxicefalosporina C (DAC)¹⁰. Por último, se da una reacción en los microorganismos productores de cefalosporinas que consiste, en que la DAC por medio de la aciltransferasa se convierte en la CPC.

Inmovilización covalente de la glutaril 7-ACA acilasa sobre un soporte compuesto por una resina epoxido

En tercer lugar, para poder realizar la producción, fue necesario un proceso de inmovilización de la glutaril 7-ACA acilasa. Entre todos los posibles métodos de inmovilización, se acabó optando por usar una resina de tipo epoxi, previamente tratada para activarla. Se usó una mezcla hidroalcohólica compuesta por: alcohol etílico, propilenglicol, alcohol bencílico, fosfato cálcico, HCl y H₂O. Tras exponer a la resina a esta mezcla durante aproximadamente 24 horas, presentó grupos epóxidos (-O-) en su superficie¹². Después de dicho tratamiento, se limpió con agua fría la resina para retirar cualquier resto de la solución anterior y evitar que la enzima pueda interferir en etapas posteriores debido a los restos de HCl que pudiesen quedar.

Para poder inmovilizar la enzima de una manera óptima fue necesario que la enzima se encontrara dispersa de manera homogénea en un tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7 a 25° C, bajo agitación suave¹². Cuando la solución presentó un aspecto homogéneo, se puso en contacto con la superficie de la resina en un medio ligeramente ácido. Este medio se consigue usando un ácido débil como el ácido acético, que produce la apertura del epóxido generando grupos hidroxilos.



Es importante controlar el pH del medio para que no sea inferior a 4, 5, debido a partir de este pH, se puede empezar a comprometer la estructura terciaria de la enzima,

con la consecuente desnaturalización y pérdida de función. En estas condiciones se produce la unión al soporte mediante una esterificación por parte de los grupos COOH de la superficie enzimática y los grupos OH que se activaron en la superficie del soporte, quedando unida la enzima de forma covalente y permanente al mismo ¹⁻².

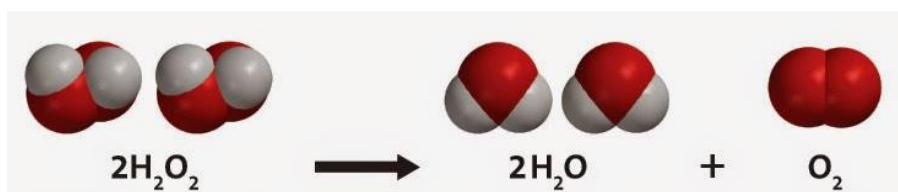
Para parar la reacción entre los grupos del enzima y los grupos epóxido del soporte, se llevó a cabo un bloqueo de estos últimos con glicina. Cuando acabó el proceso de inmovilización, el soporte quedó completamente inerte, pudiendo almacenarse sin ningún problema. El protocolo de bloqueo consistió en la incubación del soporte con grupos epóxido, en el que se inmovilizó previamente la enzima, con 4 ml de una solución de glicina 3M a pH 8.5, a 4° C, bajo agitación suave. Después de este tiempo el derivado que se obtuvo se lavó con agua destilada, para después poder conservarlos almacenados a 4° C ¹².

Producción de 7-ACA a partir del CPC mediante la glutaril acilasa

En cuarto lugar, una vez la enzima se encuentra inmovilizada en el soporte, se procede a la producción de 7-ACA. El proceso consistió en incubar la enzima inmovilizada con una solución de CPC 40 mM en fosfato de potasio 0.1 M a pH 8, a 25° C ¹². La suspensión se agitó mecánicamente y el pH se mantuvo constante en un valor de 8, mediante adiciones sucesivas de hidróxido de sodio 4 M. Se tomaron muestras del sobrenadante a diferentes tiempos que fueron analizadas por HPLC para controlar el proceso y observar si la producción se daba en óptimas condiciones.

Una vez finalizado el proceso, el soporte con la enzima se conserva a 4° C, y se observó que se puede reutilizar entre 20-30 veces si se conserva de manera correcta, sin apenas variar su capacidad de producción.

El resultado de este proceso es la conversión de CPC a 7-ACA en un único paso sin generar subproductos contaminantes y con rendimiento muy alto por encima del 85% ¹. El único problema es la generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sin embargo, el soporte estaba preparado para atraparlo en la superficie realizando una autocatálisis, y generando agua (H₂O) y oxígeno (O₂).¹²



En ocasiones la AC no siempre produce 7-ACA a partir de CPC, sino que genera formas isoméricas de este mismo. Por ello, se añadieron en mitad del proceso de producción otras enzimas adicionales, unas isomerasas. Estas enzimas catalizan la reacción de isomerización de estos derivados convirtiéndolos en el 7-ACA, permitiendo aumentar la producción prácticamente hasta un 92%⁷⁻¹².

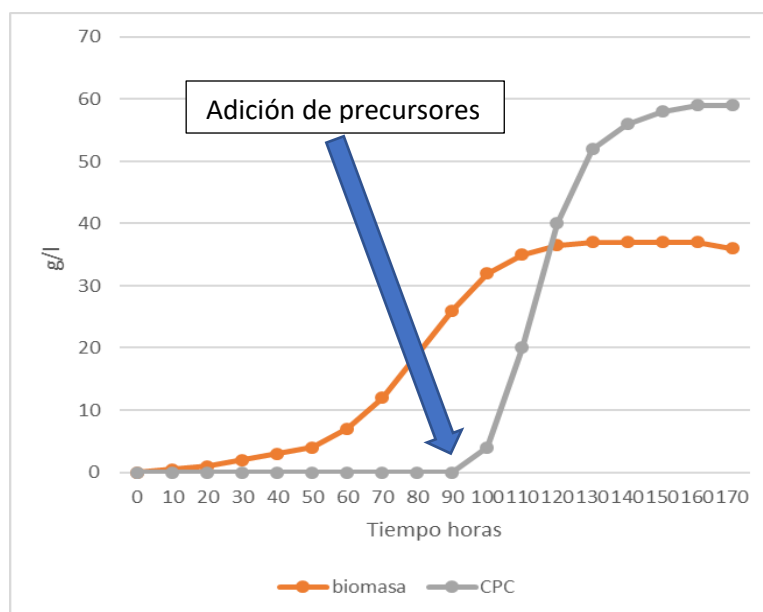
Modificación de 7-ACA en 3' y 7'

Por último, para finalizar el proceso de producción de cefalosporinas y generar toda la gama de las mismas, el 7-ACA se debe someter a diferentes procesos de sustitución.

- Por un lado, se puede realizar la modificación del extremo 3' a través de la sustitución del grupo acetilo, mediante un mecanismo SN_1 por grupos mercaptoheterocíclicos o por la apertura de un anillo nitroheterocíclico. La ruta tradicional de producción consiste en una reacción química en ausencia de agua, produciéndose un alto rendimiento, cercano al 85%, y generándose un producto de alta pureza¹⁻³. Alternativamente, existe otra reacción en medio acuoso con un rendimiento del 65%, evitando el uso de disolventes orgánicos. Los derivados generados por esta ruta pueden tener un color pardusco o amarillento no deseado, que se evita protegiendo el grupo 7' y controlando la temperatura durante el proceso, evitando que supere los 75 C° y que no baje de los 50 C°.
- Por otro lado, se encuentran las modificaciones en el extremo 7' del grupo amino libre unido al anillo β -lactámico³. La ruta química tradicional requiere que el grupo carboxílico se encuentre protegido (se suele usar PCl_5 para realizar este proceso). Posteriormente, se usa la sal de Dane, que se convierte en un anhídrido mixto, y que junto con el cloruro de pivaloilo, protegen el grupo amino. Seguidamente, se puede proceder a la modificación del anillo, cuyo proceso genera un gasto de disolventes y reactivos muy alto (40 kg de los mismos sirven para producir 1 kg de producto).

De forma paralela, existe un método semisintético que consiste en el uso de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo proceso de fermentación permite obtener el mismo resultado que el método tradicional, pero evitando el uso de disolventes y reactivos, aumentando el rendimiento de forma considerable por encima del 80%¹¹.

Resultados y discusión

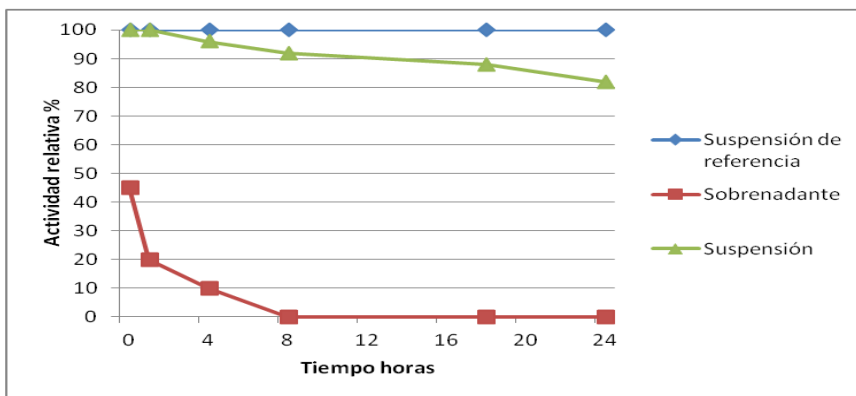


Gráfica 1

En la gráfica 1 se representa la producción de CPC y su correlación con la cantidad de microorganismos que se generan en el interior del tanque de producción. Se observa, que la producción de CPC no se da desde el comienzo ya que hay un periodo de inducción y crecimiento de *A. chrysogenum*. Después de ese periodo, hay una fase estacionaria en la que la población del microorganismo se mantiene de forma constante ⁹.

Cuando se está acabando la fase de crecimiento exponencial, se adicionan los precursores para la producción del CPC. Al principio la conversión de los precursores es lenta, sin embargo, una vez se adicionan los precursores en el medio se ponen en marcha los mecanismos para la producción óptima de CPC. Posteriormente, se genera una fase de producción exponencial que se frena cuando van desapareciendo los precursores del medio de reacción, hasta que se agotan completamente y no se puede producir más CPC.

Como se puede observar, en el gráfico anterior la producción comienza a partir de las 90 horas y se puede dar finalizada a partir de las 160 horas, cuando se agotan los recursos del medio y comienza la fase final de muerte de los microorganismos ⁹.

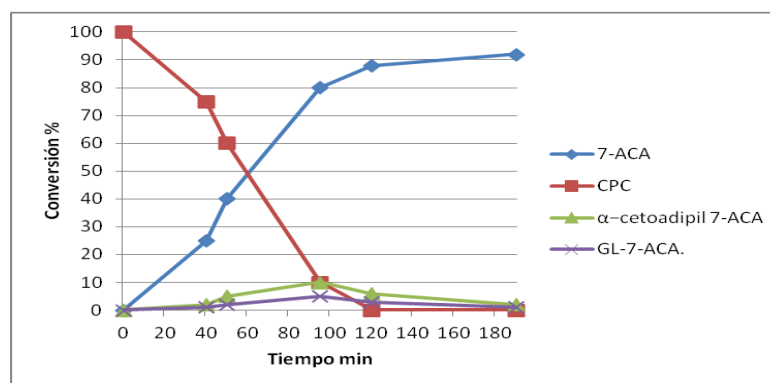


Gráfica 2

Como se puede observar en la gráfica 2, durante el periodo necesario para inmovilizar CPC acilasa, y que quede unida al soporte de manera permanente, hay una pérdida de actividad enzimática ¹²⁻¹.

La suspensión de referencia se toma como valor del 100% de actividad y se compara respecto a la suspensión que contiene la enzima, que se inmoviliza sobre el soporte. Lo ideal sería que la de referencia y la de estudio fuesen iguales. Lo que nos dice la gráfica anterior es que, mientras sea más largo el periodo más cantidad de enzima queda fija al soporte, pero se pierde de forma gradual la actividad de la misma.

También nos dice que prácticamente el 100% de la enzima se encuentra inmovilizada a las cuatro horas del proceso, esto se observa gracias a medir la actividad enzimática del sobrenadante. Por lo tanto, es recomendable que el proceso no dure más de ocho horas ya que el 100% de la enzima se encuentra adherida al soporte, y si el proceso se mantiene durante más tiempo se produce una pérdida de actividad considerable. Terminando la reacción aproximadamente en este punto, se obtiene una buena actividad, cercana al 92% ¹².



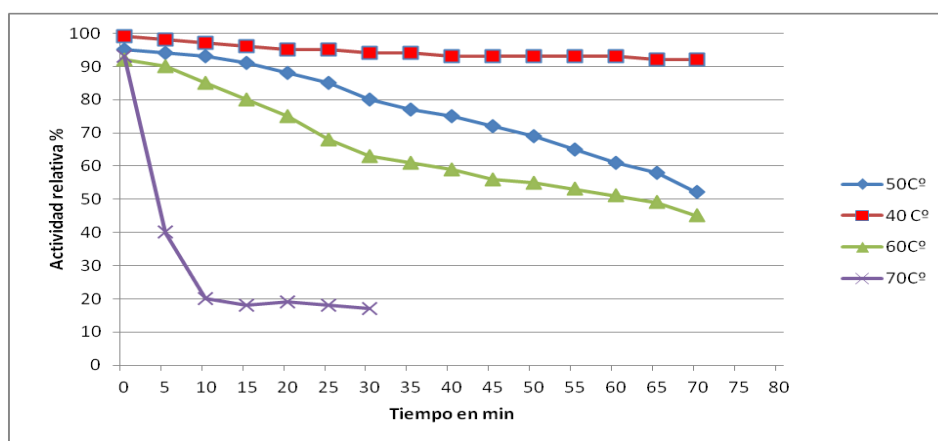
Gráfica 3

La gráfica 3 representa el paso de conversión enzimática por la glutaril 7-ACA acilasa, inmovilizada en la resina epóxido, del CPC a 7-ACA. A medida que desaparece el CPC, sustrato de la reacción, aumenta la aparición de 7-ACA ¹².

Como se puede observar en esta gráfica, no todo el sustrato se convierte en producto, esto se debe a que la enzima sigue una cinética de Michaelis-Menten y, por tanto, no es capaz de producir una conversión total del producto ya que se satura ⁷.

Además, en ocasiones se generan subproductos de la reacción que no son deseables ya que se pierde rendimiento al final del proceso. Estos subproductos son generados por la misma enzima, debido a que en ocasiones no es capaz de generar el 7-ACA en el isómero de interés, sino que genera otras moléculas isoméricas del 7-ACA ⁷. Para mejorar el rendimiento total, se añaden unas enzimas a mitad del proceso, que son capaces de isomerizar y convertir esos derivados en el 7-ACA, aumentando, en consecuencia, el rendimiento total de la reacción.

El gráfico muestra que, cuando han transcurrido aproximadamente tres horas, la glutaril 7-ACA acilasa no es capaz de convertir en su totalidad el CPC en 7-ACA ya que se satura, pero se obtiene un alto rendimiento, del 92% ¹². Aunque se mantenga durante más tiempo no se mejora el rendimiento, de hecho, si se alarga más el tiempo de reacción la enzima comienza a catalizar la reacción inversa, cosa que no interesa, por lo que es recomendable parar la producción de 7-ACA en este punto.



Gráfica 4

La gráfica 4 muestra la producción por parte *E. coli* de la glutaril 7-ACA acilasa o CPC acilasa a lo largo tiempo. Todas las colonias fueron cultivadas a un pH cercano a

8, porque se observó que era el óptimo para producir la enzima. En lo que difieren es en la temperatura a la que fueron sometidas para optimizar la producción ⁶.

La gráfica nos muestra que la temperatura óptima de producción son los 40 C° de temperatura, aunque la óptima para la cepa usada (ACPGA001) para el crecimiento era de 50 C° de temperatura ¹⁰. A 40 C° se puede observar que la producción se mantiene prácticamente constante en el tiempo. Esto es debido a que, una vez se induce la producción enzimática por parte del microorganismo, los cuerpos de inclusión se forman de una manera más lenta que a 50 o 60 C°. Por tanto, interfieren menos con el mecanismo de producción enzimática y con el crecimiento bacteriano.

Cuando la temperatura se eleva a 70 C°, una gran parte de las colonias se muere. Esto se refleja en el gráfico anterior con una bajada de la producción debida a la muerte de los clones incapaces de soportar dicha temperatura ⁶.

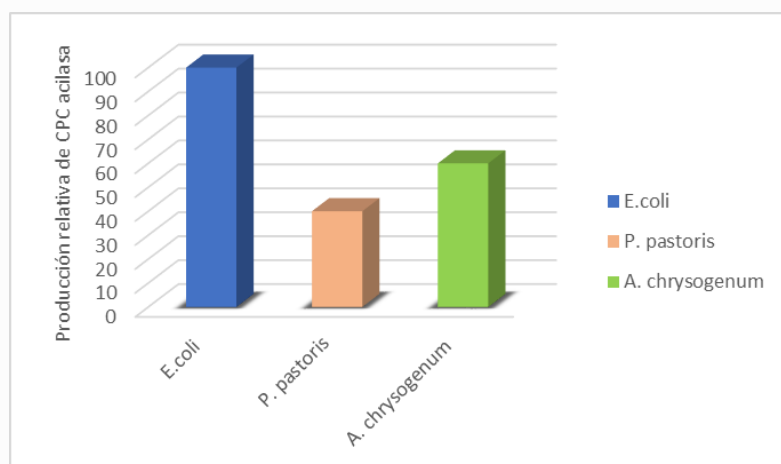


Gráfico 5

En la gráfica 5 se encuentra representada la producción de la glutaril 7-ACA acilasa en diferentes organismos productores. Se muestran los gramos producidos por kilo de biomasa y tiempo. De manera relativa se le dio un valor de 100 a la producción en el sistema descrito de *E. coli* y el resto se compararon con la misma.

Como se puede observar la producción más óptima se genera en *E. coli*, seguida de *A. chrysogenum* y por última *P. pastoris*. El método más rentable es la producción en *E. coli*, aunque sea necesaria la lisis celular para poder recuperar la glutaril 7-ACA acilasa y poder usarla en la producción de cefalosporinas ¹⁰.

En *P. pastoris* la producción es menor, pero tiene la ventaja de que no es necesaria la lisis celular para recuperar la enzima, como se comentó anteriormente. Es capaz de sacarla al exterior celular al producirla, debido a que posee un sistema de excreción al que se puede acoplar dicha producción⁵. El sistema es relativamente nuevo por lo que será necesario un proceso de optimización para que la producción aumente y sea rentable para la producción enzimática. Por el momento el sistema más rentable es el que se expuso anteriormente en *E. coli*.

Conclusiones

Las conclusiones del trabajo son:

- La ruta semisintética de cefalosporinas al final del proceso posee un alto rendimiento, ya que todos los procesos descritos superan el 80%.
- La ruta propuesta evita casi en la totalidad de sus pasos el uso de disolventes o de productos químicos contaminantes, excepto cuando se realizan las modificaciones en el extremo 3' del 7-ACA. Por tanto, es uno de los pasos en los que se puede actuar para mejorar el proceso.
- La ruta propuesta para la producción del 7-ACA tiene un rendimiento alto del 92%. Por tanto, se puede afirmar que la misma posee un alto rendimiento.
- El sistema propuesto de inmovilización es muy efectivo, debido a que prácticamente no hay pérdida de actividad al ser inmovilizada, solo de un 8%. Además, se permite un número de usos relativamente elevados del soporte con la enzima, más de 20.
- En la actualidad, se desarrollan nuevos tipos de cefalosporinas por la aparición de nuevas resistencias por parte de los microorganismos, incluso algunos autores afirman la existencia en la actualidad de una quinta generación de cefalosporinas.

Bibliografía

(1) Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Industrial Enzymatic Production of Cephalosporin-Based β -Lactams (2004) Editorial: Springer-Verlag Berlin Heidelberg Michael S. Barber, Ulrich Giesecke, Arno Reichert and Wolfgang Minas.

(2) The cephalosporins. Mayo Clin Proc. 1999: The Cephalosporins. Volume 74 Issue 2 Pag 187-195 William F. Marshall M.D. Janis E. and Blair M.D.

(3) Antibióticos betalactámicos. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Bellvitge. Universidad de Barcelona. Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003 Volume 21 Issue 1 Pag 42-55 Mar Marín y Francesc Gudiol.

(4) Potential of *Pichia pastoris* for the production of industrial penicillin G acylase. Folia Microbiol (Praha) 2017 Helena Marešová, Andrea Palyzová, Martina Plačková, Michal Grulich, Vyasa Williams Rajasekar, Václav Štěpánek, Eva Kyslíková and Pavel Kyslík.

(5) Covalent Immobilization of Penicillin G Acylase onto Fe₃O₄ @Chitosan Magnetic Nanoparticles. Journal of Biotechnology 2016 Volume 26 Issue 5 Pag 829-836 Xiao-Min, Ling Xiang-Yu, Wang Ping, Ma Yi, Yang Jie-Mei Qin, Xue-Jun Zhang and Ye-Wang Zhang.

(6) Physiological characterisation of *Penicillium chrysogenum* strains expressing the expandase gene from *Streptomyces clavuligerus* during batch cultivations. Growth and adipoyl-7-aminodeacetoxycephalosporanic acid production. Appl Microbiol Biotechnol 2001 Volume 57 Issue 3 Pag 357-62 Robin J. Jakobsen M. Beyer M. Noorman and H. Nielsen J.

(7) Structure of cephalosporin acylase in complex with glutaryl-7-aminocephalosporanic acid and glutarate: insight into the basis of its substrate specificity. Chem Biol 2001 Volume 8 Issue 12 Pag 1253-64 Youngsoo Kim and Wim G.J Hol.

(8) Enzymatic Modifications of Cephalosporins by Cephalosporin Acylase and Other Enzymes Crit Rev Biotechnol 2006 Volume 26 Issue 2 Pag 95-120 Vijay Chintaman Sonawane.

(9) Brock Biología de los Microorganismos. (2009) Addison-Wesley Michael T. Madigan, John M. Martinko and Jack Parker.

(10) Biosíntesis y regulación de β -lactámicos en *Penicillium Chrysogenum*. Elementos (Puebla, Pue.) 1996 Volumen 3 Issue 24 Pag 23-25 Carlos Ontiveros Arredondo.

(11) Fármacos antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos beta-lactámicos. RFM 2002 Volume 25 Issue 2 Mandell G. and Petri W.

(12) Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalosporina C. Universidad autónoma de Madrid 2007 Fernando López Gallego.