

2ej
105

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE DEXTRANASA Y SU
APLICACIÓN EN JUGOS DE FRUTAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ROMAN JORGE REZA MORALES

México, D.F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	PAGINA
INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	6
INTRODUCCION.....	8
OBJETIVOS.....	10
CAPITULO 1 ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	11
1.1 DEXTRANOS.....	11
1.1.1 ORIGEN.....	11
1.1.2 FUENTE.....	12
1.1.3 ESTRUCTURA.....	13
1.1.4 PROPIEDADES.....	16
1.1.5 USOS O APLICACIONES DE LOS DEXTRANOS.....	21
1.1.5.1 SIGNIFICACION CLINICA.....	22
1.1.5.2 DEXTRANOS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.....	22
1.1.5.2.1 PRODUCTOS HORNEADOS.....	22
1.1.5.2.2 BEBIDAS.....	23
1.1.5.2.3 CONFITERIA.....	23
1.1.5.2.4 REVESTIMIENTOS PRESERVATIVOS.....	24
1.1.5.2.5 OTROS.....	24
1.1.6 LOS DEXTRANOS EN LA INDUSTRIA DEL AZUCAR.....	24
1.1.7 METODOS DE PRODUCCION DE DEXTRANOS.....	26
1.1.7.1 PRODUCCION POR FERMENTACION.....	26
1.1.7.2 PRODUCCION POR SINTESIS ENZIMATICA.....	27

1.2 DEXTRANASA.....	29
1.2.1 DESCRIPCION.....	29
1.2.2 ORIGEN.....	29
1.2.3 PROPIEDADES DE LA DEXTRANASA.....	32
1.2.4 MECANISMO DE ACCION.....	35
1.2.4.1 MECANISMO DE ACCION DE LA DEXTRANASA - PRODUCIDA POR <u>PENICILLIUM FUNICULOSUM</u> ..	35
CAPITULO 2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	42
2.1 SELECCION DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANASA.	43
2.2 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA PRODUCCION DE DEXTRA- NASA.....	44
2.3 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA.....	45
2.3.1 FERMENTACION EN MATRAZ.....	46
2.3.2 FERMENTACION EN FERMENTADOR DISCONTINUO.....	47
2.3.3 ANALISIS DE LA FERMENTACION.....	47
2.3.3.1 BIOMASA.....	47
2.3.3.2 pH.....	47
2.3.3.3 AZUCARES TOTALES.....	50
2.3.3.4 AZUCARES REDUCTORES.....	50
2.3.3.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	51
2.4 PRODUCCION DE LA DEXTRANASA.....	52
2.5 SEPARACION DE LA DEXTRANASA.....	53
2.6 APLICACION DE LA DEXTRANASA.....	54
2.6.1 CARACTERIZACION DE LOS JUGOS DE FRUTAS.....	54
2.6.1.1 VISCOSIDAD.....	54

	PAGINA
2.6.1.2 °BRIX.....	54
2.6.1.3 AZUCARES TOTALES.....	54
2.6.1.4 AZUCARES REDUCTORES.....	54
CAPITULO 3 RESULTADOS.....	57
3.1 SELECCION DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANASA.....	57
3.2 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA PRODUCCION DE DEXTRANASA.....	57
3.3 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA.....	59
3.3.1 FERMENTACION EN MATRACES.....	64
3.3.2 FERMENTACION EN MINIFERMENTADOR DISCONTINUO....	64
3.4 PRODUCCION DE LA DEXTRANASA.....	65
3.5 CARACTERIZACION DE LOS JUGOS DE FRUTAS.....	69
3.6 APLICACION DE LA DEXTRANASA EN JUGOS DE FRUTAS.....	70
CAPITULO 4 CONCLUSIONES.....	75
CAPITULO 5 BIBLIOGRAFIA.....	78

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
Tabla 1 Especies de bacterias que sintetizan dextranos.....	12
Tabla 2 Tipos y porcentajes de residuos D-glucopiranosil dife- rentemente enlazados en algunos dextranos.....	14
Tabla 3 Propiedades de la dextranasa producida por <u>Penicillium</u> <u>funiculosum</u>	34
Tabla 4 Productos de la hidrólisis de isomaltodextrinas por - la acción de dextranasa II.....	40
Tabla 5 Medio de cultivo de Moyer y Coghill.....	43
Tabla 6 Medio de cultivo utilizado por Menciaer.....	44
Tabla 7 Condiciones de fermentación.....	45
Tabla 8 Medio de cultivo utilizado por Kosarik.....	46
Tabla 9 Condiciones de fermentación para la producción de dex- tranasa.....	52
Tabla 10 Microorganismos productores de dextranasa.....	58
Tabla 11 Determinación cualitativa de la producción de dextra- nasa.....	59
Tabla 12 Caracterización de la fermentación de <u>Penicillium fu-</u> <u>niculosum</u> (matraces).....	60
Tabla 13 Caracterización de la fermentación de <u>Penicillium fu-</u> <u>niculosum</u> (minifermentador).....	62
Tabla 14 Fermentación para la producción de dextranasa por <u>Pe-</u> <u>nicillium funiculosum</u>	66

PAGINA

Tabla 15 Rendimiento de la fermentación para la producción de- dextranasa.....	68
Tabla 16 Caracterización de los jugos de frutas.....	69
Tabla 17 Cambio en la viscosidad durante la aplicación de la - dextranasa en jugos de frutas.....	71
Tabla 18 Cambio en los azúcares reductores durante la aplica-- ción de la dextranasa en jugos de frutas.....	72

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1 Estructura general de los dextranos.....	17
Figura 2 Representación esquemática de los posibles tipos de estructuras en dextranos.....	18
Figura 3 Fórmula estructural propuesta para el dextrano de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> NRRL-B-512 por estudios de metilación.....	19
Figura 4 Estructura parcial de dextranos de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> NRRL-B-512.....	20
Figura 5 Reacción de producción de dextranos.....	28
Figura 6 Efecto del pH en la actividad enzimática.....	33
Figura 7 Termoestabilidad de la dextranasa en el medio de fermentación.....	33
Figura 8 Principales puntos de hidrólisis en dextranos no ramificados.....	36
Figura 9 Oligosacáridos ramificados producidos por la acción de la dextranasa de <u>Penicillium funiculosum</u> en dextranos de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> (Birming Ham)...	37
Figura 10 Enlaces glucosídicos resistentes a la hidrólisis....	39
Figura 11 Acción de la enzima intracelular de <u>Penicillium funiculosum</u> en oligosacáridos.....	39
Figura 12 Modelo de acción de la dextranasa II de <u>Penicillium funiculosum</u> en isomaltodextrinas lineales.....	41
Figura 13 Diagrama general de trabajo.....	42

PAGINA

Figura 14 Mini fermentador (Fermentation Design, Inc.).....	48
Figura 15 Caracterización de la fermentación de <u>Penicillium funiculosum</u> (matraces).....	61
Figura 16 Caracterización de la fermentación de <u>Penicillium funiculosum</u> (mini fermentador).....	63
Figura 17 Fermentación para la producción de dextranasa por <u>Penicillium funiculosum</u>	67
Figura 18 Cambio en la viscosidad durante la aplicación de la dextranasa en jugos de frutas.....	73
Figura 19 Cambio en los azúcares reductores durante la aplicación de la dextranasa en jugos de frutas.....	74

"PRODUCCION DE DEXTRANASA Y SU
APLICACION EN JUGOS DE FRUTAS"

INTRODUCCION

Los carbohidratos se encuentran difundidos ampliamente en la naturaleza y se pueden clasificar en monosacáridos y polisacáridos.

Los vegetales poseen una cantidad importante de éstos y así podemos encontrar azúcares sencillos (monosacáridos) como la glucosa y la fructosa, los cuales a menudo forman disacáridos de los que la sacarosa constituye el ejemplo más representativo. Otros carbohidratos más complicados son los polisacáridos, los cuales son polímeros de azúcares sencillos que pueden servir de material estructural (como la celulosa, hemicelulosa y pectinas); de sustancia de reserva (como el almidón) y de material de desecho (aquellos que se derivan de bacterias y mohos) como es el caso de numerosas gomas.

En la mayoría de los casos dentro de la composición natural de los jugos de frutas se encuentran polisacáridos que dan lugar a una suspensión coloidal y que le confiere la viscosidad característica de cada uno de ellos, por ejemplo: jugo de piña, tuna, caña de azúcar, uva, mango, etc. Esta característica puede ser modificada por la presencia de microorganismos productores de polímeros como son los casos de los xantanos, dextranos, fosfomananos, polisacáridos B-1973 y el polisacárido Y-1401.

Dentro del complejo grupo de polisacáridos se encuentran los dextranos, los cuales son derivados de la glucosa y que pueden ser sintetizados por microorganismos capaces de producir la dextran-sacarasa y entre éstos se encuentran principalmente, los géneros: *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

Estos microorganismos pueden contaminar las frutas o los jugos obtenidos de éstas, así como los jugos concentrados con un alto contenido de sacarosa por medio del polvo o del agua.

En el caso de que se forme el dextrano éste hace que se presenten dificultades durante los procesos de industrialización de algunas frutas como consecuencia de una relativamente alta viscosidad, que difi-

culta el transporte de fluidos, la transferencia de calor, problemas de filtración, taponamiento de tuberías, formación de espumas y que afectan directa o indirectamente la calidad de los derivados.

Por esta razón se consideró estudiar las perspectivas de producción de una enzima la cual muestre una capacidad de degradar este polímero como una posible solución para los problemas consecuentes de su presencia.

Con el propósito de efectuar la degradación enzimática se estableció utilizar la endo-dextranasa extracelular (E.C. 3.2.1.11) la cual ha sido reportada que puede reducir el tamaño molecular de los dextranos.

La selección de la cepa productora de la enzima fue efectuada en base a datos bibliográficos, donde se reporta la producción de dextranasa por varios mohos y algunas bacterias.

La fermentación para la producción de la enzima se realizó primeramente a nivel laboratorio para de esta forma, establecer las condiciones de producción de la mayor actividad enzimática y posteriormente con esta información efectuar la fermentación de un volumen mayor (5 L), y obtener la enzima suficiente para realizar los ensayos en jugos de uva, tuna y caña de azúcar, determinando los cambios de viscosidad, azúcares reductores y así cuantificar la efectividad de la enzima, evaluando la factibilidad de su aplicación.

OBJETIVOS GENERALES

- A) Obtener por vía fermentativa la enzima "DEXTRANASA" con poder hidrolizante hacia el dextrano, polímero de la glucosa.
- B) Aplicar la enzima en jugos de frutas y determinar su efectividad para la reducción de la viscosidad en los mismos.

ESPECIFICOS

- 1) Seleccionar una cepa de microorganismos, capaz de producir dextranasa.
- 2) Establecer las condiciones a las cuales se produce la mayor actividad enzimática.
- 3) Escalar a un volumen mayor (5 l), la fermentación para la producción de dextranasa, en base a los datos y condiciones óptimas.
- 4) Ensayar la enzima en jugos de frutas y establecer por medio del cambio de viscosidad y el contenido de azúcares reductores, su posible aplicación.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1.1 DEXTRANOS

1.1.1 ORIGEN

Los polisacáridos microbianos pueden ser divididos en forma general dentro de dos grupos:

- a).- Homopolisacáridos
- b).- Heteropolisacáridos

Los homopolisacáridos incluyen aquellos polisacáridos que por hidrólisis solo origina un monómero. Los polisacáridos que por hidrólisis dan dos o más monómeros reciben el nombre de heteropolisacáridos.

De los primeros el polisacárido más conocido son los dextranos. - (8).

Estos polisacáridos forman gomas, las cuales han sido causantes de serios problemas en el vino y la industria del azúcar, en la cual la masa gelatinosa bloquea los filtros e interfiere en los procesos de refinamiento, retardando la cristalización.

La primera atención hacia estas gomas fue dirigida cerca de la mitad del siglo pasado. En 1861 Pasteur demuestra el origen microbiano de esta transformación y Van Tieghem en 1878 aísla uno de estos microorganismos y lo nombra Leuconostoc mesenteroides.

En 1874 Sheiber separa los polisacáridos y los llama dextranos - (20).

Este término ha sido usado para determinar una clase de polisacáridos formado principalmente de unidades de D-glucosa unidas por enla

ces α -[1 \rightarrow 6], producidos por bacterias a partir de sacarosa (22, 26).

1.1.2 FUENTE

Se conoce que los dextranos son producidos por la acción sobre sacarosa, de ciertos microorganismos que forman cadenas de cocos.

Del gran número de bacterias que sintetizan dextranos, se han en cerrado en la familia Lactobacillaceae y más específicamente al género Lactobacillus, Leuconostoc y Streptococcus, especies de estos géne ros que elaboran dextranos se muestran en la tabla 1. (26).

TABLA 1 ESPECIES DE BACTERIAS QUE SINTETIZAN DEXTRANOS

<u>Lactobacillus</u>	<u>Leuconostoc</u>	<u>Streptococcus</u>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. dextranicum</i>	<i>S. bovis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>S. challis</i>
<i>L. casei</i>		<i>S. faecalis</i>
<i>L. musicus</i>		<i>S. mitis</i>
<i>L. pastorianus</i>		<i>S. mutans</i>
<i>L. viridescens</i>		<i>S. sanguis</i>
		<i>S. viridans var.</i>

Fuente: Sidebotham R. L. (1974).

Adicionalmente los géneros Streptobacterium, Acetobacter y Beta-bacterium poseen capacidad para producir dextranos. (23).

De las bacterias productoras de dextranos, las cepas del Leuconostoc mesenteroides son particularmente eficientes para la producción de dextranos a partir de sacarosa (14, 16, 17). Estas cepas poseen la habilidad de producir dextranos en donde el porcentaje de en-

ces α -(1+6) en el dextrano varía, de cerca del 100% al 60% dependiendo de la cepa utilizada y en un grado menor de las condiciones del proceso (3).

Jeanes et. al. (14,16) delinearon las condiciones apropiadas para la producción de dextranos de Leuconostoc a partir de cultivos bacteriales o de extractos enzimáticos y desarrollar un procedimiento para aislar el polisacárido de la mezcla de fermentación.

Del gran número de cepas de Leuconostoc mesenteroides que han sido aisladas y caracterizadas, una de las más usadas es la NRRL-B-512 de la Northern Regional Research Laboratory (Departamento de Agricultura de los E.U.A.) (3).

Hucker y Pederson observaron que esta cepa de Leuconostoc produce en adición al dextrano otras sustancias tales como ácido láctico (levo), ácido acético, etanol y manitol (6).

1.1.3 ESTRUCTURA

En la hidrólisis de los dextranos Scheibler, Durin y Daumichen, encontraron que solamente se obtenía D-glucosa y establecen la fórmula empírica $C_6 H_{10} O_5$ para éste polímero; la fórmula molecular es ahora conocida, $(C_6 H_{10} O_5)_n$. (22).

En los estudios de Hebbert et. al. investigaron la estructura química de los dextranos y detectaron diferencias en propiedades físicas y químicas de los dextranos de Leuconostoc mesenteroides, estas diferencias se confirmaron con los estudios de Sugg y Hekre. (6).

De esta forma la fina estructura de un dextrano es relacionada a la cepa particular que lo produce y no por la especie o género a la cual el microorganismo pertenece (6, 16, 22, 26). Es por esto que casi todo el trabajo con dextranos ha sido efectuado con cepas de Leuconostoc mesenteroides como la B-512 y B-512-F. (26).

Para poder establecer la estructura química de los diferentes

TABLA 2 TIPOS Y PORCENTAJES DE RESIDUOS D-GLUCOPIRANOSIL DIFERENTEMENTE ENLAZADOS EN ALGUNOS DEXTRANOS.

DEXTRANOS	% de Residuos D-Glucopiranosil, enlazados			
	(1 → 6)	(1 → 4)	(1 → 3)	(1 → 2)
<i>L. mesenteroides</i>				
NRRL B-512	95		5	
B-523S	93	3	4	
B-742S	64	8	28	
B-742L	95	4	traza	
B-1064	95	2	3	
B-1299S	56		7	36
B-1299L	49		19	32
B-1355S	53		47	
B-1375 ¹	84.5	1	14.5	
B-1415	87	12.5	0.5	
B-1416	83	7	10	
<i>IFO 12370</i>				
CEPA SF4	95		5	
CEPA 44	71		29	
<i>S. mutans</i>				
OMZ 176	16		84	
Ingbritt A	37.5		62.5	
<i>S. sanguis</i>				
cepa 804	52			
Complejo Tibi ²	90	1.5	8.5	

1.-También reportada como *L. dextranicum*.

2.-*L. brevis/S. cerevisiae*

Fuente: SIDEBOTHAM (1974).

dextranos Jeanes et. al. (16) utilizan varios procedimientos, basados en la medición de la rotación óptica, espectros de infrarrojo, reacciones de oxidación con periyodato, metilación y degradación enzimática, para poder examinar los tipos y proporciones de los diferentes enlaces D-glucosídicos de los dextranos.

Los tipos y configuraciones de los enlaces en un gran número de dextranos han sido determinados, caracterizando los fragmentos disacáridos obtenidos por una hidrólisis ácida parcial y acetólisis de los dextranos. Se encontró que los hidrolizados contenían invariablemente el disacárido isomaltosa en adición de trazas de los disacáridos -enlazados en (1+2); (1+3) y (1+4) en dextranos altamente ramificados- (26).

Por medio de la oxidación con periyodato se ha podido establecer el porcentaje y tipo de enlace de los residuos D-glucopiranosil en algunos dextranos como se muestra en la tabla 2.

Por medio de todos los estudios mencionados anteriormente se llegó a establecer lo siguiente:

1).-Estructura del esqueleto de la cadena principal

La cadena principal del dextrano está compuesta de una secuencia de residuos α -D-glucopiranosil unidos en (1+6) y algunos de estos residuos llevan ramificaciones en sus carbonos C_2 ; C_3 y C_4 .

2).-Enlaces secundarios

Todos los dextranos que han sido examinados a la fecha contienen enlaces secundarios α -D-glucopiranosídicos, aunque existen diferencias considerables en los tipos y proporciones de los enlaces secundarios presentes en los dextranos elaborados por diferentes microorganismos (uniones que hacen a cada dextrano característico del microorganismo particular que lo sintetizan).

3). -Ramificación.

Mediante el análisis de Metilación en preparaciones de dextranos se ha observado que contienen proporciones variables de residuos - - D-glucopiranosil de ramificación. Estos residuos poseen una distribución al azar a lo largo de la molécula del dextrano y casi todos (si no es que todos) llevan solo una simple unión ramificada en C₂, C₃ y C₄.

Casi todas las ramificaciones en los dextranos que han sido examinados consisten en un solo grupo α -D-glucopiranosil, aunque se han presentado evidencias que indican la presencia de ramificaciones compuestas de entre dos y cincuenta residuos unidos en (1→6). (26).

A manera de ejemplo se puede mostrar la figura 1.

Aunque la estructura del dextrano no ha sido estudiada con suficiente detalle, como para permitir una asignación no equivocada de un tipo de estructura de la molécula, la estructura parcial que ha sido identificada en dextranos puede por ejemplo representar segmentos de molécula, teniendo tipo de estructura como peine, laminada o ramificada, figura 2.

Como se mencionó anteriormente, el dextrano utilizado con mayor frecuencia en los estudios estructurales, es el NRRL-B-512, el cual de acuerdo con los resultados presentados por Cleve et. al. (35), en base a estudios de metilación proponen que la estructura de este dextrano, consiste en promedio, de 25 residuos de anhidroglucosa. De este número 21 son residuos enlazados en (1→6); 1 es un residuo enlazado en (1, 3, 6), y 1 es un grupo final no reductor, figura 3.

En la figura 4 se muestra la estructura parcial de dextrano de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512.

1.1.4 PROPIEDADES

Como se ha mencionado, las características y propiedades de los dextranos se deben en gran parte a la cepa productora y al método de

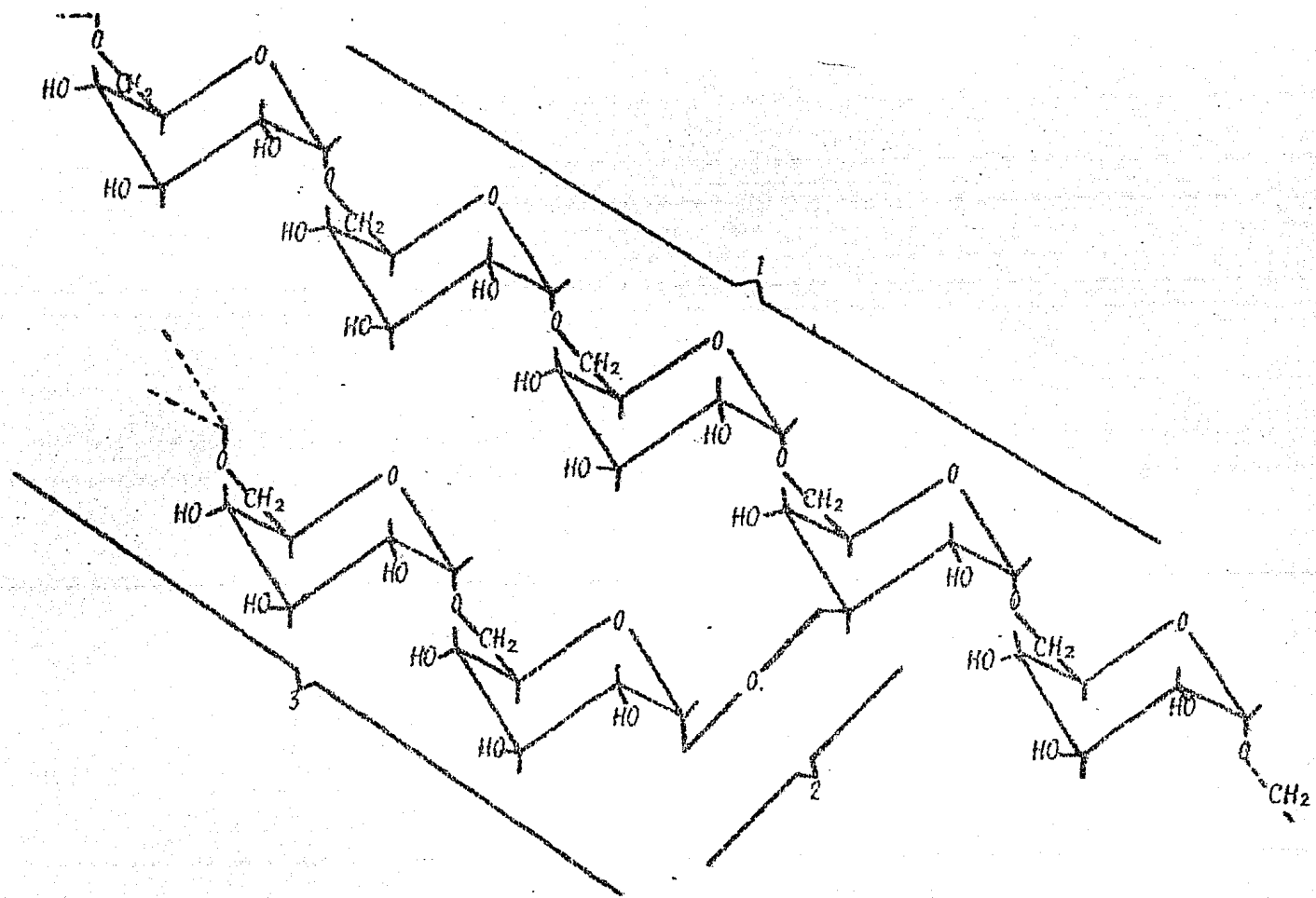


FIGURA 1 ESTRUCTURA GENERAL DE LOS DEXTRANOS

- 1.- Cadena Principal
- 2.- Enlace Secundario
- 3.- Ramificación

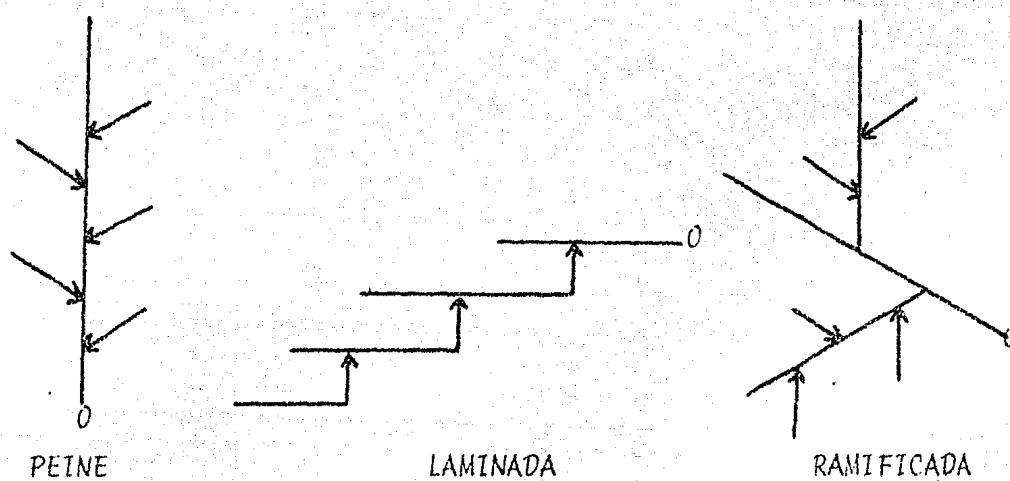


FIGURA 2 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE POSIBLES TIPOS DE ESTRUCTURAS EN DEXTRANOS

0 = Residuo terminal, extremo reductor

→ = Enlaces secundarios

— = Cadenas de residuos α -D-glucopiranosil enlazados en (1→6) y algunas veces enlazados en (1→3)

(Fuente Sidebotham 1974).

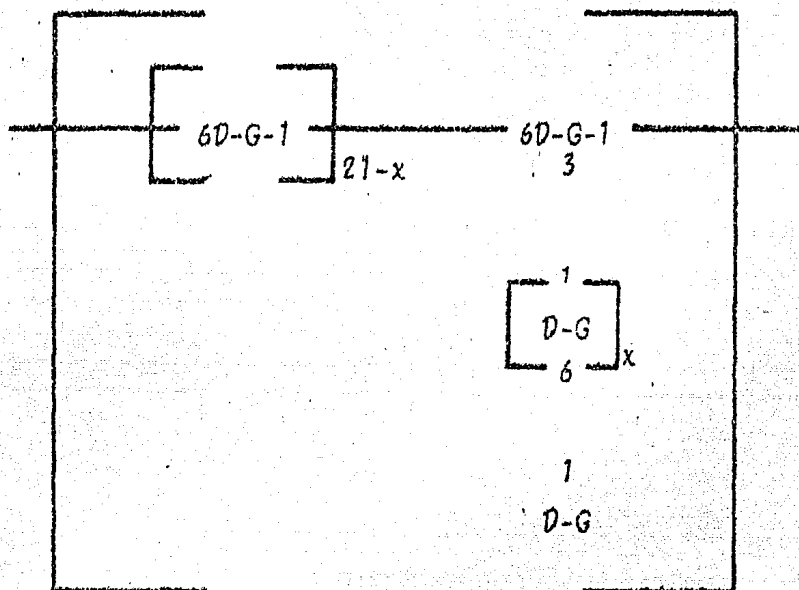


FIGURA 3 FORMULA ESTRUCTURAL PROPUESTA PARA EL DEXTRANO DE Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512 POR ESTUDIOS DE METILACION.

En estudios adicionales se ha comprobado la existencia de sólo un residuo de D-glucosa en la cadena ($x=0$) (35).

(Fuente: Van Cleve, 1956).

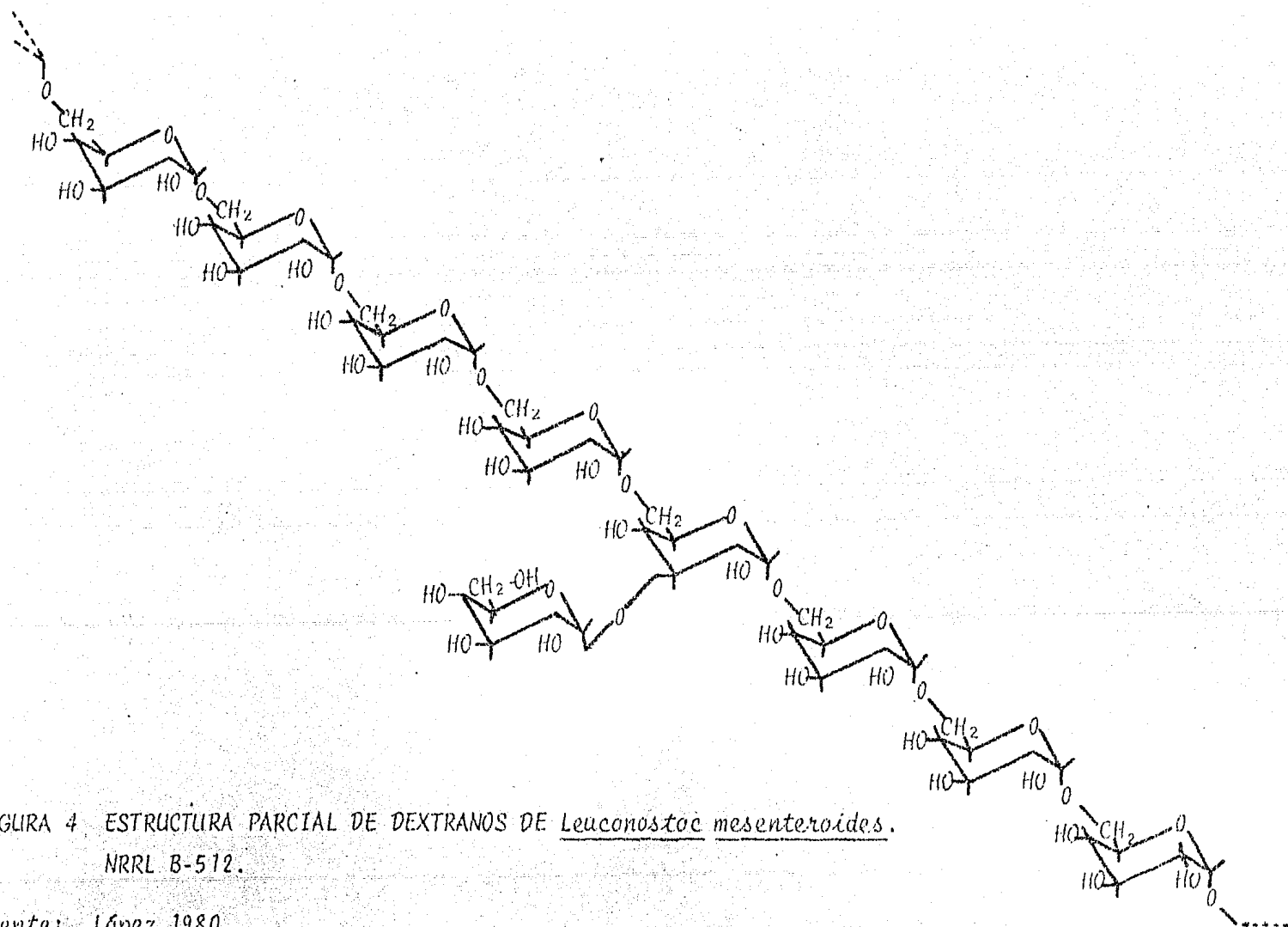


FIGURA 4. ESTRUCTURA PARCIAL DE DEXTRANOS DE Leuconostoc mesenteroides.
NRRL B-512.

Fuente: López 1980.

producción. (3, 6, 16, 22, 26, 33).

El dextrano es un polisacárido neutro, fácilmente soluble en agua fría o caliente, formando soluciones viscosas claras. Es insípido, químicamente compatible con la mayoría de los ingredientes normalmente usados en alimentos.

Tienen características hidrocoloidales típicas, tales como emulsificante y estabilizante en sistemas agua-aceite. Son conocidas también sus cualidades humectantes e imparte cuerpo a los alimentos líquidos.

La estructura química cuando es de un bajo grado de ramificación proporciona un alto grado de estabilidad a la despolimerización hidrolítica, lo cual lo hace útil como un sustituto sintético del plasma sanguíneo.

Fisiológicamente el dextrano cuando se ingiere es hidrolizado lentamente a carbohidratos absorbibles, los cuales son utilizados produciendo un modesto pero sustancial incremento en las sustancias reductoras en la sangre y el glucógeno del hígado. La evidencia sugiere que el rompimiento intestinal del dextrano no es atribuible solo a la acción bacteriana, sino más probablemente a una enzima o enzimas presentes en la mucosa intestinal.

Baker reporta que pruebas biológicas demuestran que cuando el dextrano conteniendo una alta proporción de enlaces α -(1+6) es incluida en una dieta normal, la ganancia en peso del cuerpo es inhibida. Así puede sugerirse su uso en alimentos de bajas calorías o en dietas reductoras (8).

1.1.5 USOS O APLICACIONES DE LOS DEXTRANOS

A pesar de que el dextrano es primeramente un problema, se han propuesto una serie de aplicaciones industriales para el dextrano.

1.1.5.1 SIGNIFICACION CLINICA

Los dextranos resultan interesantes, debido a su uso como sustituto del plasma sanguíneo. Así los dextranos naturales o nativos se pueden modificar por hidrólisis parcial y fraccionamiento para obtener dextranos clínicos ($\overline{PM} = 75000 \pm 25000$) apropiados para su utilización como componente esencial de productos para la reposición del volumen sanguíneo. Han sido muchos los substitutos que han sido estudiados en años pasados, entre ellos se incluyen: Algina, pectina, caseína, gelatina, goma arábiga, polivinilpirrolidona (PVP) y el dextrano.

De los materiales estudiados el P.V.P. y el dextrano son los más prometedores.

Clínicamente el dextrano posee algunas ventajas; es termorresistente, se puede conservar sin refrigeración y no actúa como transportador de virus causante de la hepatitis infecciosa; no interfiere en las determinaciones de clasificación del tipo sanguíneo, pudiendo administrarse a individuos con sangre de cualquier tipo, su viscosidad y presión osmótica son satisfactorias y no produce sedimentación de células sanguíneas. (23)

Los dextranos clínicos son fabricados actualmente en Estados Unidos por un método patentado por Gronwell e Ingelman en 1948. (3)

1.1.5.2 DEXTRANOS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

1.1.5.2.1 PRODUCTOS HORNEADOS

Bohn observó que la incorporación de pequeñas cantidades de dextranos en pastas para pan, las cuales solo contienen gluten y levadura producen panes más suaves, con mayor volumen y vida de anaquel que los panes ordinarios. Los dextranos utilizados fueron obtenidos a partir de Leuconostoc mesenteroides, teniendo un peso molecular de $20-49 \times 10^6$. La cantidad de dextranos usados fue de 0.01%-10% en peso-

de la harina contenida en la pasta. La adición de dextrano a la pasta aumentó las propiedades de absorción de agua de la pasta resultante y haciendo a la masa más extensible.

Toulmin preparó envases comestibles tales como los conos para helado, a partir de dextranos, el cual fue mezclado con azúcar, leche y agua o plastificante oleoso para dar una masa que pudiera ser moldeada y horneada de forma usual. (8).

1.1.5.2.2 BEBIDAS

Hamburg usó dextranos para reemplazar del 10-20% de la malta usada en la producción de cerveza Pilsener. Las cervezas de dextranos fueron reportadas por tener buen aroma y espuma estable, conservaban el color de la cerveza de malta pura.

También han sido utilizadas por Martens como componente de una bebida preparada por una fermentación láctica bacteriana de chocolate con leche actuando como estabilizador.

Mohoney encontró que son efectivos en la estabilización de bebidas suaves y extractos de aroma. Así mismo Wadsworth y Hughes, encontraron que son útiles en la producción de jarabes de azúcar no cristalizables, donde la estabilidad y viscosidad son cualidades importantes. También se ha sugerido el empleo de los dextranos como agentes que le confieren cuerpo a bebidas bajas en calorías, y libres de azúcar. (8)

1.1.5.2.3 CONFITERIA

Mahoney describe a los dextranos como constituyentes deseables para usarse en todos los productos alimenticios en los cuales hay azúcar como componente. Su valor se basa en su capacidad para prevenir la cristalización, mejora la retención de humedad, mejora el cuerpo, mantiene la apariencia y el aroma, y fue usado efectivamente en dulces, fondants, jaleas y frutas enlatadas. (8).

1.1.5.2.4 REVESTIMIENTOS PRESERVATIVOS

El dextrano ha sido empleado para preservar gran variedad de alimentos, evitando el secado del alimento durante el almacenaje y protegiéndolo contra los efectos deteriorantes de la exposición al aire.

Toulmin usó una solución acuosa para dispersar el dextrano nativo o hidrolizado, para preservar camarones y otros productos. De manera similar otros productos tales como carnes, frutas secas y quesos podrían ser revestidos con una película de dextrano el cual protege al alimento contra el secado en el almacenamiento.

Novak usó soluciones acuosas de dextrano, que contenían antibióticos como un revestimiento preservativo para alimentos congelados rápidamente, tales como pescado o espinacas. La película de dextrano alargó la vida de anaquel y retardó la pudrición durante el descongelamiento. De manera similar Woodmansee y Abbott recubrieron pollo sub-esaldado y partes asadas con dextrano para protegerlo de la deshidratación y oscurecimiento de la piel en el almacenamiento. (8)

1.1.5.2.5 OTROS

Owen sugiere el uso del dextrano como un acondicionador en chicles, como estabilizador en helados. Podría también usarse en fabricación de garapiñados y cremas sintéticas.

En general el dextrano podría reemplazar por completo o en parte a las gomas tales como: goma arábiga, karoya, locust bean, traganto o alginatos. (8).

1.1.6 LOS DEXTRANOS EN LA INDUSTRIA DEL AZUCAR

La contaminación de la caña de azúcar con microorganismos Lactobacilli y Leuconostoc es ahora generalmente aceptado como el factor principal que contribuye a las deterioraciones postcosecha de este cultivo. A parte de causar bajas significativas de sacarosa y de aparecer sabores extraños por la presencia de ácidos orgánicos, esas

bacterias son capaces de convertir sacarosa en dextranos, los cuales pueden disminuir grandemente la eficiencia del proceso de obtención del azúcar. Los efectos adversos que éstos producen en combinación de otros factores, contribuyen a reducir la eficiencia y capacidad de refinación. (26)

La presencia de dextranos en jarabes de azúcar retarda grandemente la filtración, clarificación, cristalización y eleva grandemente la viscosidad de las soluciones de sacarosa, por ejemplo 1% de éstos aumenta al doble la viscosidad y el 6% la incrementa 37 veces. (6,22)

Así mismo los dextranos contribuyen al taponamiento de filtros y cañerías, de igual forma este polímero fomenta la formación de costras en los equipos y tuberías, lo que resulta ser un obstáculo para la transmisión de calor en el proceso de jugo de caña de azúcar.

Adicionalmente los dextranos interfieren en los métodos polarimétricos usados en el control del proceso del azúcar, para determinar sacarosa y la pureza de ésta, ya que son altamente dextrorrotatorios y a menos que se remuevan antes del análisis, la pureza de las muestras es sobrestimada por el aumento en el valor de la polarización directa. (26)

Por estas razones algunos investigadores han usado algunas sustancias bactericidas, como Ionas, el cual indica el uso de dióxido de azufre en las soluciones de sacarosa para controlar el crecimiento bacteriano, al igual que el uso de cal (óxido de calcio) para remover dextranos de soluciones de azúcar. Sin embargo trazas de dextranos pueden existir en casi todas las preparaciones de sacarosa, aún en reactivos de sacarosa Q.P. (6)

Ultimamente se ha estudiado la posibilidad de tratar jugos crudos de caña de azúcar con preparaciones de enzima dextran-degradante. Una dextranasa sintetizada por Penicillium funiculosum ha sido reportada que disminuye los niveles de dextranos en jugos de caña. (26) Sin embargo, la enzima sufre de algunas desventajas, como son su ter-

moestabilidad y que no es capaz de degradar dextranos altamente ramificados. (4)

1.1.7 METODOS DE PRODUCCION DE DEXTRANOS

Los dextranos son producidos normalmente por fermentación o síntesis enzimática y al polímero así obtenido y el cual no ha sufrido alteración por hidrólisis o fraccionamiento, se denominan dextranos naturales o nativos.

El peso molecular del polímero varía de unos miles a millones; el peso molecular promedio del dextrano producido por Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512 es de 30-50 millones.

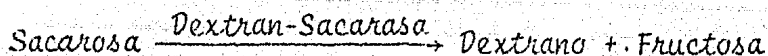
Los dextranos nativos se modifican por hidrólisis parcial o fraccionamiento para obtener dextranos clínicos. (23)

Los dextranos se pueden producir por medio de un procedimiento de fermentación o por un método indirecto que implica la obtención de la dextran-sacarasa y seguida de una síntesis enzimática del dextrano (23) actualmente se ha utilizado la inmovilización de la enzima, lo cual hace que el proceso sea continuo. (20).

1.1.7.1 PRODUCCION POR FERMENTACION

En este procedimiento el dextrano es producido directamente por microorganismos a partir de una solución que contiene sacarosa.

La síntesis en forma general se lleva a cabo de acuerdo a la siguiente reacción:



Para su separación del líquido de fermentación, el polímero es precipitado con soluciones de metanol, etanol o acetona. (26).

1.1.7.2 PRODUCCION POR SINTESIS ENZIMATICA

Para este proceso, los estudios realizados por Hehre en 1941, - 1946, 1951, Hehre y Sugg en 1942 sobre la dextran-sacarasa, constituyen la base para las investigaciones sobre la síntesis enzimática del dextrano. (23)

La enzima dextran-sacarasa ha sido clasificada como un miembro - de la clase general de las transglucosidasas y es llamada en la literatura como α -(1 \rightarrow 6)-D-glucan-D-fructosa-2-D-glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.5.).

Estas especificaciones implican que la enzima exclusivamente cataliza la síntesis de cadenas de residuos α -D-glucopiranosil unidos - en (1 \rightarrow 6) en sacarosa (26). Así los dextranos sólo pueden ser producidos a partir de sacarosa y no de glucosa, ni de mezclas de glucosa y fructosa. (3)

Como se mencionó anteriormente las cepas Leuconostoc mesenteroides resultan de gran utilidad en la síntesis de los dextranos. En forma general las preparaciones enzimáticas de Leuconostoc mesenteroides exhiben una actividad óptima a un pH de 5.0-5.5 y a una temperatura de 29°-34°C, estas preparaciones sintetizan dextranos de alto peso molecular (\overline{PM} $3-5 \times 10^7$) formado de 5% a 35% de uniones ramificadas.

El procedimiento para la síntesis enzimática de los dextranos - lleva implicadas las siguientes fases:

- a).- Producción de la dextran-sacarasa
- b).- Eliminación de células bacterianas del medio de producción
- c).- Síntesis del dextrano con una mezcla de reacción que contiene sacarosa y la dextran-sacarasa. (Figura 5)
- d).- Precipitación del dextrano con solventes y separación del medio de producción. (23)

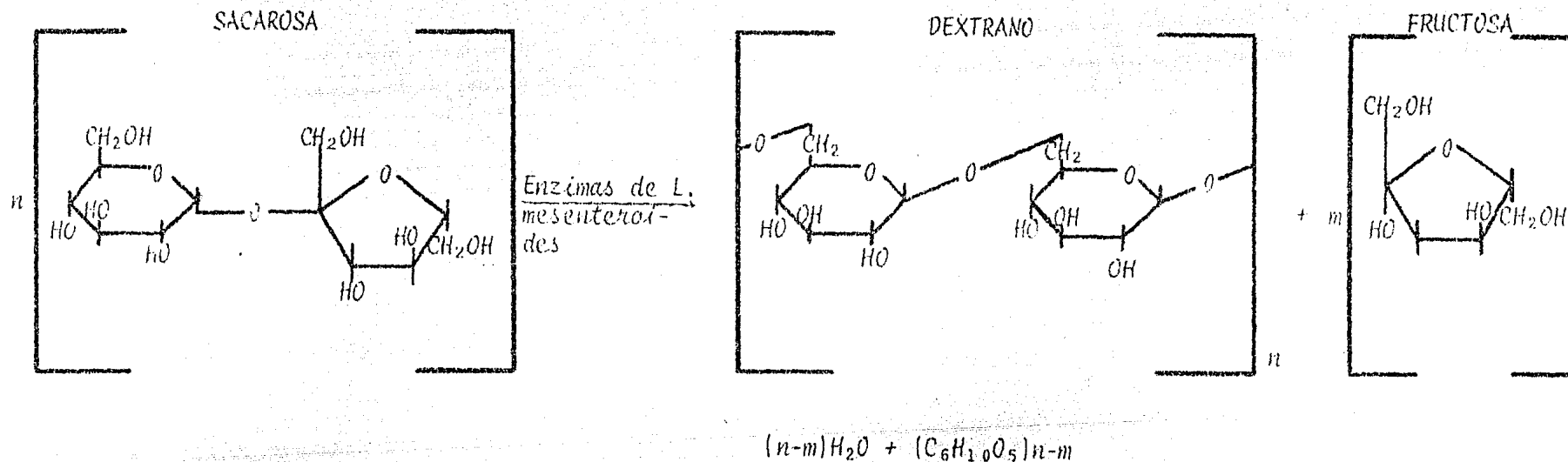


FIGURA 5 REACCION DE PRODUCCION DE DEXTRANOS

Fuente: Bixler et al (1953)

1.2 DEXTRANASA

1.2.1 DESCRIPCION

Enzima cuyo nombre sistemático es el de α -D-(1 + 6) glucan-6-D-glucanohidrolasa. (E.C.3.2.1.11). Es capaz de hidrolizar los enlaces - glucosídicos α -(1+6) de los polisacáridos bacteriales denominados "Dextranos".

Dicha enzima es producida por una gran variedad de hongos y algunas bacterias y en algunos casos por tejidos de mamíferos. (7,26)

Aunque el término Dextranasa es usado en singular se reconoce la posibilidad de ser más de una enzima la que degrada los dextranos - - pues un microorganismo puede producir más de un tipo de enzimas dextrandespolimerizante. (34)

1.2.2 ORIGEN

Por los problemas que la presencia de los dextranos causan en el procesamiento de soluciones con alto contenido en azúcar, como es el caso de los jugos, se ha tratado de realizar una degradación de éstos, para reducir el tamaño de dicho polisacárido.

El dextrano se puede despolimerizar por varios métodos como son: la hidrólisis ácida, enzimática (23), calor (37), vibraciones ultrasónicas y luz ultravioleta. (36)

Los primeros intentos por romper la cadena principal del polisacárido, fueron enfocados hacia el conocimiento de la estructura del -- polisacárido. Es así como en combinación con otros métodos la hidró -- lisis enzimática permitió importantes contribuciones al respecto de la estructura del dextrano.

Así en los primeros intentos por degradar a los dextranos se utilizaron varias amilasas, fosforilasas (32) y jugo digestivo de un caracol y los cuales no presentaron acción hidrolítica alguna, sobre los dextranos. (9)

Ingelman (11) reporta la incidencia de una enzima que rompe al dextrano y la cual es producida por la bacteria Cellvibrio fulva.

Durante la búsqueda de microorganismos capaces de producir dextranasa Hultin y Nordstrom (9) bajo el principio de crecimiento por inducción, utilizaron una solución de nutrientes a la cual como única fuente de carbohidratos se le adicionaron los dextranos. Suponiendo que solo los microorganismos que se desarrollaran en ese medio de cultivo podían producir la dextranasa.

Así examinaron cerca de 30 hongos, de los cuales de acuerdo con los resultados obtenidos seleccionaron algunas especies, las cuales pueden utilizar al dextrano para formar la enzima hidrolizadora. Los microorganismos que presentaron un mayor desarrollo y con ello la producción de enzima fueron: Penicillium funiculosum; Penicillium lilacinum; Berticillium coecorum, de los cuales se prepararon extractos enzimáticos en donde se probó la existencia de la dextranasa.

Adicionalmente se hace notar la influencia de los iones nitrato y amonio, en los cambios de pH en el medio de cultivo y con ello en el rendimiento de la dextranasa; dichas alteraciones son impedidas o restringidas, si el porcentaje mol del ion amonio y del ion nitrato en la solución de nutrientes es cercano al 45% y 55% respectivamente.

Tsuchiya (34) reporta la producción y actividad de ciertas enzimas de hongos para degradar dextranos de Leuconostoc mesenteroides a isomaltosa y oligosacáridos. Este dextrano es de un tipo lineal el cual contiene aproximadamente el 95% de uniones α -(1+6). (14)

Los trabajos relativos a la búsqueda de microorganismos productores de enzima hidrolizante de los dextranos por Tsuchiya dan comienzo en 1945 y hasta la fecha de la publicación de su trabajo en 1952 tenía cerca de 200 cepas de hongos, bacterias y algunas levaduras con capacidad para producir dextranasa extracelular. Aunque al igual que Van Tieghem; Colin y Berval y otros fué incapaz de encontrar organismos productores de la enzima en grandes cantidades entre las levaduras y bacterias.

Independientemente de lo realizado por Hultin y Nordstrom, Tsuchiya encuentra que ciertas especies de Penicillium producen dextra ---

nasa extracelular en pequeñas cantidades, pero al probar las especies reportadas por éstos observó que poseen una gran actividad de dextranasa extracelular en contraste con los reportes de enzima intracelular.

Como consecuencia examina varias especies de *Penicillium* de las cuales se había obtenido enzima intracelular, junto con cepas de *Aspergillus*, *Verticillium*, *Cephalosporium* y *Spicaria*.

Los resultados indican que 20 cepas de *Penicillium lilacinum*; *Penicillium verruculosum*; *Penicillium funiculosum* y *Spicaria violacea* producen cantidades considerables de dextranasa extracelular y de esta manera selecciona varios microorganismos para estudios posteriores, -- dichas especies son:

Penicillium lilacinum cepa NRRL 896

Penicillium verruculosum cepa NRRL 2135

Penicillium funiculosum cepas NRRL 1132 y NRRL 1768

Sery et. al. (25) reporta la producción de un sistema enzimático conteniendo dos diferentes dextranasas en donde el efecto de una de ellas es el de disminuir la viscosidad y el de la otra liberar glucosa, este sistema es producido en el intestino humano por una bacteria.

Bailey (2) reporta que dos especies de *Lactobacillus bifidus* -- del rumen de bovinos y una especie del intestino humano, son capaces de producir una dextranasa extracelular.

Fisher y Stein (7) al igual que Tsuchiya reportan un sistema enzimático responsable de la ruptura del polímero y el cuál consiste de una mezcla de endo y exodextranasa, pues la preparación de enzima parcialmente purificada rompe también enlaces glucosídicos en α -(1+4), -- aunque la ruptura de enlaces α -(1+6) es mucho más rápida.

Mencier (21) en el año de 1972 desarrolla un método simple y rápido para poner en evidencia los microorganismos productores de dextranasa, y el cuál a diferencia de los descritos por Hultin; Charles; Sevenhuizen y Broven, los cuales son largos y requieren de una gran can-

tividad de material, lo cual no ocurre con el método propuesto por Mención. El método se basa en la utilización del dextrano azul 2000.

Yamaguchi et. al. (39) y Sugiura (29) reportan la producción y propiedades de una dextranasa alcalina proveniente de una bacteria - del género Brevibacterium a la cual llaman Brevibacterium fuscum var. dextranolyticum, la cual produce una enzima cuya máxima actividad óptima es a un pH de 7.0-7.5; siendo estable en un amplio rango de pH, de 5.0-11.0 (a 37°C durante 12 Hrs.), esto es importante debido a que la mayor parte de las dextranasas reportadas tienen un pH óptimo de actividad de 4.0-6.0 .

Kosaric et. al. (19) reportan la producción de una dextranasa - de Penicillium funiculosum SH-5, seleccionada entre 29 cultivos de Penicillium para estudios posteriores sobre las propiedades de la dextranasa, cinética de reacción de la producción de la enzima así como el efecto de iones metálicos y EDTA en la actividad de la dextranasa.

Janson (12, 13) reporta el aislamiento de una dextranasa producida a partir de una cepa de la bacteria Cytophaga johnsonii.

1.2.3. PROPIEDADES DE LA DEXTRANASA

Por su gran utilidad en la producción de dextranasa las cepas - de Penicillium funiculosum , han sido utilizadas en una gran serie de trabajos para establecer las características de la dextranasa.

La dextranasa posee un pH óptimo para su máxima actividad en un rango de pH de 4.0-6.0; así como el rango de pH para su estabilidad - es de 4.0-8.0 . Figura 6.

En cuanto a la temperatura óptima para el máximo de actividad, - es de alrededor de 45-50°C, y el rango de temperatura para su estabilidad es de 45°C o menos. (Figura 7); un resumen de los datos reportados por varios autores para la dextranasa de Penicillium funiculosum - se muestra en la tabla 3.

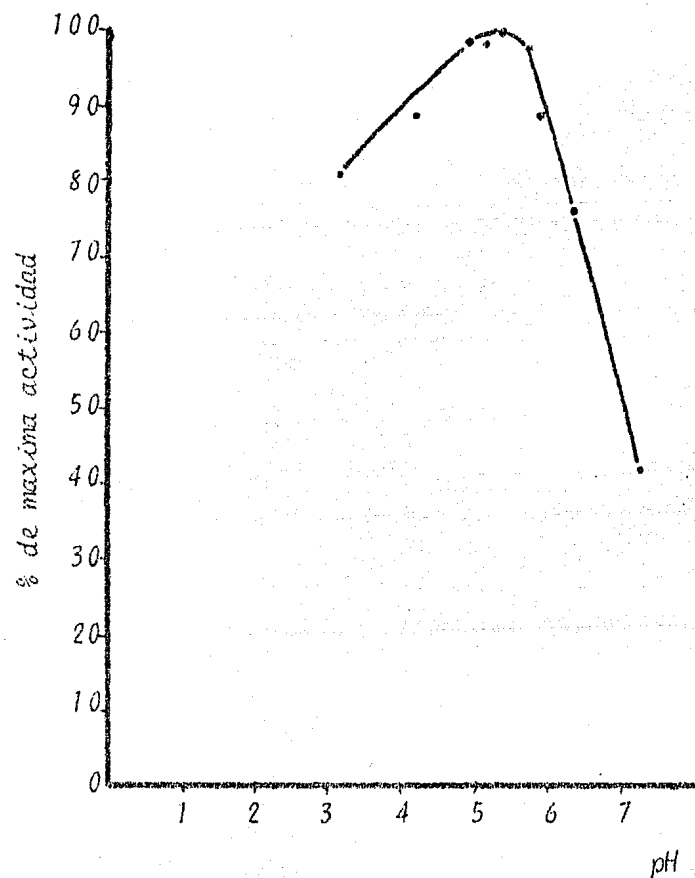


FIGURA 6 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Fuente : Kosaric et. al. 1973.

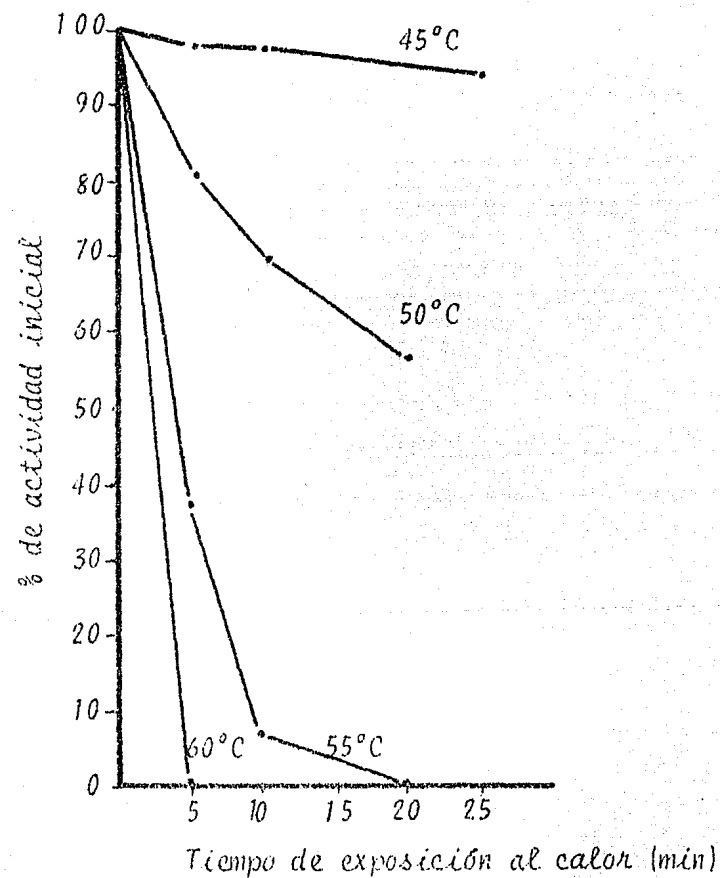


FIGURA 7 TERMOESTABILIDAD DE LA DEXTRANASA EN EL MEDIO DE FERMENTACION.

Fuente : Kosaric et. al. 1973.

TABLA 3 PROPIEDADES DE LA DEXTRANASA PRODUCIDA POR Penicillium funiculosum.

	Kosaric (19)	Sugiura (28)	Tsichiya (34)	Hutson (10)	Fischer (7)	Bourne (4)
pH óptimo para máxima activi- dad.	5.0-5.5	6.0		4.0-5.0	4.0-5.5	4.3-5.0
pH de mayor -- estabilidad.		5.0-7.5	4.3-7.9 (30°C) 4.1-7.25 (40°C)		4.0-8.0	
Temp. óptima -- para máxima -- actividad.	55°C			30-40°C		45-50°C
Temp. de mayor estabilidad.	45°C	40°C				

1.2.4 MECANISMO DE ACCION

El conocimiento del mecanismo de acción de la dextranasa nos -- permite predecir el tipo de producto de la hidrólisis enzimática. El mecanismo depende en forma directa del tipo de enzima (exo- o endohidrolítico); así como del tipo de polímero a degradar (lineal o ramificado.).

La dextranasa se ha obtenido de fuente animal, obteniendo generalmente exodextranasa y como fuente de endodextranasa se encuentran los mohos y bacterias. (7)

De éstas fuentes los mohos son los principales productores de la endodextranasa y del gran número de mohos reportados como productores de ésta sobresale el Penicillium funiculosum, por lo que los estudios del mecanismo de acción de la dextranasa se enfocan sobre la enzima producida por este moho.

1.2.4.1 MECANISMO DE ACCION DE LA DEXTRANASA PRODUCIDA POR Penicillium funiculosum.

Durante los primeros trabajos realizados en la búsqueda de microorganismos capaces de producir la dextranasa, se reporta que al actuar la enzima el poder reductor de las soluciones que contienen dextranos aumenta, pero sin llegar a esclarecer la causa de éste aumento.

En trabajos posteriores y una vez que se contaba con un buen número de microorganismos productores de dextranasa, se trato de dilucidar el tipo de productos de la hidrólisis enzimática y de ésta forma establecer el mecanismo de acción.

Así es como Tsuchiya (34) reporta la acción de una enzima hidrolizante de los dextranos, la cuál produce di y grandes oligosacáridos

Posteriormente Jeanes (15) reporta la acción de 2 cepas de Penicillium funiculosum, en dextranos de Leuconostoc mesenteroides B-512 e identifica a la isomaltosa e isomaltotriosa como productos de la -- hidrólisis.

c).- Los oligosacáridos ramificados fueron identificados y sus estructuras se muestran en la figura 9.

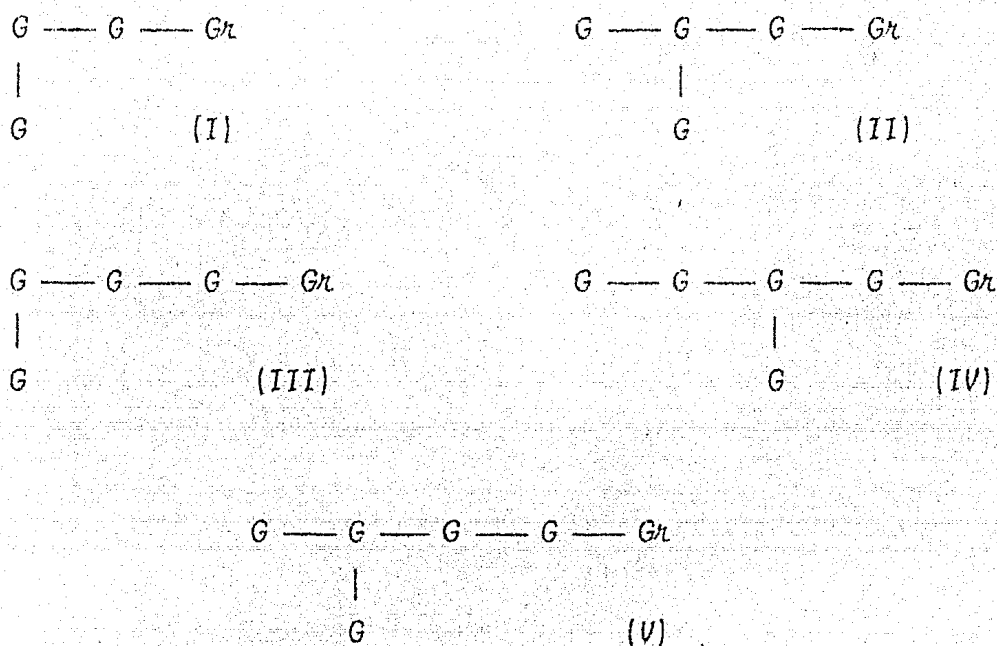


FIGURA 9 OLIGOSACARIDOS RAMIFICADOS PRODUCIDOS POR LA ACCION DE LA DEXTRANASA DE Penicillium funiculosum, EN DEXTRANOS DE Leuconostoc mesenteroides (Birminham) :
 — enlace α -(1+6) ; | enlace α -(1+3) ; Gr unidad de glucosa reductora ; G unidad glucosil.

Hutson y Wiegel (10) tomando como base los trabajos realizados por Bailey (4) y Bourne (5) llevan a cabo una serie de tratamientos con dextranasa intracelular y extracelular de Penicillium funiculosum en dextranos de Leuconostoc mesenteroides.

Hutson et. al. (10) reportan la producción de tetra-, penta-, hexa-, hepta- y octasacáridos, conteniendo una unidad de glucosa unida a través de un enlace α -(1+3) a una unidad de glucosa del correspondiente oligosacárido de la serie de la isomaltosa, esto sugiere que la

hidrólisis del dextrano es inhibida por la presencia de enlaces α -(1 \rightarrow 3) reforzando lo ya reportado.

Con los resultados obtenidos se llegaron a los siguientes conclusiones :

- a).- La enzima no puede hidrolizar enlaces α -(1 \rightarrow 3).
- b).- Por lo menos 2 enlaces α -(1 \rightarrow 3) en el lado reductor del punto de ramificación de la cadena principal del dextrano son resistentes a la hidrólisis.
- c).- La dextranasa extracelular hidroliza la cadena principal del dextrano cerca del lado no reductor del punto de ramificación.
- d).- Un enlace adicional en el lado no reductor del oligosacárido ramificado es resistente a la hidrólisis.
- e).- Los oligosacáridos ramificados producidos por la acción de la dextranasa extracelular (figura 9), tienen solo una unidad glucosídica en la ramificación, confirmado lo reportado por Bovey para el dextrano de Leuconostoc mesenteroides el cuál contiene el 30% de ramificaciones, consistentes de sólo una unidad glucosídica.

Las conclusiones se pueden resumir en la figura 10 donde se muestra el segmento de la molécula del dextrano, mostrando los enlaces glucosídicos en la vecindad del punto de ramificación los cuales son resistentes a la hidrólisis.

Con respecto a los resultados obtenidos por la acción de la enzima intracelular en los oligosacáridos producidos por la dextranasa extracelular, se encontraron puntos resistentes a la hidrólisis, los cuales se muestran en la figura 11.

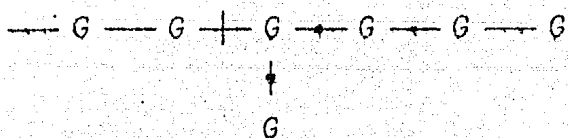


FIGURA 10 ENLACES GLUCOSIDICOS RESISTENTES A LA HIDROLISIS.

G unidad glucosídica; — enlace α-(1→6); | enlace α-(1→3) resistente; —•— enlace glucosídico resistente en dextranos y oligosacáridos; —+— enlace adicional resistente en oligosacáridos.

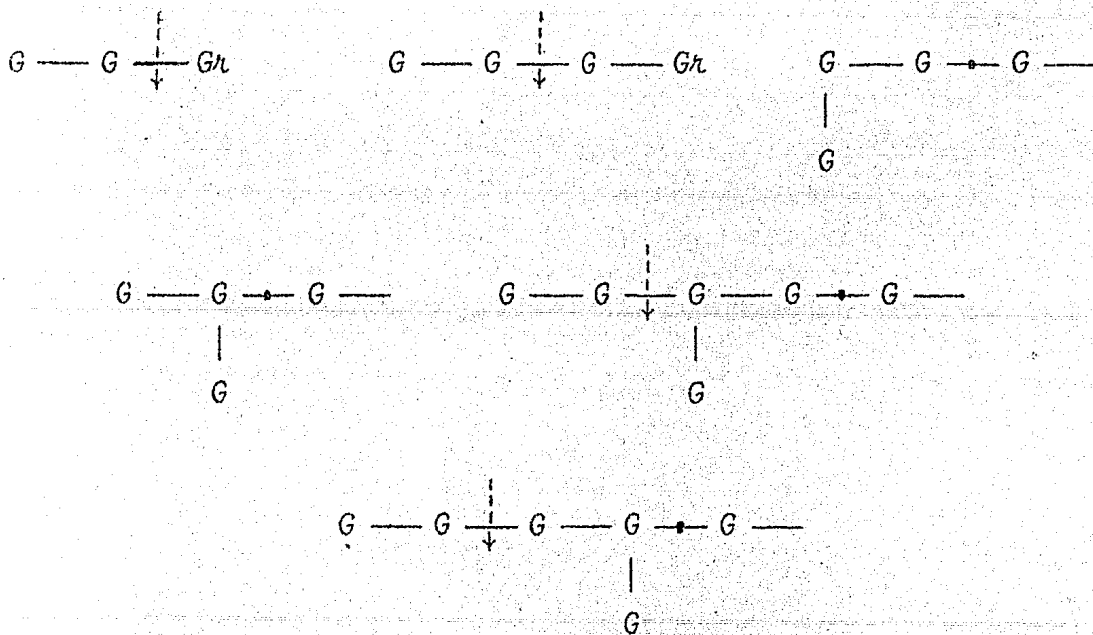


FIGURA 11 ACCION DE LA ENZIMA INTRACELULAR DE Penicillium funiculosum EN OLIGOSACARIDOS.

— enlace α-(1→6); | enlace α-(1→3); G unidad glucosil ; -- Gr unidad de glucosa reductora; ---> punto de hidrólisis ; --•— enlace α-(1→6) resistente a la hidrólisis debido a la -- presencia del punto de ramificación en la unidad isomaltosil.

En años posteriores Sugiura et. al. (30), reportan el modelo de acción de la dextranasa de Penicillium funiculosum, pero en éste caso se utilizaba enzima purificada y no impura como en los primeros trabajos.

Así probó la acción de la dextranasa II (30) en dextranos de Leuconostoc mesenteroides N-4 que produce un dextrano lineal y al cabo de 120 minutos, el grado de hidrólisis alcanzado fué de cerca del 40% y de acuerdo con los cromatogramas, los principales productos son: isomaltosa, isomaltotriosa, -tetraosa, -pentaosa, -hexaosa y otras -- isomaltodextrinas largas.

A su vez las isomaltodextrinas fueron incubadas con la dextranasa II y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

TABLA 4 PRODUCTOS DE LA HIDROLISIS DE ISOMALTODEXTRINAS POR LA ACCION DE LA DEXTRANASA II.

Sustrato	Producto
Isomaltotriosa	Glucosa e Isomaltosa*.
— tetraosa	Isomaltosa.
— pentaosa	Isomaltosa e Isomaltotriosa.
— hexaosa	Isomaltosa, -triosa, -tetraosa.
— heptaosa	Isomaltosa, -triosa, -tetraosa, -pentaosa.
— octaosa	Isomaltosa, -triosa, -tetraosa, -pentaosa, -hexaosa.

*Solo cuando es usada una gran cantidad de enzima.

Fuente : Sugiura et al. (1973).

De acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a la siguiente conclusión :

Los puntos de ataque de la enzima en isomaltodextrinas son en primer lugar en el segundo y tercer enlace glucosídico del extremo no reductor del sustrato y de acuerdo al incremento en el grado de polimerización del sustrato, la enzima ataca también al cuarto o quinto enlace glucosídico y de ésta forma se comprueba que la enzima es del tipo endo. Figura 12.

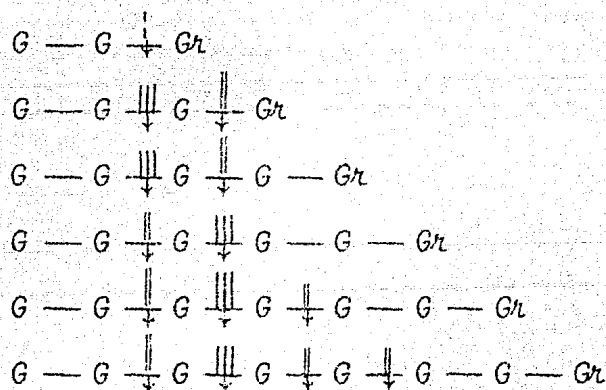


FIGURA 12 MODELO DE ACCION DE LA DEXTRANASA II DE Penicillium funiculosum EN ISOMALTODEXTRINAS LINEALES.

G glucosa ; Gr extremo reductor ; — enlace glucosídico --
 α -(1 \rightarrow 6) ; \Downarrow hidroliza muy rápido ; \Downarrow hidroliza rápido ;
 --- hidroliza lentamente.

Fuente : Sugiura et. al. (1973).

CAPITULO 2

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

CAPITULO 2

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Para la realización del presente trabajo se elaboró el diagrama general de trabajo (figura 13), por medio del cual se estableció la metodología a seguir:

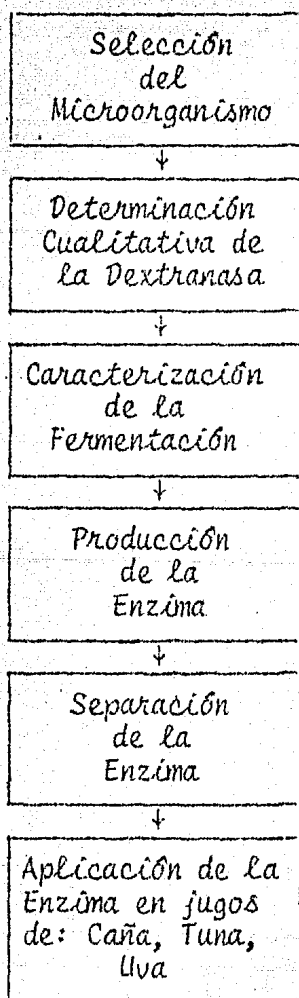


FIGURA 13 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.

2.1 SELECCION DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANASA

La selección del microorganismo productor de dextranasa se hizo en base a la literatura consultada (1,7,18,23,32,38) y en la cual se reporta la producción de dextranasa por una serie de hongos y bacterias. (2,12,18,19,21,32,34)

Para la selección del microorganismo se tomaron en cuenta varios parámetros, como son:

- a).- Tipo de microorganismo (hongos y bacterias).
- b).- Tipo de enzima (intra o extracelular).
- c).- Tipo de acción hidrolítica (exo o endo).

De acuerdo a lo anterior se determinó que el microorganismo con el cual se realizaría el estudio debería de cumplir con lo siguiente: Ser de origen fúngico, extracelular y tener tipo de acción endohidrolítico.

Bajo los criterios anteriores se seleccionó el microorganismo productor de la dextranasa y se procedió a obtener una cepa de éste por lo que se recurrió a la American Type Culture Collection (1) (ATCC) donde se obtuvo la cepa con la cual se realizó el trabajo.

La cepa se mantuvo en un tubo de ensaye, con un medio de cultivo semejante al utilizado por Moyer y Coghill (9), cuya composición se muestra en la tabla 5.

TABLA 5 MEDIO DE CULTIVO DE MOYER Y COGHILL

Agua destilada	1000	g.
Agar	20	g.
Dextrano	10	g.
Glicerol	8	g.
Peptona	5	g.
NaCl	4	g.
KH_2PO_4	0.06	g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	g.
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01	g.
KNa tartrato	0.005	g.
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005	g.
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.004	g.

2.2 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

Para determinar cualitativamente la producción de la dextranasa-extracelular se procedió a realizar una prueba sencilla y rápida.

La determinación de la producción de enzima se hizo de acuerdo al método desarrollado por Menciaer (21) y el cual se basa en la utilización del dextrano azul 2000.

La técnica utilizada para ésta determinación fué igual a la seguida por Menciaer como a continuación se señala:

Se toma una muestra del microorganismo contenido en un tubo de ensaye con medio de cultivo inclinado de Moller Coghill y es sembrado en un medio de cultivo con la composición que se muestra en la tabla 6.

TABLA 6 MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO POR MENCIAER

Dextrano azul 2000	0.5%
Dextrano (P.M. 80,000)	0.5%
Extracto de Levadura	0.5%
K ₂ HPO ₄	0.1%
Gelosa	1.5%
Agua destilada	100 ml

El medio de cultivo es esterilizado a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Posteriormente se distribuye en cajas petri en donde se inocula el microorganismo a probar, se incuba a 25°C-28°C durante 4 días.

El fundamento de este método es que el microorganismo al desarrollarse sobre el medio de cultivo, provoca si es capaz de degradar dextranos, una hidrólisis de la molécula del dextrano azul, y en conse--

cuencia una liberación del complejo colorante, lo cual se manifiesta alrededor de la colonia en donde el medio se aclara y en esta zona se observa una aureola azul oscuro debido a la acumulación del colorante liberado.

2.3 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

La fermentación para la producción de la enzima dextranasa fue caracterizada, para obtener la información correspondiente al tiempo en el cual el microorganismo produce la mayor actividad enzimática.

La caracterización se llevó a cabo en dos formas: en matraz y en fermentador discontinuo.

En ambos procesos se tomó como base para las condiciones óptimas de fermentación lo reportado por Kosaric et al (19) para la producción de dextranasa de Penicillium funiculosum. Las condiciones se presentan en la tabla 7.

Tabla 7 CONDICIONES DE FERMENTACION

	MATRAZ	FERMENTADOR
Volúmen del recipiente (ml)	250	1000
Volúmen del medio de cultivo (ml)	100	800
Agitador	Vibrador	Agitador
	Rotatorio	Magnético
Agitación (rpm)	200	200
Temperatura (°C)	25°-28°	25°-28°
Flujo de aire (vvm)	-----	0.5

El medio de cultivo utilizado fue igual al usado por Kosaric el cual está compuesto de acuerdo a los datos presentados en la tabla 8.

TABLA 8 MEDIO DE CULTIVO

Extracto de levadura	10 g.
*Dextranos de alto peso molecular	20 g.
Ca Cl ₂ • 2 H ₂ O	0.4 g.
Hg Cl ₂ • 6 H ₂ O	0.2 g.
Solución reguladora de fosfatos (0.1M; pH=5.8)	1000 ml.

*Dextranos obtenidos por la acción de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512-F, en un medio de cultivo conteniendo sacarosa, semejante al utilizado por López (20).

2.3.1 FERMENTACION EN MATRAZ

La fermentación se realizó en 12 matraces erlemeyer de 250 ml. - colocando en cada uno de éstos 100 ml. del medio de cultivo (tabla 8) y esterilizándolo a 121°C durante 15 minutos, una vez estéril y frío el medio de cultivo se inoculó con 1 ml. de una solución de esporas de -- Penicillium funiculosum, " con un mínimo de 2 semanas de esporulación" (19), ésta solución contenía en promedio 54.4×10^5 esporas/ml. de solución.

Posteriormente el lote de matraces se coloca en una incubadora -- con agitación a temperatura constante (25°- 28°C).

De este lote de matraces se tomó una muestra (1 matraz= 1 muestra) cada 24 horas, posteriormente se procede a separar los micelios del medio de cultivo, para esto se utilizó una membrana millipore de 0.45 µ- de diámetro de poro, observándose que el tiempo de filtración era muy largo por lo que se optó por centrifugar el medio de cultivo y posteriormente filtrar en papel whatman #41. Una vez filtrado el medio de cultivo se procedió a su análisis.

2.3.2 FERMENTACION EN FERMENTADOR DISCONTINUO

Para realizar la fermentación discontinua se utilizó un minifermentador modelo M-1000 Fermentation Design, Inc. (figura 14) de 1000-ml de capacidad donde se colocaron 800 ml de medio de cultivo (tabla-8) posteriormente se esterilizó el medio de cultivo a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril y frío el medio de cultivo se inyectaron 8 ml de una solución de esporas (54.4×10^5 esporas/ml) de Penicillium funiculosum la fermentación se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones establecidas y tomándose 25 ml de muestra cada 12 horas y separando los micelios del medio de cultivo para realizar el análisis correspondiente de éste.

2.3.3 ANALISIS DE LA FERMENTACION

El medio de cultivo separado de los micelios fue analizado realizando las siguientes determinaciones: biomasa, pH, azúcares totales, azúcares reductores y actividad enzimática.

Las técnicas utilizadas para los análisis fueron las siguientes:

2.3.3.1 BIOMASA:

La muestra es separada de los micelios por medio de una centrifuga DYNAC a una velocidad de 2300 rpm posteriormente el sobrenadante se filtra en papel whatman #41 el cual ha sido previamente pesado, después de ser centrifugado y filtrado un volumen conocido, el residuo que queda en el tubo de la centrifuga y en el papel filtro son secados en una estufa de aire caliente marca PARTLOW Mod. 550-P a 60°C, cuidando que el papel no se queme una vez que alcanza un peso constante se anota este peso y por diferencia con el peso inicial se obtiene el peso de la biomasa.

2.3.3.2 pH:

El pH se determinó directamente en el líquido filtrado por me--

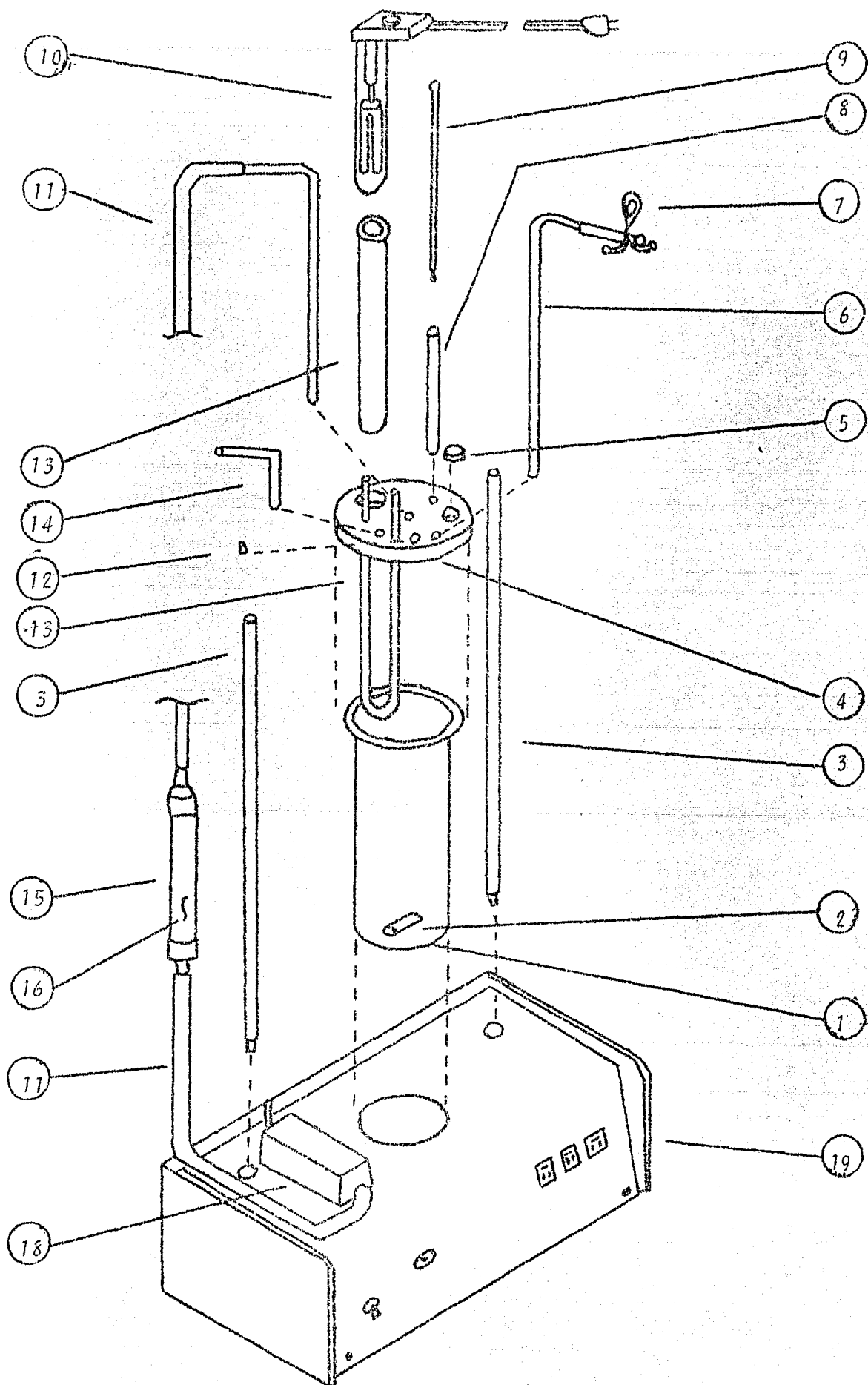


FIGURA 14 MINIFERMENTADOR (Fermentation Design, Inc.)

FIGURA 14

- 1.- Vaso
- 2.- Barra magnética
- 3.- Varilla
- 4.- Tapa
- 5.- Porta jeringa
- 6.- Toma de muestra
- 7.- Pinzas
- 8.- Tubo del termómetro
- 9.- Termómetro
- 10.- Calentador
- 11.- Tubo para el aire
- 12.- Tapón disponible
- 13.- Tubo de protección del calentador
- 14.- Tubo de agotado
- 15.- Filtro de aire
- 16.- Empaque del filtro
- 17.- Intercambiador de calor
- 18.- Bomba de aire
- 19.- Base del fermentador

dio de un potenciómetro Corning Mod. 7.

2.3.3.3 AZUCARES TOTALES

La determinación de azúcares totales se realizó por medio del método colorimétrico de la antrona (24) utilizando un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 1800.

La técnica utilizada fué la siguiente:

A un mililitro de la solución problema se le adicionan 2 ml de solución de antrona se calienta inmediatamente a baño maría el cual se encuentra a ebullición por un tiempo de 10 minutos medidos con cronómetro, posteriormente se pasa a un baño de hielo y se deja reposar durante 15 minutos y se mide la densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro.

La cantidad de azúcares totales es estimada interpolando la lectura de densidad óptica en una curva estándar.

Solución de antrona:

400 mg. de antrona + 200 ml de H_2SO_4 conc.

2.3.3.4 AZUCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores se determinaron por medio del método colorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (31), utilizando un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 1800.

La técnica utilizada fué la siguiente:

A 1 ml de la solución problema se le adiciona 1 ml de la solución de ácido 3,5 dinitrosalicílico y se calienta a baño maría el cual se encuentra a ebullición, durante 5 minutos medidos con cronómetro, posteriormente se pasa a un baño de hielo y se agregan 10 ml de agua, se retira del baño de hielo y se esperan 30 minutos para medir-

la densidad óptica a 540 nm.

La cantidad de azúcares reductores es estimada interpolando la lectura de densidad óptica en una curva estándar.

Solución de ácido 3, 5 dinitrosalicílico:

Se disuelven 16 g de hidróxido de sodio en agua destilada en un matraz aforado de 1 lt una vez disuelta se agregan lentamente 300 g de tartrato doble de sodio y potasio (sal de Rochelle) y finalmente se agregan 10 g de ácido 3, 5 dinitrosalicílico, aforar y guardar en una botella ámbar cubierta con papel aluminio.

2.3.3.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA:

La actividad de la dextranasa fué estimada midiendo la liberación de azúcares reductores de dextranos de Leuconostoc mesenteroides.

Los azúcares reductores fueron determinados colorimétricamente por el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico (31) así la actividad enzimática fué determinada por la siguiente técnica:

A 2 ml de una solución de dextranos (2.5% de dextranos de Leuconostoc mesenteroides en solución reguladora de acetatos 0.1 M pH= 5.3) se le adicionan 4 ml de solución de enzima y son incubados a 40°C durante 30 minutos, tomando muestras de 1 ml a diferentes tiempos, a esta muestra se le determinó la cantidad de azúcares reductores liberados. (En caso de ser necesario la muestra se diluye con solución reguladora de acetatos para que dé una densidad óptica de 0.2-0.8).

De ésta forma se pudo determinar las unidades de dextranasa (D.U.) la cual es similar a la descrita por Tsuchiya et al (34).

La unidad de dextranasa (D.U.) es definida como la cantidad de enzima que produce 1 mg equivalente de isomaltosa monohidratada en 1-hora a 40°C.

2.4 PRODUCCION DE LA DEXTRANASA

Una vez realizada la caracterización de la fermentación de la producción de la dextranasa se procedió a la producción de la enzima en un volumen mayor (5 lt) para lo cual se utilizó un fermentador New Brunswick Mod.

El medio de cultivo utilizado fue igual al que se utilizó en la caracterización (tabla 8), el inóculo en éste caso se realizó con micelios y esporas de un cultivo de propagación el cual se preparó de la siguiente manera:

En un matraz de 1 lt conteniendo 250 ml de medio de cultivo estéril se inocularon 5 ml de solución de esporas de Penicillium funiculosum, posteriormente el matraz fue colocado en una incubadora con agitación durante 4 días (agitación= 200 rpm; temperatura= 26°-28°C) de ésta forma se obtuvo el cultivo de micelios para la inoculación.

Una vez que se obtuvo el cultivo de propagación, se inoculó el recipiente del fermentador y se inició así la fermentación bajo las condiciones descritas en la tabla 9.

TABLA 9 CONDICIONES DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

Volúmen del recipiente (l)	8
Volúmen del medio de cultivo (l)	5
Agitador	2 helices
Agitación (rpm)	400
Temperatura (°C)	26
Flujo de aire (vvm)	0.5
pH inicial	5.8

Bajo éstas condiciones se realizó la fermentación durante la cual se realizaron los análisis de biomasa, pH y actividad enzimática tomándose una muestra de 25 ml cada 12 horas.

2.5 SEPARACION DE LA DEXTRANASA

Una vez que se detectó la mayor cantidad de actividad enzimática el proceso de fermentación se detuvo, procediéndose inmediatamente a la separación del líquido que contiene la enzima extracelular de los micelios del hongo y ajustando el pH a 5.4.

El proceso de la separación de la enzima implica varios procedimientos como son:

a).-Centrifugación en refrigeración:

El medio de cultivo fermentado que contiene la dextranasa extracelular fue centrifugado durante 30 minutos a 4°C y 5000 rpm en una centrífuga con refrigeración.

b).-Filtración:

El líquido separado por centrifugación no resulta ser completamente cristalino por lo que se efectúa una filtración bajo refrigeración en un filtro millipore.

c).-Precipitación de la enzima:

Al líquido cristalino que se obtiene de la filtración y que contiene la enzima extracelular, le fue adicionado sulfato de amonio - $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 70% de saturación con el objeto de precipitar la enzima, obteniendo de esta manera un precipitado blanco.

d).-Filtración al vacío:

El precipitado blanco resultante es separado del líquido, por medio de una filtración al vacío con papel filtro Whatman del #41, el sólido obtenido de esta forma es entonces disuelto en 100 ml. de una solución reguladora de acetatos (0.1 M; pH= 5.4) conservando así a la enzima en solución para su posterior aplicación. Adicionalmente se determinó la actividad enzimática de esta solución.

2.6 APLICACION DE LA DEXTRANASA

La enzima dextranasa será probada en 3 jugos diferentes de frutas: jugo de uva, jugo de tuna y jugo de caña de azúcar

2.6.1 CARACTERIZACION DE LOS JUGOS DE FRUTAS

Para poder determinar la efectividad de la enzima se tiene que conocer las características iniciales de estos jugos por lo que se procedió a caracterizarlos, determinando su viscosidad, °Brix, azúcares totales y azúcares reductores.

2.6.1.1 VISCOSIDAD

La viscosidad de cada uno de los jugos se midió en un viscosímetro Ostwald a 40°C, así como la del agua a igual temperatura para tener una referencia.

2.6.1.2 °BRIX

Los °Brix de cada uno de los jugos se midió en un refractómetro marca Zeiss Opton a 20°C.

2.6.1.3 AZUCARES TOTALES

Se determinó de acuerdo al método de la antrona (24)

2.6.1.4 AZUCARES REDUCTORES

Se determinaron de acuerdo al método del ácido 3.5 dinitro salicílico (21).

Una vez caracterizados los jugos se procedió a realizar la hidrólisis enzimática la cual se realizó de la siguiente manera:

Se toma 1 muestra de jugo y se coloca en un baño maría para que alcance una temperatura de 40°C \pm 1°C; la cantidad de enzima que se --

va a adicionar se calcula con los datos de la caracterización del jugo y las D.U. de enzimas disponibles.

Una vez que el jugo alcanza la temperatura, se le adiciona la enzima y ésta mezcla se mantiene en baño maría, tomando de aquí las muestras para las determinaciones (viscosidad y azúcares reductores) a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 40 y 45 minutos) para de ésta forma seguir la hidrólisis.

A manera de comparación se utilizó una dextranasa comercial de Penicillium funiculosum (sigma chemical company) la cual contenía 55 D.U./mg de sólido con la cual se realizaron las mismas pruebas de reducción de viscosidad y aumento de azúcares reductores en las muestras de jugos de frutas de acuerdo con las condiciones preestablecidas para la dextranasa obtenida experimentalmente.

CAPITULO 3

RESULTADOS

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 SELECCION DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANASA

Para la selección del microorganismo se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- a).- Tipo de microorganismo (hongos)
- b).- Tipo de enzima (extracelular)
- c).- Tipo de acción (endohidrolítico)

De acuerdo con lo citado en la literatura se pudo observar lo siguiente: Son los hongos los que presentan un mayor número de especies para elegir; producen una mayor cantidad de enzima extracelular lo que facilita la separación de la enzima del medio de cultivo y presenta un tipo de acción endohidrolítico el cual favorece la disminución de la viscosidad de las soluciones que contienen dextranos.

Así de acuerdo con lo anterior, se escogió al hongo Penicillium funiculosum el cual por sus características y por ser el hongo que presenta un mayor número de reportes (7, 18, 19, 21, 23, 34) resulta ser el más adecuado, aunque no el único para la realización de éste estudio como lo muestra la tabla 10.

De ésta forma se solicitó una cepa a la American Type Culture Collection en donde se obtuvo la cepa de Penicillium funiculosum - ATCC #11797 (1) cepa con la cual se realizó el trabajo.

3.2 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

La determinación cualitativa para la producción de dextranasa se realizó según la técnica utilizada por Menciaer (21) con los resultados mostrados en la tabla 11.

TABLA 8 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE DEXTRANASA

MICROORGANISMOS	INTRA-EXTRA CELULAR	ENDO---EXO HIDROLITICO	Ref
<u>Cellvibrio fulva</u>	+	+	(11)
FA-1A	+	+	(25)
<u>Lactobacillus bifidus</u>	+	+	(2)
<u>Cytophaga Johnsonii</u>	+	+	(13)
<u>Brevibacterium fuscum</u>	+	+	(28)
<u>Bacillus subtilis</u>	+	+	(40)
<u>Bacillus megatherium</u>	+	+	(40)
<u>Penicillium lilacinum</u>	+	+++	(34)
<u>Penicillium funiculosum</u>	+	+++	(34)
<u>Penicillium verruculosum</u>	+	+++	(34)
<u>Verticillium coccorum</u>	+	+++	(9)
<u>Spicaria SF</u>	++	+	(34)
<u>Penicillium aculeatum</u>	++	+	(19)
<u>Fusarium moniliforme</u>	+	+	(27)
<u>Penicillium funiculosum serie (verde)</u>	++	+	(19)
<u>Penicillium piceum</u>	++	+	(19)
<u>Penicillium purpurogenum</u>	++	+	(19)
<u>Penicillium rubrum</u>	++	+	(19)
<u>Penicillium variable</u>	++	+	(19)

TABLA 11 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

HORAS INCUBACION	APARICION DE HALO	AUMENTO DEL* HALO (mm)
0	-	-
12	-	-
24	+	2
36	+	5
48	+	10
60	+	13
72	+	18
84	+	22
96	+	28

*Aumento promedio de 5 muestras

Como se puede observar en la tabla 11 al cabo de 48 a 72 horas de incubación, se presenta un halo perfectamente visible donde se puede observar una porción blanca y enseguida una porción de color azul intenso, éstas diferentes coloraciones son como resultado de la hidrólisis del dextrano azul 2000, por lo que se puede afirmar que el microorganismo utilizado (Penicillium funiculosum) produce la enzima extracelular dextranasa.

3.3 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

Los resultados obtenidos en la caracterización de la fermentación (matraz y minifermentador) de acuerdo con los análisis establecidos en la metodología, se resumen en las tablas 12 y 13 y en las figuras 15 y 16.

TABLA 12 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION DE Penicillium funiculosum (MATRACES)*

MUESTRA	HORAS DE INCUBACION	BIOMASA g/l	pH	UNIDADES DE DEXT/ml
1	24	1.9	5.8	0.8
2	48	4.3	5.85	1.5
3	72	5.5	5.9	2.5
4	96	6.2	6.0	4.4
5	120	7.1	6.0	6.8
6	144	6.5	6.2	8.5
7	168	6.1	6.3	9.6
8	192	5.3	6.4	10.3
9	216	4.9	6.5	9.8
10	240	4.1	6.6	9.3
11	264	4.7	6.8	8.7
12	288	4.5	6.8	8.5

*Promedio de 3 muestras

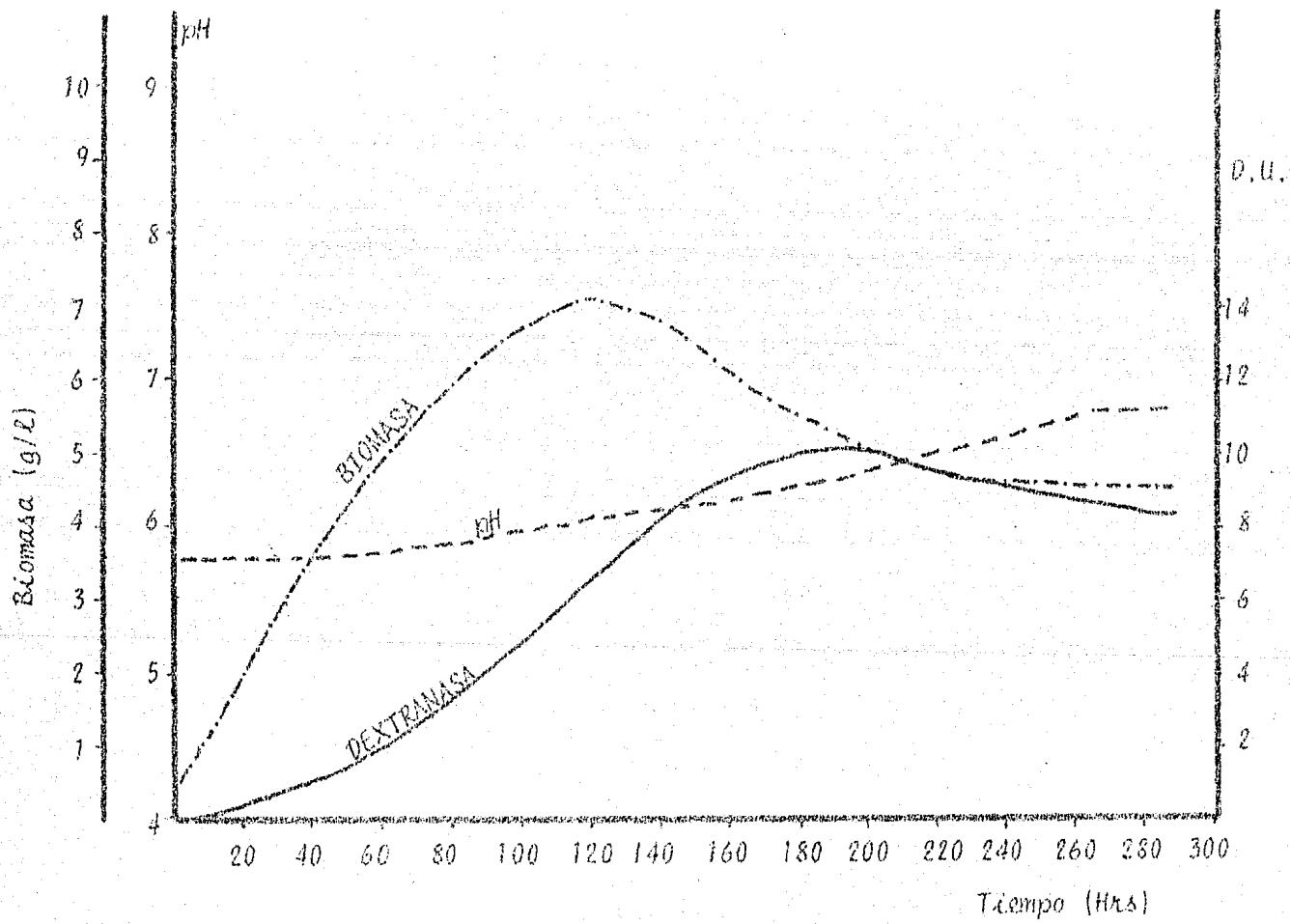


FIGURA 15 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION DE *Penicillium furiculosum* (matraces)

TABLA 13 CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION DE Penicillium funiculo
sum (MINIFERMENTADOR)*1

MUESTRA	HORAS DE INCUBACION	BIOMASA g/l	pH	UNIDADES DE DEX/ml
1	12	1.4	5.85	0.45
2	24	2.3	5.85	0.6
3	36	3.8	5.9	0.9
4	48	5.2	5.9	1.2
5	60	6.5	5.95	1.65
6	72	7.6	6.00	2.1
7	84	8.3	6.05	2.85
8	96	8.2	6.1	3.9
9	108	7.9	6.2	5.1
10	120	7.6	6.25	7.5
11	132	7.5	6.3	9.9
12	144	7.2	6.3	11.55
13	156	7.0	6.45	13.2
14	168	6.7	6.5	14.4
15	180	6.4	6.6	14.85
16	192	6.3	6.7	14.85
17	204	6.0	6.7	14.55
18	216	5.8	6.8	14.4
19	228	5.5	6.85	14.25
20	240	5.3	6.9	14.1

*Promedio de 3 fermentaciones

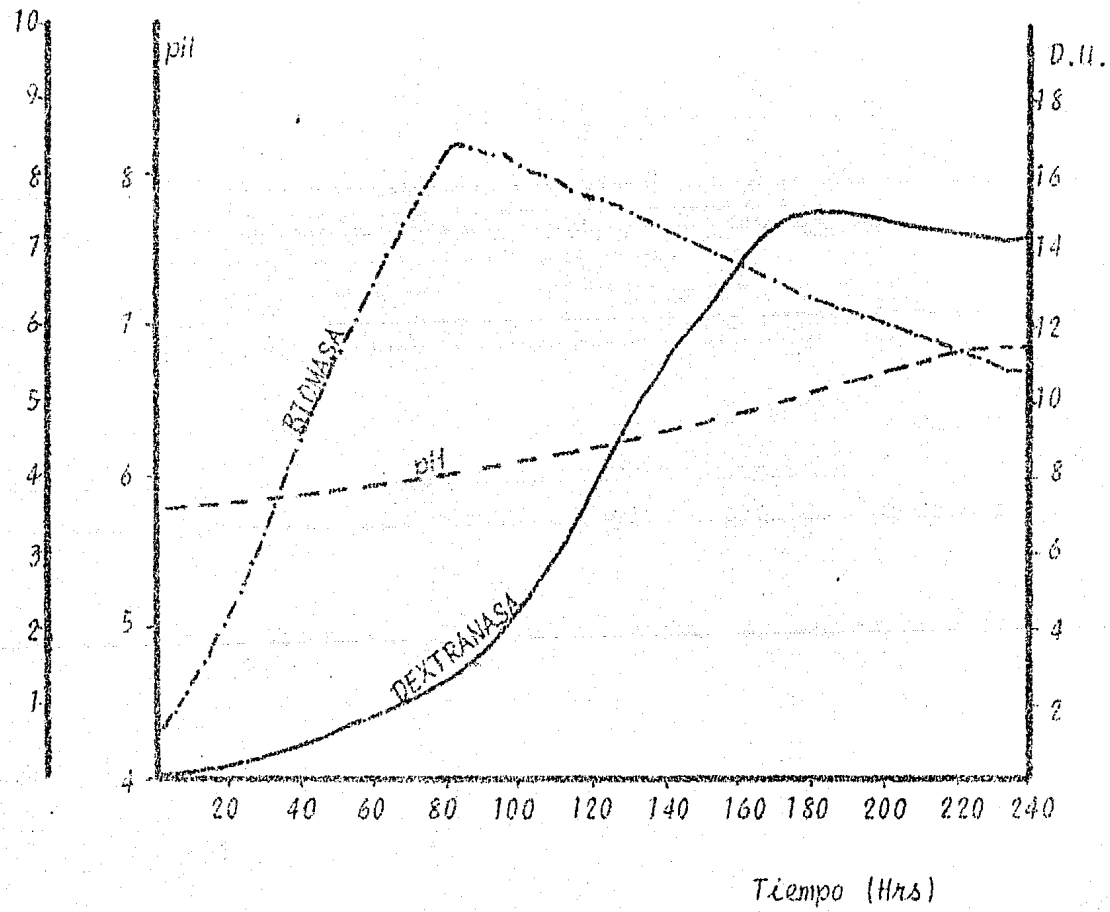


FIGURA 16. CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION DE Penicillium funiculosum (minifermentador)

3.3.1 FERMENTACION EN MATRACES

En la fermentación de matraces se puede observar que el punto en el cual la biomasa es mayor ocurre a las 120 horas de incubación, lo cual hace que la fermentación se considere larga. En cuanto al pH se observa que éste va aumentando paulatinamente conforme avanza la fermentación. La actividad enzimática (D.U.) se observa que inicialmente aumenta poco a poco sin embargo, al llegar al punto en donde la biomasa decrece se nota un incremento mayor en el número D.U. y de que a pesar de disminuir la biomasa las D.U. siguen aumentando hasta llegar a un máximo después del cual comienza a disminuir la actividad.

3.3.2 FERMENTACION EN MINIFERMENTADOR DISCONTINUO

Durante la caracterización en el minifermentador se pudo llegar a varias conclusiones, pues al observar los datos obtenidos se nota que la biomasa tiene su punto máximo a las 84 horas con lo que se tiene una disminución de alrededor de 40 horas, esto se cree es debido a un mejor control de la fermentación en cuanto a la agitación y el aire suministrado para la fermentación aunque el tiempo se sigue considerando largo. El pH se observó nuevamente que aumenta paulatinamente conforme avanza la fermentación. La actividad enzimática comparada con la primera caracterización sufre un aumento, esto también se cree es debido al mejor control de la fermentación aunque se repite un fenómeno y es que después de llegar al máximo de producción de biomasa se observa que el incremento en la actividad continúa y no disminuye hasta llegar al máximo alrededor de las 192 horas de fermentación, lo cual concuerda con la primera caracterización. La disminución en la actividad se atribuye al aumento del pH en el medio de fermentación, lo cual hace que la actividad enzimática disminuya.

Con las observaciones realizadas durante las caracterizaciones se pudo llevar a cabo la fermentación en un volumen mayor (5 lt) pa-

na producir la enzima necesaria para llevar a cabo los ensayos de aplicación de ésta en jugos de frutas.

3.4 PRODUCCION DE LA DEXTRANASA

El curso de la fermentación para la producción de dextranasa fue seguido como en la caracterización y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14 y en la figura 17.

Con los datos obtenidos durante la fermentación y comparándolos con los de las caracterizaciones se puede decir lo siguiente:

La fermentación para la producción de dextranasa se puede considerar como larga.

El pH no sufre cambios bruscos durante el desarrollo de la fermentación sino que paulatinamente va aumentando, afectando la actividad enzimática por lo que se tiene que separar el medio de cultivo de la biomasa y ajustar el pH para no sufrir modificaciones en la actividad enzimática.

Las unidades de dextranasa se observó que aumentaban poco a poco hasta el momento en que la biomasa disminuía, pues posteriormente la actividad enzimática se veía incrementada hasta llegar a un máximo, el cual se presenta alrededor de la hora 180 de fermentación y de que posteriormente se veía afectada por el pH del medio de cultivo.

Así también se presentan los datos de unidades de dextranasa obtenidas, una vez separada la enzima del medio de cultivo como lo muestra la tabla 15.

Donde se observa una concentración de las unidades de dextranasa después de ser separada, precipitada y redisuelta la enzima. Donde se obtiene una pérdida de actividad por causa del manejo de la enzima durante éstos procesos. Pero considerandose que el número de actividades obtenidas son suficientes para realizar los ensayos.

TABLA 14 FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA POR Penicillium funiculosum

MUESTRA	HORAS DE INCUBACION	BIOMASA g/l	pH	UNIDADES DE DEXT/ml.
1	12	2.2	5.8	0.4
2	18	3.0	5.85	0.7
3	24	4.6	5.85	1.0
4	36	7.0	5.9	2.3
5	44	8.1	5.9	2.6
6	72	10.2	5.95	6.9
7	84	9.8	5.95	8.0
8	104	9.3	6.0	9.8
9	130	8.4	6.1	15.2
10	156	7.6	6.2	20.2
11	182	7.0	6.4	21.8
12	204	6.7	6.65	21.6

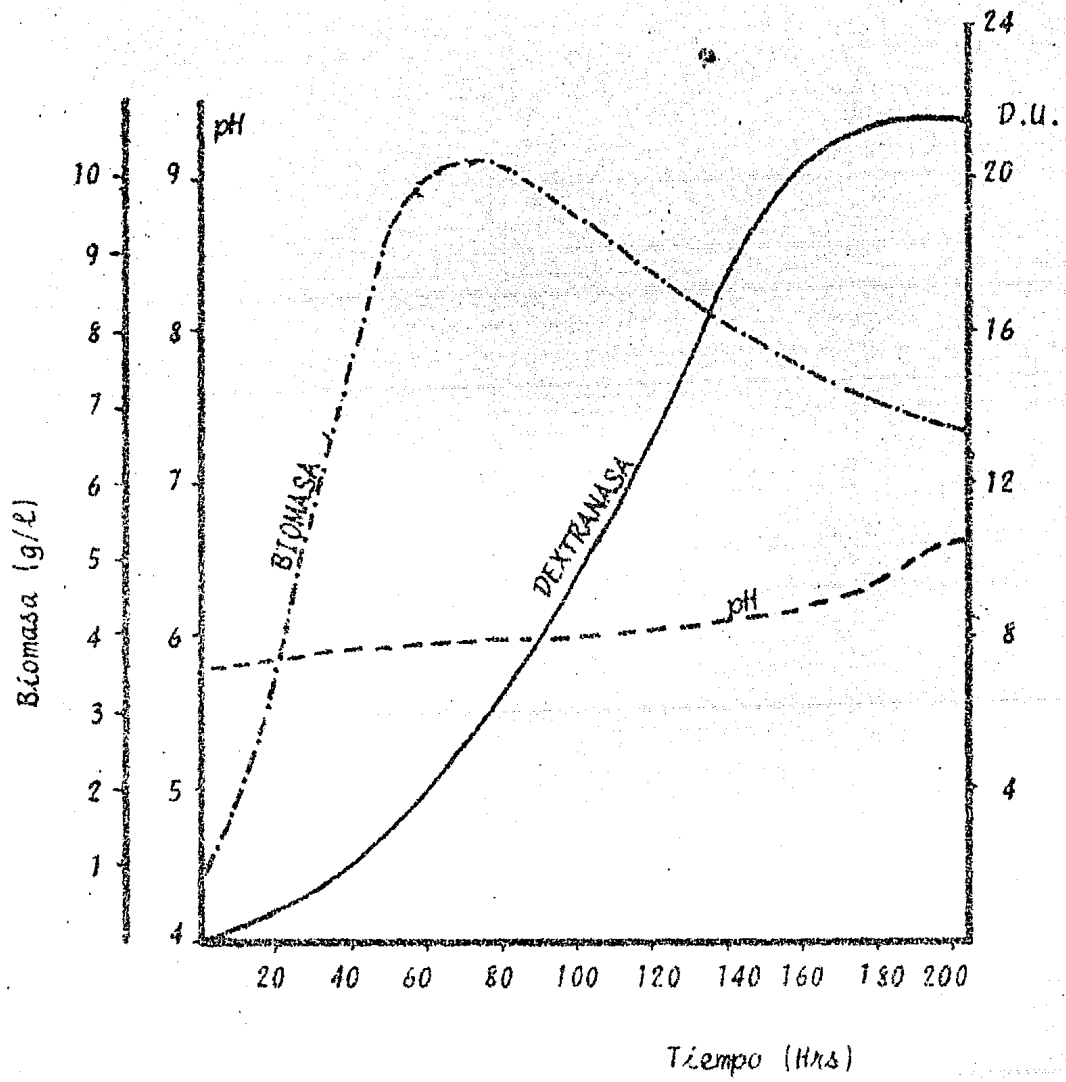


FIGURA 17 FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA POR Penicillium funiculosum

TABLA 15 RENDIMIENTOS DE LA FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANASA

	VOLUMEN ml	ACTIVIDAD U/ml	ACTIVIDAD TOTAL D.U.	RENDIMIENTO %
Sobrenadante de la fermentación	2200	21.6	47520	100%
Enzima redisuelta	100	364.76	36476	75.07%

5.5 CARACTERIZACION DE LOS JUGOS DE FRUTAS

Los resultados obtenidos de la caracterización de los jugos de caña de azúcar, tuna y uva por las técnicas establecidas previamente son presentados en la tabla 16.

TABLA 16 CARACTERIZACION DE LOS JUGOS DE FRUTAS

	VISCOSIDAD*	SOLIDOS SOLUBLES °Bx	AZUCARES REDUCTORES g/100 ml	AZUCARES TOTALES g/100 ml
LIVA	3	18	3.67	18.15
TUNA	5	14	1.5	14.23
CAÑA DE AZUCAR	8	25	0.771	25.75

*Viscosidad relativa con respecto al agua

Las características iniciales de los jugos son importantes para poder establecer la cantidad de enzima a utilizar, esto es con la cantidad de azúcares totales menos los azúcares reductores y ésta cantidad se supone que toda es polímero aunque en realidad no lo es, pero con esto se asegura el adicionar la enzima necesaria.

La viscosidad medida es diferente en cada uno de los jugos, puesto que cada uno de ellos tiene una composición diferente y por esto es también la variación en los °Brix y en los azúcares totales y reductores.

3.6 APLICACION DE LA DEXTRANASA EN JUGOS DE FRUTAS

En base a los datos obtenidos en la caracterización en los jugos de frutas se calculó la cantidad de enzima necesaria para realizar las pruebas de efectividad de la enzima, lo cual se determinará con los cambios en la viscosidad y azúcares reductores de los jugos.

Así se utilizaron las siguientes unidades de dextranasa (D.U.) para cada caso:

	D.U./ml
Jugo de caña de azúcar	255
Jugo de tuna	182
Jugo de uva	146

Los resultados obtenidos en cuanto al seguimiento de la hidrólisis enzimática son mostrados en las tablas 17 y 18 y en las figuras 18 y 19.

De los datos obtenidos en los cambios de viscosidad con la enzima experimental se observa que en el jugo de caña hay una disminución mayor que en los jugos de tuna y uva. Comparando los resultados con la enzima control se observa una disminución en igual sentido, es decir mayor en jugo de caña, tuna y uva sucesivamente aunque en este caso la disminución de la viscosidad fue más notoria.

De los datos de azúcares reductores con la enzima experimental se observa un aumento de éstos en los 3 casos, siendo mayor en el caso de jugo de caña que en el de tuna y en el de uva donde las variaciones son mínimas. En la enzima control se observa un aumento más notorio de los azúcares reductores en cada uno de los jugos.

Estos cambios pueden ser debido a que cada uno de los jugos tiene una composición diferente, aunque el aumento de los azúcares reductores y la disminución en la viscosidad del jugo de caña fue más significativa que en los casos de la tuna y uva, pues estos cambios aunque presentes fueron menores.

TABLA 17 CAMBIO EN LA VISCOSIDAD DURANTE LA APLICACION DE LA DEXTRANASA EN JUGOS DE FRUTAS

ENZIMA EXPERIMENTAL	VISCOSIDAD*					
	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	45 min
JUGO DE CANA	8	5.9	4.7	4.1	3.7	3.6
JUGO DE TUNA	5	4.65	4.5	4.4	4.4	4.4
JUGO DE UVA	3	2.9	2.8	2.75	2.75	2.75

ENZIMA CONTROL	VISCOSIDAD*					
	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	45 min
JUGO DE CANA	8	5.4	4.3	3.54	3.0	2.8
JUGO DE TUNA	5	4.6	4.35	4.1	3.9	3.8
JUGO DE UVA	3	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5

*Viscosidad relativa con respecto al agua

TABLA 18 CAMBIO EN LOS AZUCARES REDUCTORES DURANTE LA APLICACION DE LA DEXTRANASA EN JUGOS DE FRUTAS

ENZIMA EXPERIMENTAL	AZUCARES REDUCTORES g/100. ml					
	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	45 min
JUGO DE CANA	0.771	3.165	4.875	5.459	5.63	5.801
JUGO DE TUNA	1.5	2.526	2.866	3.039	3.124	3.209
JUGO DE UVA	3.67	4.183	4.525	4.699	4.783	4.868

ENZIMA CONTROL	AZUCARES REDUCTORES g/100 ml					
	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	45 min
JUGO DE CANA	0.771	3.849	5.901	6.585	6.927	7.098
JUGO DE TUNA	1.5	3.210	3.894	4.236	4.407	4.578
JUGO DE UVA	3.67	4.696	5.039	5.209	5.380	5.465

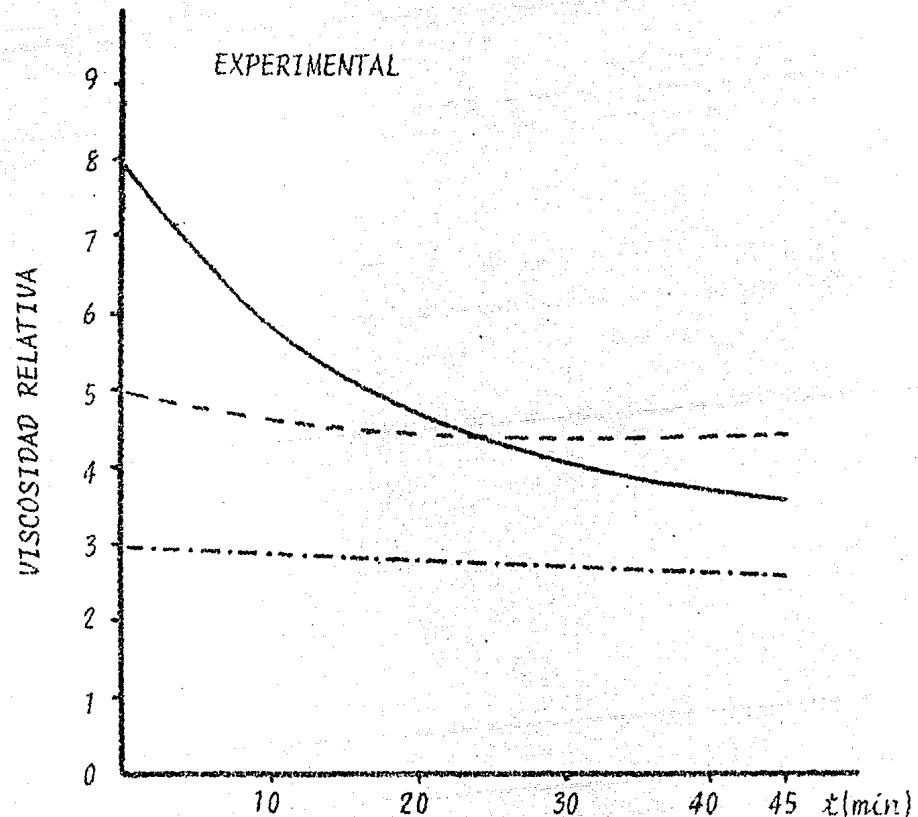
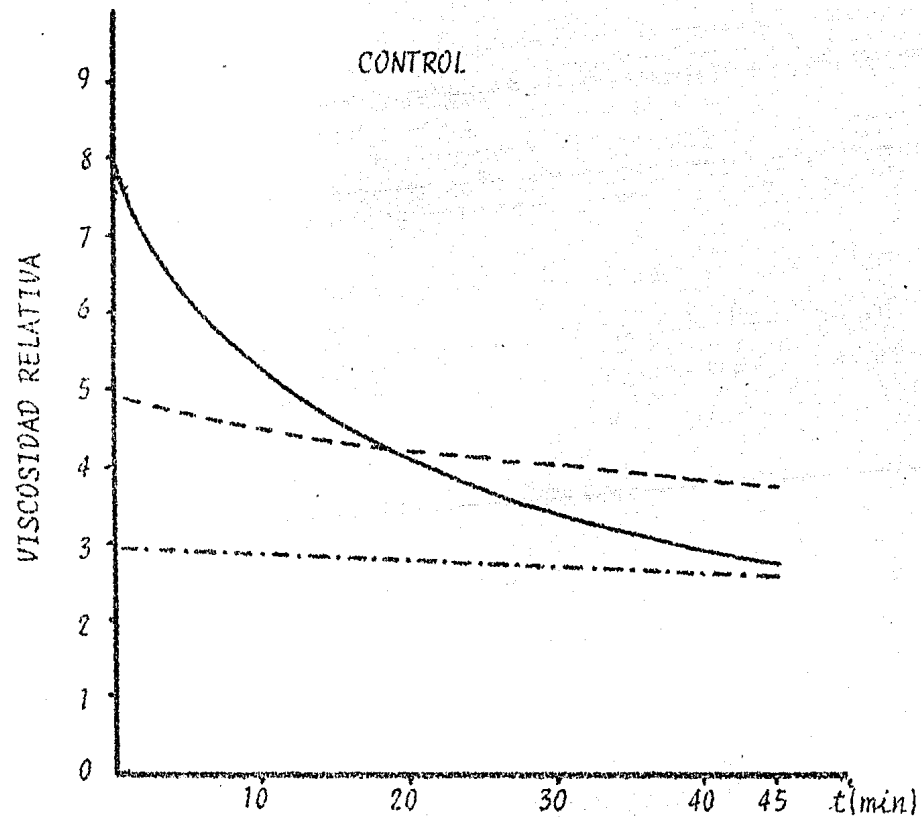


FIGURA 18 CAMBIO EN LA VISCOSIDAD DURANTE LA APLICACION DE LA DEXTRANASA EN JUGOS DE FRUTAS

- JUGO DE CANA
- - - JUGO DE TUNA
- . - . JUGO DE UVA

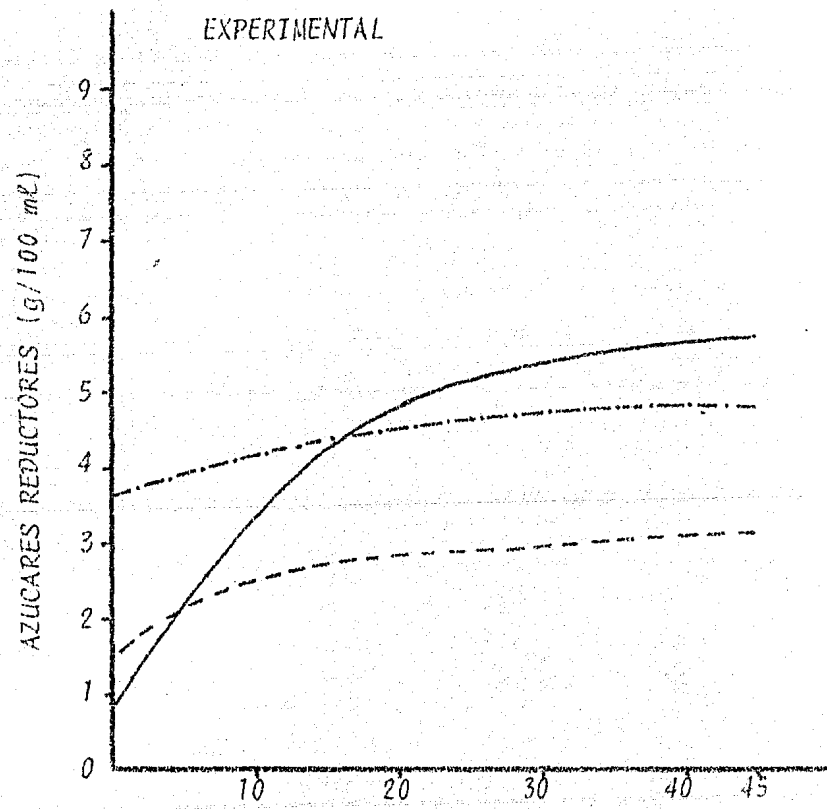
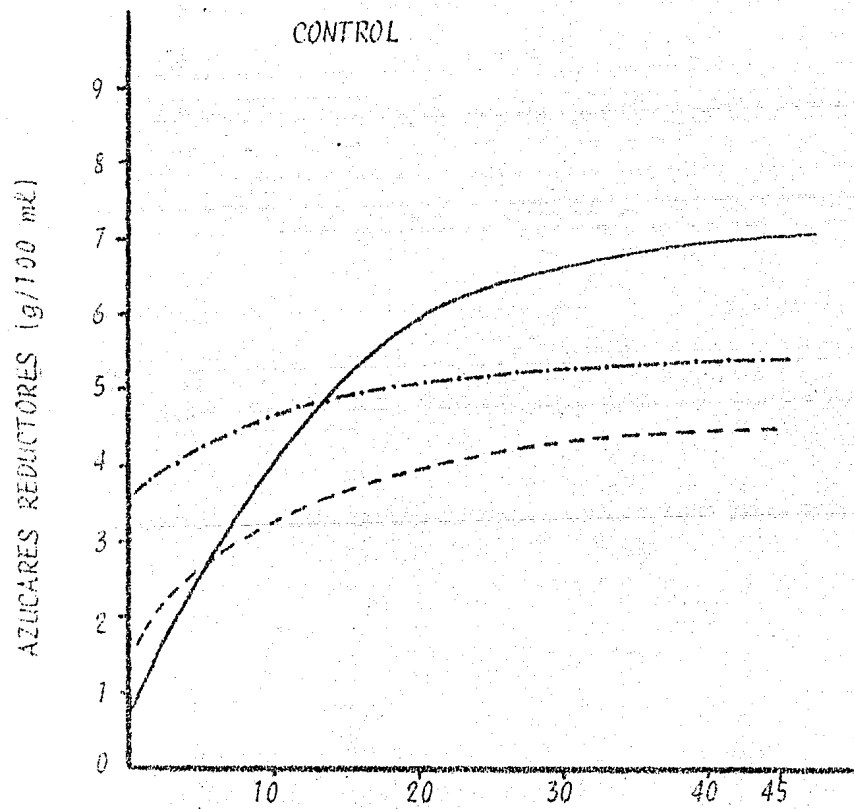


FIGURA 19 CAMBIO EN LOS AZUCARES REDUCTORES DURANTE LA APLICACION DE LA DEXTRANASA EN JUGOS DE FRITAS

- JUGO DE CANA
- - - JUGO DE TUNA
- · · JUGO DE UVA

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

1.-Existe un gran número de microorganismos los cuales pueden producir dextranasa entre los hongos y algunas bacterias por lo que para decidir que microorganismo se seleccionaría se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- a) Tipo de microorganismo.-Hongos
- b) Tipo de enzimas.-Extracelular
- c) Tipo de acción.-Endohidrolítico

De acuerdo con esto y en base a la revisión bibliográfica se decidió utilizar el Penicillium funiculosum para la realización del presente estudio por las siguientes razones:

Dentro de los hongos se encontró que es la especie con la cual se ha realizado un mayor número de trabajos para la producción de dextranasa y por lo tanto es el microorganismo del cual se cuenta con una mayor cantidad de información en cuanto a condiciones para la producción de la enzima.

El Penicillium funiculosum produce en mayor cantidad enzima extracelular que intracelular, característica que permite separar la enzima con mayor facilidad del medio de cultivo.

El tipo de acción hidrolítica que presenta la dextranasa producida por este hongo es del tipo endohidrolítico, lo cual permite reducir la viscosidad, al romper la cadena en las porciones internas.

El Penicillium funiculosum resultó ser el microorganismo más adecuado, aunque no el único que presenta las características solicitadas.

2.-Se mostró que la técnica descrita por Menciaer (21) para poner en evidencia la producción de dextranasa es rápida, pues después de 36 horas se puede detectar la producción de la enzima, además de ser muy sencilla aunque no es cuantitativa.

- 3.-Se encontró que el tiempo en el cual se presenta la mayor actividad de la dextranasa es de aproximadamente 200 horas lo cual comparado con el tiempo de ensayo para producir otro tipo de enzimas se puede considerar largo y lo cual no sería benéfico pues si se piensa en los costos, estos se elevarían por el tiempo que se usa el fermentador así como el costo de la mano de obra para el cuidado del mismo.
- 4.-De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto al número de unidades de dextranasa producidas, se encontró que éste va a depender de la cepa particular de microorganismo utilizado para tal fin como se muestra en el siguiente cuadro:

MICROORGANISMO		D.U/ml
<i>Penicillium funiculosum</i>	QM 286	50
" "	QM 391	540
" "	QM 7563	700
" "	QM 7565	90
" "	SH-5	1740
<i>Penicillium aculeatum</i>	QM 3074	2070
" "	QM 7308	75
<i>Penicillium verruculosum</i>	QM 3698	50
<i>Penicillium purpurogenum</i>	QM 6760	180
<i>Penicillium rubrum</i>	QM 124a-2	20

Fuente: Kosaric. et. al, 1973

- 5.-En cuanto a la factibilidad de utilizarla en jugos de frutas se encontró que no se obtenían resultados favorables, esto es debido a que la viscosidad puede elevarse por la presencia de algunos polímeros diferentes de los dextranos como son el caso de pectinas, almidones etc., por lo que en ese caso la enzima no resulta ser la adecuada para la reducción de la viscosidad y sería necesario realizar un examen preliminar para determinar el tipo de polímero que causa-

la alteración de la viscosidad y así poder determinar el tipo de enzima desporalizante más adecuada para la hidrólisis del polímero presente; pues en el caso de tener la seguridad de la presencia del dextrano se demostró que ésta sí reduce la viscosidad como en el caso del jugo de caña de azúcar.

Pero hay que tomar en cuenta también que esta enzima sufre la desventaja de su termoestabilidad y de su dificultad en hidrolizar dextranos altamente ramificados y de que su actividad baja un 20% debido al pH de las soluciones de los jugos de frutas.

En cuanto a la comparación de los resultados de la aplicación de la enzima obtenida con la enzima control se nota una diferencia debido al grado de purificación de esta última, pues la primera se utilizó en forma casi cruda y de ahí la diferencia en los resultados.

6.-Se recomienda un estudio posterior en el cual se analice la posibilidad de la aplicación de los dextranos, ya sea como parte de la formulación de algunos productos o bien sustituyendo parcialmente algún componente de la formulación, para la elaboración de ciertos productos como: panes, bebidas, jarabes de azúcar no cristalizables, en alimentos bajos en calorías y dulces o bien como un revestimiento preservativo de algunos productos alimenticios.

B I B L I O G R A F I A

1. American Type Culture Collection - (1980). - Catalogue of strains - Rockville, Maryland.
2. Bailey R. W., Clarke R. T. J., (1959). - A bacterial dextranase. - *Biochem, J.* 72, 49-54.
3. Bixler G. H., Hines G. E., McGhee R. M. and Shurter R. A., (1953) "Dextran". *Ind. Eng. Chem.*, 45, 692-705.
4. Bourne E. J., Hutson D. H., Weigel H., (1962). - STUDIES ON DEX--TRANS AND DEXTRANASES. 2. The action of mould dextranase on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis. *Biochem. J.* 85, 158-163.
5. Bourne E. J., Hutson D. H., Weigel H., (1963). - STUDIES ON DEX--TRANS AND DEXTRANASES. 3. Structures of oligosaccharides from Leuconostoc mesenteroides (Birmingham) Dextran. *Biochem J.* 86, - 555-562.
6. Evans T. H., Hibbert H., (1946), *Adv. Carbohydr Chem. Cap. III - Bacterial Polysaccharides (Dextrans)* 2, 209-220.
7. Fischer E.H., Stein E. A., (1960). - "THE ENZYMES", Vol. 4, Part - 4, Dextranase (a review) ed by P. D. Boyer, H. Lardy K. Myrback, - Academic press Inc. New York, N. Y. Pags. 304-307.
8. Glicksman M., (1969). - *Gum Technology in the Food industry. Food-Science and Technology, (a serie of monographs). Capitulo 10: Mi*crobial Gums. Pags: 334-341.
9. Hultin E., Nordström L., (1949). - INVESTIGATIONS ON DEXTRANASE. - I. On the occurrence and the assay of dextranase. *Acta Chem. - Scand*, 3, 1405-1417.
10. Hutson D. H., Weigel H., (1963). - STUDIES ON DEXTRANS AND DEX---

TRANASES 4. Mechanism of the actions of intra- and extra-cellular mould hydrolases. *Biochem. J.* 88, 588-591.

11. Ingelman B., (1948) Enzymatic breakdown of Dextran.- *Acta chem Scand.* 2, 803-812.
12. Janson J-C., Porath J., (1966).- A bacterial dextranase. *Methods Enzymol.* 8:615-621.
13. Janson J-C., (1975).- Studies on dextran-degrading enzymes. *Isolation and identification of a dextranase-producing strain of Citophaga johnsonii and studies on the formation of the surface bound enzyme.* *J. Gen. Microbiol.* 88, 205-208.
14. Jeanes A., Wilham C. A., Miers J. C., (1948).- Preparation and characterization of dextran from Leuconostoc mesenteroides. *J. Biol. Chem* 176, 603-615.
15. Jeanes A., Wilham C. A., Jones R. W., Tsuchiya H. M., Rist C. E. (1953).- Isomaltose and isomaltotriose from enzymic hydrolyzates of dextran. *J. Am Chem. Soc.*, 75, 5911-5915.
16. Jeanes A., Hynes W. C., Wilham C. A., Rankin J. L., Melvin E. H. Austin M. J., Cluskey J. E., Fisher B. E., Tsuchiya H. M., Rist C. E., (1954).- Characterization and classification of dextrans from ninety-six Strains of Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5041-5052.
17. Jeanes A., Haynes W. C., Wilham C. A., (1956).- Characterization of Dextrans from four types of Leuconostoc mesenteroides. *J. Bacteriol*, 71, 167-173.
18. Jeanes A., (1978).- Dextran Bibliography. Science and education administration. U.S. Department of agriculture. Miscellaneous-Pub. N° 1355. Washington D.C.
19. Kosaric N., Yu K., Zajic J. E., Rozanis J., (1973).- Dextranase-production from Penicillium funiculosum. *Bioeng.* 15, 729-741.

20. López M. C. A., (1979).- Production purification et immobilization de la dextrane - saccharase de Leuconostoc mesenteroides. - These a l'institute des sciences appliquées de Toulouse France.
21. Mencier F., (1972).- Méthode simple et rapide de mise en évidence des microorganismes producteurs de dextranase Ann. Inst. Pasteur. Paris 122, 153-157.
22. Neely W. B., (1960).- "DEXTRAN": STRUCTURE AND SYNTHESIS. Adv. Carbohydr. Chem. 15, 341-369.
23. Prescott S. C., (1962).- Microbiologia Industrial: Capitulo XX - Dextranos Pags: 391-415.
24. Scott T. A., Melvin E. H., (1953).- Determination of dextran - with anthrone. Anal che., 25, 1656-1661.
25. Sery T. W., Hehre E. J., (1956).- Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria. J. Bacteriol 71, 373-379.
26. Sidebotham R. L., (1974).- "DEXTRANS". Adv. Carbohydr Chem., 30,- 371-444.
27. Simonson LL. G., Liberta A, E., Richardson A., (1975).- Characterization of an extracellular dextranase from Fusarium moniliforme Appl. microbiol 30(5) pags: 855-861
28. Sugiura M., Ito A., Ogiso T., Kato K., Asano H., (1973).- STUDIES ON DEXTRANASE. Purification of dextranase from Penicillium funiculosum. And its enzymatic properties. Biochim. Biophys. Acta. 309, 357-362.
29. Sugiura M., Ito A., Yamaguchi I., (1974).- Studies on dextranase II. New Exo-dextranase from Brevibacterium fuscum Var. Dextranlyticum. Biochim. Biophys. Acta 350, 61-70.
30. Sugiura M., Ito A., (1974). Studies on dextranase, III. Action-patterns of dextranase from Penicillium funiculosum. On substra

te and inhibition on hidrolisis reaction by substrate analogues. Chem. Pharm. Bull. 22(7), 1593-1599.

- 31. Sumner J. B. and Howell S. F., (1935).- A Method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem., 108, Pags. 51-54.
- 32. Swanson M. A., (1948).- Studies on the structure of polysaccharides. II degradation of polysaccharides by enzymes. J. Biol. Chem. 172, 805-814.
- 33. The merk index (1976).- An encyclopedia of chemicals and drugs.- 9a. Edición. Merk Co. Inc. U.S.A.
- 34. Tsuchiya H. M., Jeanes A., Bricker H. M., Wilham C. A., (1952).- Dextran-Degrading enzymes from molds. J. Bacteriol. 64, 513-519.
- 35. Van Cleve J. W., Schaefer W. C., Rist C. E., (1956).- The structure of NRRL B-512 Dextran. Methylation Studies. J. Amer. Chem. Soc., 78, 4435-4439.
- 36. Watson P. R. and Wolff I. A., (1955).- Depolimerization of a dextran with sonic vibrations on ultraviolet light. Jour Am. Chem. Soc. 77, 196.
- 37. Wolff I. A., Watson P. R., Sloan J. W. and Rist C.E., (1953). - Controlled thermal depolymerization of dextran. Ind. Eng. Chem. 45, (4), 755-759.
- 38. Whiteside-Carlson V. and Carlson W. W., (1952).- Enzymatic Hydrolysis of dextran. Science 115, 43.
- 39. Yamaguchi T., Gocho S., (1973).- Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated brevibacterium. Agr. Biol. Chem. 37(11), 2527-2533.
- 40. Zevenhuizen L. P. T. M., (1968).- Cell-Bound exodextranasa of bacillus species. Carbohydr. Res. 6, 310-318.

Esta publicación se imprimió
en la Subdirección de Inves-
tigación y Docencia. Costó
de 100 ejemplares.

Comisión Nacional de Fruticultura-S.A.R.H.
Subdirección de Investigación y Docencia
División de Investigación y Desarrollo --
Experimental.
Palo Alto, México, D.F. C.P. 11000
Apartado Postal 41 - 740 C.P. 05110
Teléfonos: 570-24-99 Ext. 167-168-169
570-17-79 Directo
570-16-79 Directo