

2ej
38



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

**" DEXTRANASAS Y SU APLICACION EN LA
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS"**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo**

**P R E S E N T A:
MARIBEL FOSADO MARQUEZ**

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.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.	1
Capítulo I GENERALIDADES.	8
I.1 Dextranas.	8
I.2 Dextranasas.	13
I.2.1 Definición.	13
I.2.2 Mecanismo de acción	13
I.2.3 Medición de actividd	17
I.2.4 Producción.	22
I.2.4.1 Cinética de la fermentación.	34
I.2.4.2 Recuperación de enzimas.	40
I.2.4.3 Recuperación de dextranasa	42
I.2.4.4 Purificación de la enzima.	52
I.2.4.5 Purificación de dextranasa	52
I.2.5 Propiedades de las dextranasas	61
I.2.5.1 Cinética	61
I.2.5.2 pH y temperatura	69
I.2.5.3 Composición de aminoácidos	70
I.2.5.4 Fracción de carbohidratos.	70
I.2.5.5 Peso Molecular	72
I.2.5.6 Punto Isoeléctrico	73
I.2.6 Inmovilización de enzimas.	73
Capítulo II APLICACIONES.	81
II.1 Dextranasas	81
II.2 Otras enzimas que pueden actuar sobre los mismos sustratos que las dextranasas	87
II.3 Características de productos comerciales	89
Capítulo III CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFIA.	95

INTRODUCCION

La tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología.

A raíz de los problemas de naturaleza tóxica que experimentaron los trabajadores de plantas productoras de enzimas proteolíticas destinadas a los biodetergentes, la capacidad instalada de fermentación empezó a dirigirse la producción de enzimas con marcados potenciales, fundamentalmente en la industria de alimentos. La producción de enzimas microbianas vino a impulsar esta industria, a partir de la segunda mitad del siglo XX, cuando tan sólo se disponía de preparaciones de origen vegetal, animal y algunas excepciones de productos microbianos sobre todo producidos vía fermentación sólida²¹. Cuando el problema de los detergentes quedó resuelto, al evitar la aparición de polvos durante el secado mediante aglomerantes, en los años sesentas, el mercado justificaba la producción industrial de unas 30 enzimas. La venta de productos enzimáticos para la industria representa hoy en día un mercado de entre 400 y 600 millones de dólares.²⁹ Sin embargo, sólo unas 6 enzimas cubren el 90% del mercado y el potencial que representan las aproximadamente 2,000 enzimas descubiertas es un verdadero reto para el biotecnólogo.

La ingeniería genética abre, por otro lado, nuevos horizontes a la producción y aplicación de enzimas. Un ejemplo de estas posibilidades lo constituye el hecho de que el gen que codifica para la α -amilasa termoestable de *Bacillus stearothermophilus* ha sido clonado y se expresa en *Bacillus subtilis*, siendo quizá esta enzima, la primera que será producida a nivel industrial como producto de la ingeniería genética.³

Sin embargo, las enzimas tienen aplicación en otras áreas como por ejemplo, en la industria farmacéutica (como catalizadores en síntesis de algunos productos, uso de algunas enzimas como medicamentos, etc.); en el área de análisis clínicos (glucosa-oxidasa para determinación del contenido de glucosa en sangre, etc.)

El tecnólogo de alimentos enfoca las enzimas desde diferentes puntos de vista; desde luego que uno de los aspectos fundamentales lo constituyen los procesos en los que se produce un cambio mediante la adición de una enzima (ej. la producción de queso, la clarificación de jugos de frutas, etc.), o más aún los casos en los que las materias primas se producen mediante reacciones enzimáticas: resolución de mezclas racémicas, producción de fructuosa, producción de triptofano, etc. Pero también el tecnólogo de alimentos enfrenta la presencia de enzimas en prácticamente todos los materiales que maneja, de tal forma que deberá en ciertos casos crear las condiciones adecuadas para que actúen enzimas endógenas responsables de cambios benéficos en los alimentos (Cuadro 1).

CUADRO 1

Ejemplos de cambios benéficos en el procesamiento de alimentos, propiciados por la acción de enzimas endógenas.

Acción de catepsinas en el ablandamiento natural de la carne.

Degradación de almidón durante el malteado de granos por acción de amilasas.

Producción de aroma en el procesamiento del té por acción de catecol-oxidasa.

Acción de enzimas pécticas en la maduración de frutas.

En otras circunstancias, los cambios que ocasionan la acción de las enzimas operan en detrimento de la calidad, ya sea por pérdidas del valor nutritivo del alimento, por cambios indeseables de color o por cambio de textura. (Cuadro 2)

CUADRO 2

Ejemplos de cambios perjudiciales en los alimentos propiciados por la acción de enzimas endógenas.

Disminución en el valor nutritivo: oxidación de la tiamina (tiaminasa), la vitamina C (ácido ascórbico oxidasa) y el piridoxal fosfato (fosfatasa).

Xantina oxidasa: responsable de la generación de sabores indeseables, ej. leche.

Peroxidasa: deterioro en el sabor, la textura, el color y el valor nutritivo en ciertos vegetales.

Liposigenasa: oxidación de ácidos grasos indispensables.

El tecnólogo podrá también beneficiarse de la termolabilidad de las enzimas; en ocasiones, la estabilidad térmica de una enzima es tal, que su desestabilización o inactivación coinciden con un tratamiento térmico necesario en el procesamiento de alimentos, y así podrá establecerse un método de control de calidad indirecto. Esta situación puede ejemplificarse con la pasteurización de la leche, donde el tratamiento térmico además de destruir los microorganismos nocivos, desactiva la enzima fosfatasa alcalina (entre otras) por lo que puede determinar indirectamente si este proceso fue llevado a cabo en forma adecuada, midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina. (Cuadro 3).

 CUADRO 3

Ejemplos de enzimas cuya actividad ha sido propuesta como método de control de calidad en el procesamiento de alimentos.

Fosfatasa alcalina: pasteurización de leche.

Fosfatasa: pasteurización de jugo de naranja y jamón enlatado.

Peroxidasa: escaldado de chícharos.

N, acetil- α -D-glucoaminidasa: eliminación de *Salmonella* en pasteurización de huevo.

Actividad diastásica (α -amilasa): en relación con sobrecalentamiento de mieles.

Igualmente se ha propuesto a las enzimas como indicadores biológicos del estado fisiológico de diferentes vegetales.¹³ Tal es el caso de la peroxidasa, relacionada con daño celular, trauma e infección, la leucina aminopeptidasa en la madurez del cacahuate las esterasas como indicadores de contaminación fungal, etc.

En el aspecto analítico, las enzimas permiten determinar cuantitativamente sustancias orgánicas. Hoy en día existen reactivos enzimáticos para determinar cerca de 30 sustancias. (Cuadro 4).

 CUADRO 4

Algunas de las sustancias que pueden ser cuantificadas mediante el uso de enzimas.

Acido ascórbico

Acido cítrico

Acido láctico

Lactosa

Glucosa y fructuosa

Lecitina

Acido Succínico
Almidón
Colesterol

Rafinosa
Maltosa
Sorbitol

En ciertos casos, las enzimas pueden inclusive incorporarse en forma inmovilizada a electrodos para el monitoreo continuo y otras pueden ser absorbidas en tiras de papel, para un análisis cualitativo o menos preciso.²²

La tecnología de alimentos debe velar porque las enzimas del sistema digestivo humano y animal puedan actuar en forma óptima sobre los alimentos, por lo que la detección y destrucción de inhibidores enzimáticos es otra área de estudio. Muchos cereales poseen inhibidores de amilasas como un medio natural de protección contra los depredadores, impidiendo la degradación del almidón y por ende el desarrollo de infecciones al cultivo. Igualmente, existen inhibidores de proteasas como el inhibidor de la tripsina (enzima proteolítica del sistema digestivo) en la soya. Estos últimos, generalmente de naturaleza proteínica son destruidos durante el tratamiento térmico.⁶⁴

En múltiples casos, uno es mero espectador de procesos enzimáticos que se suceden día con día en el procesamiento de los alimentos, ya sea en la industria, o en la cocina; así el aroma que generan algunos alimentos es consecuencia de la acción directa de una enzima sobre un precursor.⁴⁹ Al cortar una cebolla o un ajo dañando el tejido, las enzimas llamadas "alinasas" actúan sobre las "alinas" (derivados de la cisteína), generando el aroma y las características lacrimógenas de todos conocidas en estos alimentos. El mismo fenómeno sucede en los rábanos, la mostaza y la pimienta, donde enzimas tioglucosidasas, actúan sobre precursores (tioglucósidos) generando el aroma. De hecho, bajo esta hipótesis se han diseñado experimentos en los

que un alimento procesado (secado o concentrado), al ser rehidratado para su consumo, se le adicionan extractos del alimento fresco.

Los microorganismos son la fuente más común de las enzimas comerciales, aunque también hay enzimas que provienen de tejidos vegetales y animales que se extraen con diferentes solventes. Las enzimas microbianas presentan más ventajas ya que los microorganismos pueden crecer rápidamente a diferentes condiciones, de manera que es posible la producción de muchas enzimas a grandes cantidades.⁵

Una enzima microbiana producida principalmente por hongos (*P. funiculosum*, *P. lilacinum*, etc.) y algunas bacterias (*B. fuscum*, *L. bifidus*, etc.) es la dextranasa (α -D-(1,6) glucan-hidrolasa, EC 3.2.1.11), que es la principal enzima que lleva a cabo la hidrólisis de la dextrana.

Las dextranas son homopolisacáridos extracelulares compuestos de unidades α -D-glucopiranosas, ligadas con enlaces α (1-6) con diversos niveles de ramificación, sintetizadas por la dextran-sacarasa (de varias especies de *Leuconostoc*) a partir de sacarosa. Las dextranas tienen algunas aplicaciones en alimentos: como aditivo en helados, como estabilizador y viscosante en jarabes, etc.; por otro lado se utiliza también como vector en medicamentos, mejorador del flujo sanguíneo, etc.; pero también presenta problemas: en el Sector Salud, induce la caries dental y en la Industria de Alimentos, el principal problema es la presencia de dextranas en el jugo de caña de azúcar, aspecto que será analizado posteriormente.

Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo son: realizar una revisión del origen de las enzimas dextranasas, estudiar su forma de producción, purificación y mecanismo de acción como una alternativa para la solución

de los problemas de contaminación en la Industria de Alimentos, así como su aplicación en otros sectores de la Industria Farmacéutica.

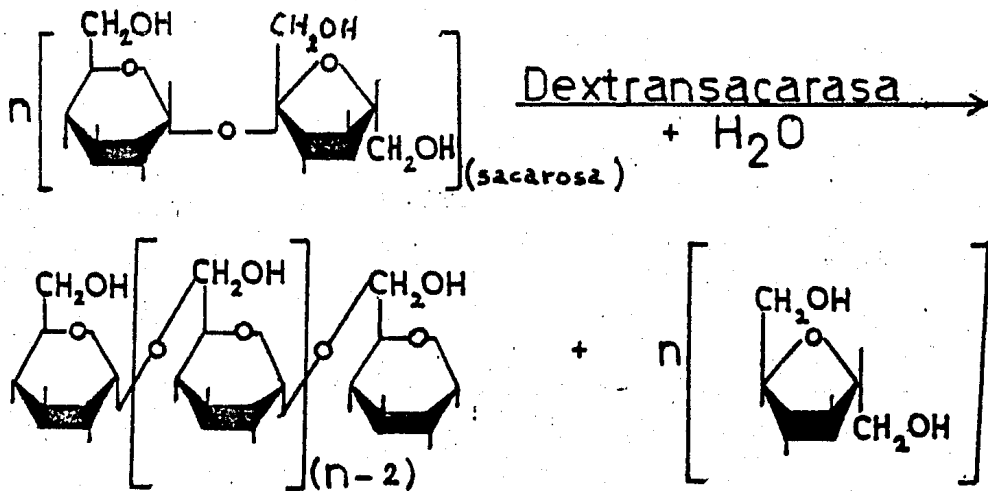
C A P I T U L O I

GENERALIDADES

I.1 Dextranas.

La dextranas son una gran clase de homopolisacáridos extracelulares compuestos exclusivamente de unidades α -D-glucopiranosas, ligados con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ principalmente y con diversos niveles de ramificación, en función de su origen. La dextrana se forma a partir de unidades de sacarosa, quedando constituida por unidades de glucosa y es formada si la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* u otro microorganismo productor crece en soluciones apropiadas de sacarosa.⁹¹

La síntesis de la dextrana es efectuada por la enzima dextransacarasa (α -1,6. glucan: D-fructuosa 2-glucosil-transferasa, EC 2.4.1.5) de origen microbiano (principalmente por varias especies de *Leuconostoc*), inducible por sacarosa, teniendo su actividad máxima a un pH de 5.2, de acuerdo con la siguiente reacción⁵²:



La cadena de dextrana presenta diversos grados de ramificación que dependen del origen de la dextran-sacarasa (Tabla 1). Así, una dextrana producida por *L. mesenteroides* es prácticamente lineal y por lo tanto, soluble en agua, mientras que, el alto grado de ramificación de la dextrana producida por *S. mutans* (84% de α 1 \rightarrow 3), la hacen prácticamente insoluble.⁴⁰

TABLA 1

Composición de dextranas producidas por diferentes microorganismos.⁴⁰

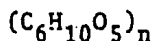
Microorganismo	% de residuos glucopiranosidos			
	Isomaltosa $\alpha(1\rightarrow6)$	maltosa $\alpha(1\rightarrow4)$	nigerosa $\alpha(1\rightarrow3)$	koji- biosa $\alpha(1\rightarrow2)$
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
NRRL-B-512	95	-	5	-
NRRL-B-742S	64	8	28	-
NRRL-B-1299L	49	-	19	32
<i>Streptococcus mutans</i>				
OMZ 176	16	-	84	-
Ingbritt A	37.5	-	62.5	-
<i>Streptococcus sanguis</i>				
804	52	-	48	-
Complejo Tibi	90	1.5	8.5	-

Como la dextran-sacarasa es una enzima extracelular, la dextrana es formada por extractos libres de bacterias de *Leuconostoc mesenteroides* para aplicaciones industriales. Las dextranas se obtienen igualmente vía la acción de dextran-sacarasa de otras bacterias de entre las cuales las más estudiadas son las de los géneros: *Streptococcus*, *Streptobacterium*, *Acetobacter*, *Betabacterium* y principalmente las del

género *Leuconostoc* en sus especies: *mesenteroides* y *dextranicum*, tribu *Streptococceae*, familia *Lactobacillaceae*.⁵²

La dextrana es una sustancia polimolecular. Su Peso Molecular generalmente es muy alto, el orden de magnitud pudiendo ser de varios millones.²⁴

La fórmula empírica de la dextrana es la siguiente:⁷³



Mediante diversas técnicas como la ultracentrifugación mediciones de viscosidad, etc., se ha demostrado que la molécula de dextrana tiene forma de hilo. La molécula se puede ver en un microscopio electrónico.³⁸

Las dextranas tienen un gran número de aplicaciones industriales; de entre las cuales destacan:

- Flocculantes en productos de papel.⁵²
- Procesos de chapado de metales.⁵²
- Suturas quirúrgicas.⁵²
- En alimentos.⁵²
 - . Estabilizador y espesante en jarabes.
 - . Concentrados de jugos cítricos.
 - . Procesamiento de frutas.
 - . Preservación de alimentos (película protectora)
 - . Como conservador (algunas veces en combinación con antibióticos).
 - . En la formulación de helados.
- Producción de fibras.⁵²
- Preparación de lociones.⁵²
- Soporte en medicamentos (Fe-dextrana).⁵²
- Mejorador del flujo sanguíneo.³⁰
- Sustituto o expansor del volumen del plasma sanguíneo.³⁰

La lista anterior permite apreciar que las dextranas tienen una amplia aplicación industrial, sin que ésta sea exhaustiva, ya que solo se mencionan las de mayor relevancia a título de ejemplo.

Sin embargo, existen ciertos casos en los que las dextranas se presentan como resultado de una contaminación bacteriana, constituyendo un serio problema principalmente para el sector azucarero y para el sector salud:

- En la Industria de alimentos, el principal problema es en el jugo de caña de azúcar, ya que al estar presentes las dextranas que se forman por la acción de la dextranasa carasa de *Leuconostoc mesenteroides* sobre la sacarosa del jugo, se provoca un aumento en la viscosidad y por consiguiente se dificultan todas las operaciones ulteriores.⁵⁹

- En el Sector Salud, las dextranas han sido identificadas como factores de inducción de la caries dental.⁶⁶ Al haber deficiencia en el aseo bucal, los residuos de sacarosa en los dientes propician un medio efectivo para inducción y posterior acción de la dextran-sacarasa de microorganismos de la microflora salival como: *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, etc. Dado el alto porcentaje de ramificación de estas dextranas, su solubilidad en agua es muy baja, quedando adheridas a la superficie de los dientes y constituyendo así, un excelente soporte para la retención de materia orgánica y de microorganismos. El ácido láctico producido, contribuye igualmente a la desmineralización de los dientes.^{63 66}

Alternativas para la eliminación de dextranas.- La manera más práctica de eliminar las dextranas, es realizando una hidrólisis de las mismas y para esto hay tres opciones:

- Hidrólisis ácida. En este método no se precisa de instalación compleja y se puede regular fácilmente, por lo

que el método es atractivo. Colin y Belval¹⁸ describieron la hidrólisis parcial de la dextrana con ácido y la precipitación del producto hidrolizado con alcohol. Sohns et al¹⁹ establecieron el tratamiento en instalación piloto del dextrano purificado por una precipitación previa a la hidrólisis, la cual la llevaron a cabo a pH 1 (H_2SO_4) y a 80°C. Sin embargo este método, por sus características no puede ser aplicado en los casos de contaminación antes mencionados.

- Hidrólisis enzimática. Se lleva a cabo por la enzima dextranasa. Alsop¹ experimentó con enzimas de los laboratorios Beckman y Calbiochem, demostrando que las de acción endógena producen una pequeña cantidad de oligosacáridos al inicio de la reacción originando una distribución similar a la obtenida en la hidrólisis ácida. En contraste, la dextranasa Sigma grado 1 usada por Basedow¹⁰ aunque descrita como endógena, produce oligosacáridos, maltosa e isomaltosa al principio de la reacción. Una selección de enzimas comercialmente apropiadas producen diferentes distribuciones de peso molecular sobre el mismo tipo de dextrana, esto se debe a que actúan sobre la molécula de dextrana y a su comportamiento cerca de ambas ligaduras, $\alpha(1\rightarrow6)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$ en el polímero. Económicamente estas enzimas ofrecen algunas ventajas sobre el proceso ácido, además de que pueden ser inmovilizadas y/o recuperadas y reusadas.

- Hidrólisis ultrasónica. Varios investigadores han estudiado esta hidrólisis. En particular, Basedow⁹ describió inicialmente la cinética de esta reacción. Este método provoca la ruptura de la molécula de dextrana preferentemente en un punto medio. A través de un análisis de GPC, mostró que una pequeña fracción de dextrana '40' (peso molecular 40 000) se produce después de sucesivas hidrólisis obteniéndose también distribuciones de pesos moleculares cercanos a 10 000 y 20 000. Este estudio se llevó a cabo a nivel laboratorio y no se ha reportado hasta la fecha nada

acerca del escalamiento a los niveles piloto e industrial.

- Finalmente, considerando que la eliminación de dextranas se plantea en casos donde fueron originados por problemas de higiene, el uso de sustancias que inhiban el crecimiento de bacterias con actividad dextran-sacarasa, ha sido igualmente propuesto. En particular, los ingenios azucareros emplean sales cuaternarias de amonio.³⁵

I.2 Dextranasas

I.2.1 Definición.

La dextranasa, (α -D-(1,6)-glucan-hidrolasa, EC 3.2.1.11) es la principal enzima que lleva a cabo la hidrólisis de la dextrana.

I.2.2 Mecanismo de acción.

Dependiendo del sitio donde rompan la cadena de dextrana o de polisacáridos similares, las dextranasas se dividen en dos tipos: endodextranasas, cuando rompen las partes internas de la cadena y exodextranasas, cuando rompen las partes externas de la cadena.³⁰

La enzima ataca principalmente los enlaces glucosídicos α +1,6 de la dextrana, dando como resultado oligosacáridos de varios tamaños (isomaltosa, isomaltotriosa, etc.) al principio de la reacción.⁷³ Estos oligosacáridos van a ser hidrolizados por la enzima al continuar la reacción, teniendo preferencia por los de cadena más larga, pues contienen mayor cantidad de enlaces glucosídicos α +1,6 como se puede apreciar en la Fig. 1, además, en la Tabla II, se muestran los productos de digestión de algunas dextranasas sobre diferentes sustratos. De la Fig. 1, se puede deducir que los puntos de ataque de la dextranasa sobre isomaltodextrinas, son primeramente al 2° y 3° enlaces glucosídicos,

a partir de las terminaciones no reducidas del sustrato y que al incrementar el grado de polimerización del mismo, el hidrolizado enzimático también ataca al 4° y 5° enlaces glucosídicos.⁷³

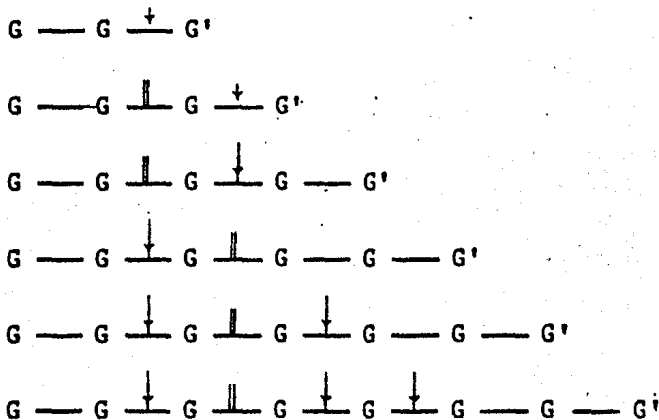


Fig. 1

Mecanismo de acción de la Dextranasa II de *P. funiculosum* sobre isomaltodextrinas.⁷³

G: glucosa

G': terminación reducida

—: enlace glucosídico α -1,6

||: hidrólisis muy rápida

↓: hidrólisis rápida

⋈: hidrólisis ligera cuando las terminaciones reducidas son sustituidas con un grupo alcohol.

TABLA II

productos de digestión resultante de la acción de algunas dextranasas sobre diferentes sustratos.

Fuente de dextranasa y sustrato utilizado	Productos de digestión
<i>P. funiculosum</i> ⁷³ sustrato: dextrana	Isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, isomaltopentaosa y otras isomaltodextrinas grandes.
<i>P. lilacinum</i> ⁸⁷ sustrato: dextrana.	Isomaltosa, isomaltotriosa y pequeñas cantidades de D-glucosa.
<i>Pseudomonas</i> sp. ⁶¹ sustrato: oligosacáridos de 3-10 unidades de glucosa.	Isomaltosa, isomaltotriosa y pequeñas cantidades de D-glucosa.
<i>Flavobacterium</i> sp. ⁷⁹ sustrato: dextrana	Isomaltotriosa e isomaltotetraosa.
<i>Flavobacterium</i> sp. ⁷⁹ sustrato: oligosacáridos	Isomaltosa, isomaltotriosa.
<i>Aspergillus carneus</i> . ⁸⁵ sustrato: dextrana	Isomaltosa, isomaltotriosa y pequeñas cantidades de D-glucosa y de isomaltopentaosa.
<i>Streptococcus mitis</i> . ⁹⁰ sustrato: dextrana	Pequeñas cantidades de glucosa e isomaltodextrinas grandes.

Un factor importante para la acción de la dextranasa es la estructura de la dextrana.⁷⁹ Si observamos la Tabla III, una dextranasa de *Flavobacterium* sp. hidroliza mejor y más rápido a las dextranas lineares que a las ramificadas. (Fig. 2).

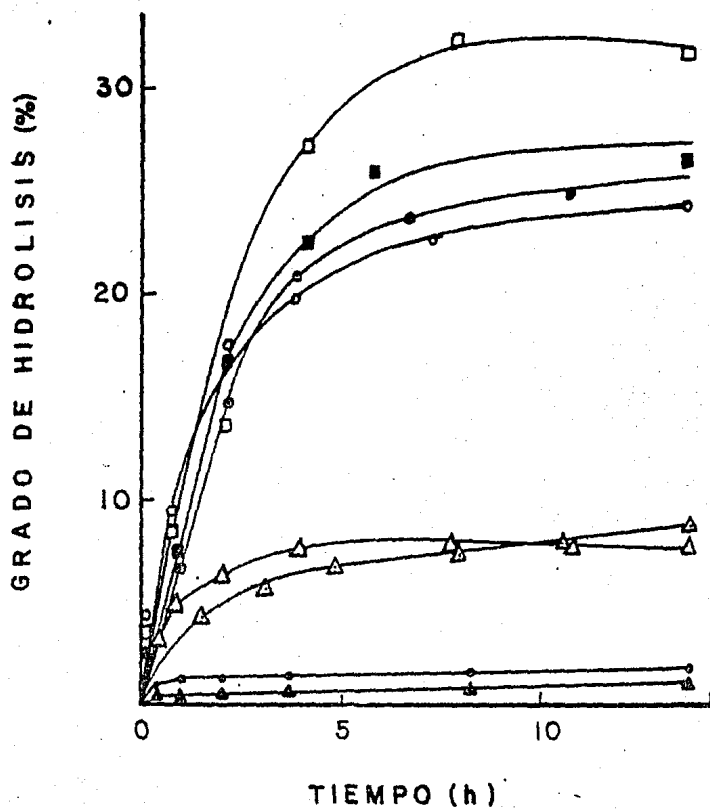


Fig. 2

Modo de acción de la dextranasa II de *Flavobacterium* sp. M-73 sobre varias dextrans⁷⁹. □ Dextransa B-512 ; ■ Dextransa T-110 ; ● Dextransa clínica ; ○ Dextransa T-10 ; △ Dextransa B-1307 ; ▲ Dextransa B-1416 ; ● Dextransa B-1298 ; ▲ Dextransa B-1299.

Wheatley y Moo-Young⁹⁰ mostraron que una exoenzima sola daba un grado de degradación menor comparado al de una endoenzima sola y que una combinación de las dos enzimas daba un resultado mayor que la suma algebraica de los efectos individuales de las enzimas. Esto se debe tener en cuenta cuando se quiera una mejor y más rápida eliminación de las dextranas.

I.2.3 Medición de actividad.

La actividad de la dextranasa puede ser medida siguiendo cualquiera de los cambios en algunas propiedades físicas de la dextrana adicionada (por ejemplo opalescencia o viscosidad) o la producción de azúcares reductores a partir de la dextrana.⁶

El primer método es usado cuando la dextranasa rompe la molécula de dextrana al azar. El segundo método es preferible cuando la enzima presenta un mecanismo exo, actuando sobre un extremo de la cadena de dextrana y produciendo unidades de glucosa o cadenas cortas de unidades oligosacáridas.³⁶

Para medir la opalescencia o turbidez de una solución, generalmente se utiliza un nefelómetro; para mediciones de viscosidad, se usa un viscosímetro (Ostwald) previo tratamiento a las soluciones problema³¹ y finalmente, para mediciones de azúcares reductores lo más usual es determinarlos por los métodos del Ac.3,5-Dinitrosalicílico (DNS)¹² o por una titulación indirecta.³⁶ Algunos autores utilizan el método de Schaffer y Somogyi⁶³ para el mismo objetivo. Dado que para obtener la actividad específica se requiere cuantificar la proteína, esto se realiza principalmente por el método de Lowry.⁵⁰

TABLA III

Correlación entre la estructura del sustrato dextrana y el grado de hidrólisis de la dextranasa II de *Flavobacterium* sp.⁷⁹

Dextrana	Enlace	Gh(%)
Dextrana clínica	α -(1+6), (1+3)	25.7
Dextrana T-10	α -(1+6), (1+3)	24.7
Dextrana T-110	α -(1+6), (1+3)	26.8
B-512F	α -(1+6), (1+3)	32.1
Sephadex G-15	α -(1+6), (1+3)	3.1
Sephadex G-75	α -(1+6), (1+3)	16.0
Sephadex G-200	α -(1+6), (1+3)	21.1
B-1298	α -(1+6), (1+2), (1+3)	1.9
B-1299	α -(1+6), (1+2), (1+3)	1.2
B-1307	α -(1+6), (1+2), (1+3)	8.2
B-1416	α -(1+6), (1+2), (1+3)	8.7

Gh: grado de hidrólisis, llevado por 24 h a 30°C.

La actividad se define dependiendo del método utilizado para su medición; a manera de ejemplo, en la Tabla IV se presentan algunas de las definiciones de actividad de dextranasa frecuentemente utilizadas en la literatura. Es conveniente referirse a esta Tabla para claridad en los valores que se emplean en el presente trabajo.

Multin y Nordstrom³⁶ en sus investigaciones sobre dextranasas mencionan la determinación de actividad de la enzima, midiendo su poder para liberar azúcares reductores, el cual se puede estimar de manera similar al de la α -amilasa. La mezcla de reacción se compone de 100ml de una solución conteniendo 1g de dextrana, 5ml de una solución amortiguadora de fosfatos pH 5.9 y 5ml de solución de la enzi-

ma. La solución de dextrana, la solución amortiguadora y el agua necesaria son primero mezclados en un matraz que es colocado en una estufa a 30°C. Después de que la temperatura es constante, la solución de la enzima es adicionada con un previo calentamiento a 30°C. A intervalos considerables, son reservadas muestras de 5ml determinándose su contenido de azúcares reductores por la modificación del método de Linderstrom-Lans y Holters⁴⁷ dada por Blöm y Rossted¹⁵. Una línea recta puede ser dispuesta para algunos puntos, como la liberación de azúcares reductores es proporcional al tiempo en el principio de la hidrólisis enzimática la inclinación de la línea, da la velocidad de liberación de azúcares reductores.

TABLA IV

DEFINICIONES DE ACTIVIDAD

Parámetro medido	Simbología	Definición	Ref.
Opalescencia (Bailey y Clarke)	UO.	La actividad de dextranasa de una solución es reportada como el porcentaje de la pérdida de opalescencia de la solución después de un tiempo indicado.	6
Viscosidad (Hattori e Ishibashi)	VU	Una unidad de actividad de viscosidad reducida (VU) se define como la cantidad de enzima la cual reduce la viscosidad específica de la mezcla a la mitad en 10 minutos bajo las condiciones establecidas.	31

Tabla IV (Cont.)

<p>producción de azúcares reductores. (Simson, Liberta, <u>Ri</u>chardson).</p>	U/ml	<p>Una unidad de actividad de dextranasa, se define como la cantidad de enzima requerida para liberar del sustrato (dextrana), 1 mg de azúcares reductores después de 2h de contacto a 37°C en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 6.0 y se expresa en Unidades/ml.</p>	65 66
<p>Producción de azúcares reductores. (Madhu y Prabhu)</p>	UI	<p>Una unidad de dextranasa es definida como la cantidad de enzima, la cual libera una micromol de azúcar reducido (D-glucosa) en un min. y se expresa en Unidades/ml.</p>	51
<p>Producción de azúcares reductores. (Hiraoka, Fukumoto, Sugaira etal, Tsuru, Hirose, Tsuji)</p>	U	<p>Una unidad de actividad de dextranasa se define como la cantidad de enzima la cual puede producir una cantidad de azúcares reductores equivalente a 1μ mol de glucosa por minuto (Unidades).</p>	72 33 84 85 26

Producción de azúcares reductores. (Tsuchiya y Korsaric et al.)	DU	Una unidad de dextranasa es definida como la cantidad de enzima la cual produce 1 mg equivalente de isomaltosa monohidratada en 1 h a 40°C. Se expresa como DU.	44 83
Producción de azúcares reductores. (Janson).	U	Una unidad de dextranasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar grupos reductores correspondientes a la formación de 1 μ mol de isomaltosa/min a 40°C.	39

Como los productos de la hidrólisis enzimática de la dextrana con mecanismo endo, no son monosacáridos ni oligosacáridos pero sí polisacáridos de varios tamaños, se considera más correcto expresar la cantidad de dextranasa en miliequivalentes de azúcares reductores/min-ml, por ejemplo: mg de glucosa/min-ml o mg de isomaltosa/min-ml.

Bailey y Clarke⁶ determinaron la actividad de una dextranasa de *Lactobacillus bifidus*. Experimentos preliminares sugirieron que la dextranasa de *L. bifidus* actúa mediante un mecanismo tipo endo. La actividad de dextranasa en las preparaciones enzimáticas es por lo tanto medida siguiendo la pérdida de opalescencia de dextrana en soluciones estándar conteniendo enzima liofilizada (5-20 mg/ml de agua) o extracto libre de células (1 ml), solución control conteniendo dextrana (2 ml) y solución amortiguadora de citratos

(0.2M, pH 5.5, 2 ml). Fué incluida en cada serie de pruebas una solución control conteniendo dextrana, solución amortiguadora y enzima desnaturalizada (15 min a 100°C). Las soluciones fueron preparadas en tubos especiales de nefelómetro y se incubaron a 37°C en tolueno. Al principio y a los intervalos durante la incubación, la opalescencia de las soluciones enzimáticas relativas al control de la enzima desnaturalizada, fueron medidas en un nefelómetro EEL. La actividad de dextranasa de una solución se reporta como el porcentaje perdido de opalescencia de la solución después de un tiempo indicado. La velocidad de pérdida de opalescencia de las soluciones de dextrana-dextranasa se muestra en la Fig. 3.⁶

Otros autores como Madhu y Prabhu⁵³ determinan la actividad de la dextranasa de *Penicillium aculeatum*, utilizando el método de Kosaric et al⁴⁴ después de diluir la enzima (1:50) con solución amortiguadora de acetatos (0.1M, pH 5.6) e incubación con el sustrato (2.5% de dextrana BDH, P.M. 200, 000-275,000) a 40°C por 20 minutos, los azúcares reductores y proteína, fueron estimados por los métodos del AC. 3,5-dinitrosalicílico (DNS)⁵⁴ y Lowry⁵⁰ respectivamente. Una unidad de dextranasa fué definida como la cantidad de enzima que libera una micromol de azúcar reducido (D-glucosa) en un minuto y se expresó en Unidades/ml. La actividad específica fue definida como unidades de dextranasa por miligramo de proteína. La enzima fue recuperada por saturación de sulfato de sodio (75%), precipitación con acetona (66%) y después dializada antes de usarse.

I.2.4 Producción.

La enzima dextranasa es producida por varios microorganismos; entre ellos encontramos hongos y bacterias, algunos de los cuales se mencionan en la Tabla V.

La producción de enzimas microbianas en general, de-

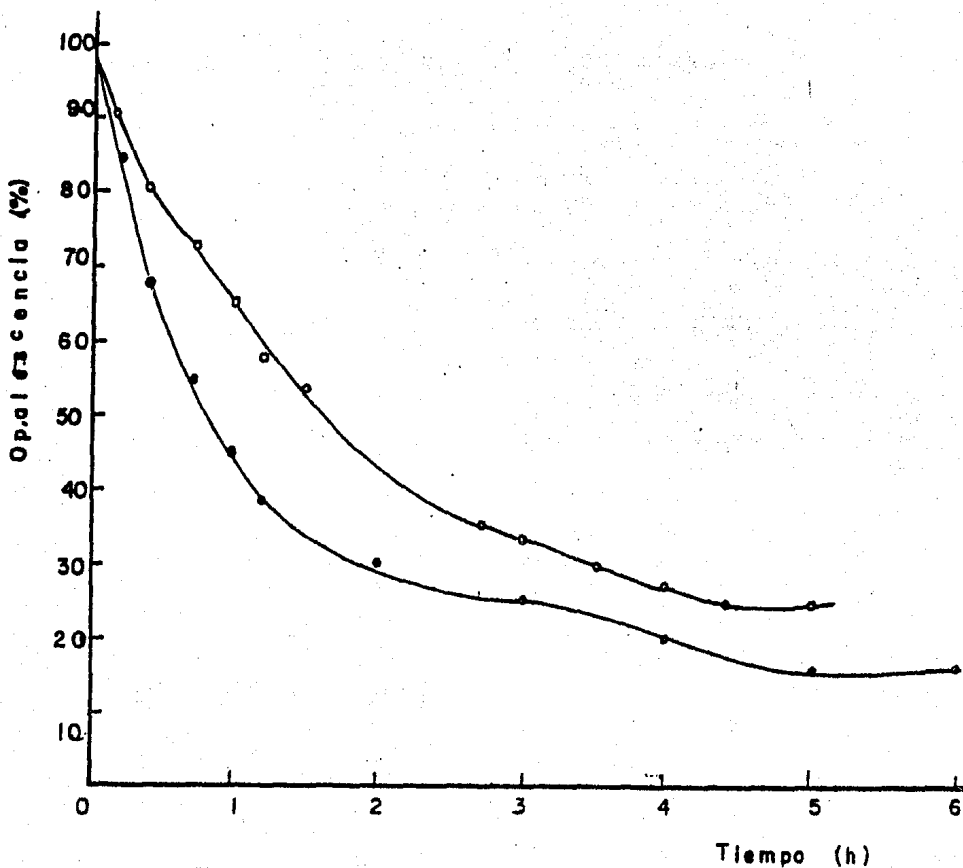


Fig. 3

Velocidad de pérdida de opalescencia de soluciones dextransa-dextransa. Soluciones conteniendo dextransa (en agua, 1ml), sol. de dextransa (2 ml) y sol. amortiguadora de citratos (0.2M, pH 5.5; 2 ml) fueron incubadas a 37°C y se midió la opalescencia a intervalos⁶. o Dextransa I (5mg); ● Dextransa II (20 mg).

TABLA V

Microorganismos productores de dextranasa.

Microorganismo	Referencia
<i>Penicillium funiculosum</i>	(44,83)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	(31)
<i>Penicillium lilacinum</i>	(87)
<i>Penicillium aculeatum</i>	(51)
<i>Cytophaga johnsonii</i>	(39)
<i>Fusarium moniliforme</i>	(65)
<i>Verticillium coccorum</i>	(31)
<i>Chaetomium gracile</i>	(31)
<i>Pseudomonas sp.</i>	(19)
<i>Celvibrio fulva</i>	(38)
<i>Penicillium verruculosum</i>	(83)
<i>Spicaria violacea</i>	(83)
<i>Lactobacillus bifidus</i>	(6)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	(62)
<i>Streptococcus mutans</i>	(86)
<i>Flavobacterium multivorum</i>	(31)
<i>Brevibacterium fuscum</i>	(74)
<i>Aspergillus carneus</i>	(33)
<i>Achromobacter spp.</i>	(31)

pende entre otros factores de los siguientes:

- i) Composición del medio de cultivo.
- ii) Cantidad de inóculo.
- iii) pH del medio de cultivo.
- iv) Agitación y aereación.
- v) Temperatura de incubación.
- vi) Tiempo de incubación.

A continuación se analizan algunas de sus características específicamente relacionadas con la producción de dextranasa:

- i) Composición del medio de cultivo.- Se puede dar una composición general del medio y aunque algunos microorganismos tienen mayores requerimientos que otros, en términos globales, las principales características del medio son:
 - Dextrana. Se requiere como inductor para la producción de la enzima. Se utiliza a una concentración del 2%.
 - Fuente de Nitrógeno. Como fuente de nitrógeno puede emplearse extracto de levadura, NaNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración de aproximadamente 1%.
 - Fuente de Fósforo. Se utiliza generalmente KH_2PO_4 o una solución amortiguadora de fosfatos al 0.05%.
 - Fuente de Magnesio. Se emplea utilizando $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0.02%.
 - Otras sales. FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 y CuSO_4 en función de elementos traza a una concentración que varía entre 0.0005 y 0.01%.
- ii) Cantidad de inóculo.- Generalmente se utiliza un volumen del 5 - 10% (V/V).
- iii) pH del medio de cultivo.- El pH del medio puede ser entre 3.5 y 5.0 generalmente, aunque algunas

bacterias como *Lactobacillus bifidus* requieren un pH de 7.2 para la producción de la enzima.

- iv) Agitación y aereación.- Dependiendo de los microorganismos que se utilizan, los cultivos pueden ser agitados o no, con aereación o sin ella (condiciones anaerobias). Existe inclusive un reporte de producción en atmósfera de $H_2 + CO_2$.⁶
- v) Temperatura de incubación.- Se utilizan temperaturas entre 20°C y 37°C.
- vi) Tiempo de fermentación.- El tiempo de fermentación también es variado. Dependiendo del microorganismo que se emplee, la fermentación puede variar de 48 h a una semana.

Para dar una idea más clara de las condiciones en que se produce la enzima dextranasa, a continuación se presentan algunos ejemplos de procesos desarrollados para diferentes microorganismos:

- Producción dextranasa por *Lactobacillus bifidus*⁶

Medio de cultivo:

. Bacto triptosa	10	g
. Bacto extracto de levadura	0.3	g
. Dextrana de <i>S. bovis</i>	1-5	g
. Agua c.b.p.	1000	ml
. pH	7.2	

Los cultivos se incubaron en una atmósfera de $H_2 + CO_2$ (95:5 V/V) a 37°C durante 48 h.

- Producción de dextranasa por *Penicillium funiculosum* SH-5 utilizando cultivo sumergido⁴⁴:

Medio de cultivo:

. Dextrana cruda	20 g
. Extracto de levadura ó harina de soya	10 g
. CaCl_2	0.4 g
. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; adicionado a 1 litro de sol. amortiguadora de fosfatos 10.1M , pH 5.8	0.2 g
. Inóculo	5% V/V
. Agitación	200 rpm

Los cultivos se incubaron a 25°C en matraces agitados aproximadamente una semana.

- Producción de dextranasa de *P. funiculosum* y *P. lilacinum*³⁶.

Medio de cultivo:

. Dextrana (bajo P.M.)	20 g/l
. NaNO_3	1.6 g/l
. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g/l
. KH_2PO_4	0.50 g/l
. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/l
. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g/l
. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.044 g/l
. $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.020 g/l
. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005 g/l
. Inóculo	0.1 %

El pH del medio puede ser entre 3.5 y 5.0; se incubó durante 10 días a 25°C en cultivo sumergido.

- Producción de dextranasa de *Fusarium moniliforme* ISU-32⁶⁵.

Medio de cultivo:

. Dextrana clínica	10	g/l
. DL-asparagina	0.1	g/l
. NaCl	3.0	g/l
. MgSO ₄	0.2	g/l
. NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0	g/l
. K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.0	g/l
. KI	100	µg/l
. Acido bórico	10	µg/l
. Molibdato de amonio	10	µg/l
. Sulfato de Manganeso	10	µg/l
. Sulfato ferroso	50	µg/l
. Tiamina	200	µg/l
. Riboflavina	200	µg/l
. Piridoxina	200	µg/l
. Ac. Nicotínico	200	µg/l
. Ac. p-amino benzoico	200	µg/l
. Pantotenato de calcio	200	µg/l
. Inositol	10	µg/l
. Biotina	2	µg/l
. Inóculo	1	cm ² (a)

El pH final del medio fué ajustado a 8.0 con NaOH 1N.
La fermentación fué mantenida bajo aereación (4l/min.)
a una temperatura de 30°C durante 14 días.

(a) A 10 l de medio de cultivo se inocula 1cm² de micelio tomado de un cultivo sólido de *F. moniliforme*.

- Producción de dextranasa de *Cytophaga johnsonii* *0.

Medio de cultivo:

. KH ₂ PO ₄	13.6	g/l
. (NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	g/l

. MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/l
. FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5 mg/l
. Dextrana (P.M. 40,000)	1 % P/V
. Inóculo	1.5 %

El medio fué ajustado a pH 7.0 con KOH. Se incubaron matraces cónicos conteniendo 25ml de medio a 30°C y con agitación.

-----o-----

En lo que a agitación se refiere, para el caso de matraces, generalmente se emplea un volumen de líquido equivalente al 20% del volumen del matraz (100 ml/500 ml) con agitación de 200 rpm, mientras que en fermentador (14 litros) el volumen de fermentación es del 70% aproximadamente, con agitación de alrededor de 400 rpm con aereación de 0.5 vvm.⁴⁴

Es importante señalar que las condiciones varían dependiendo del microorganismo ó del tipo de fermentación empleado para la producción de la enzima (cultivo sumergido, sólido, etc.), teniendo particular importancia el uso adecuado de los componentes del medio para no afectar la producción. Esta situación se ilustra en las Tablas VI y VII.

Dada su estrecha relación con la productividad, otro factor importante en la producción de dextranasa, es el periodo de incubación ó tiempo de fermentación. Simonson y Liberta⁶⁶ utilizaron una cepa de *Fusarium moniliforme* para la producción de dextranasa, determinando diariamente los cambios cuantitativos en la actividad de la dextranasa extracelular producida en cultivo sumergido 24 h. después de la inoculación, a lo largo de 14 días. La actividad se midió en alícuotas de 3ml, previa centrifugación para remover células⁶⁶. El efecto del periodo de incubación sobre la producción de dextranasa se observa en la Fig. 4.

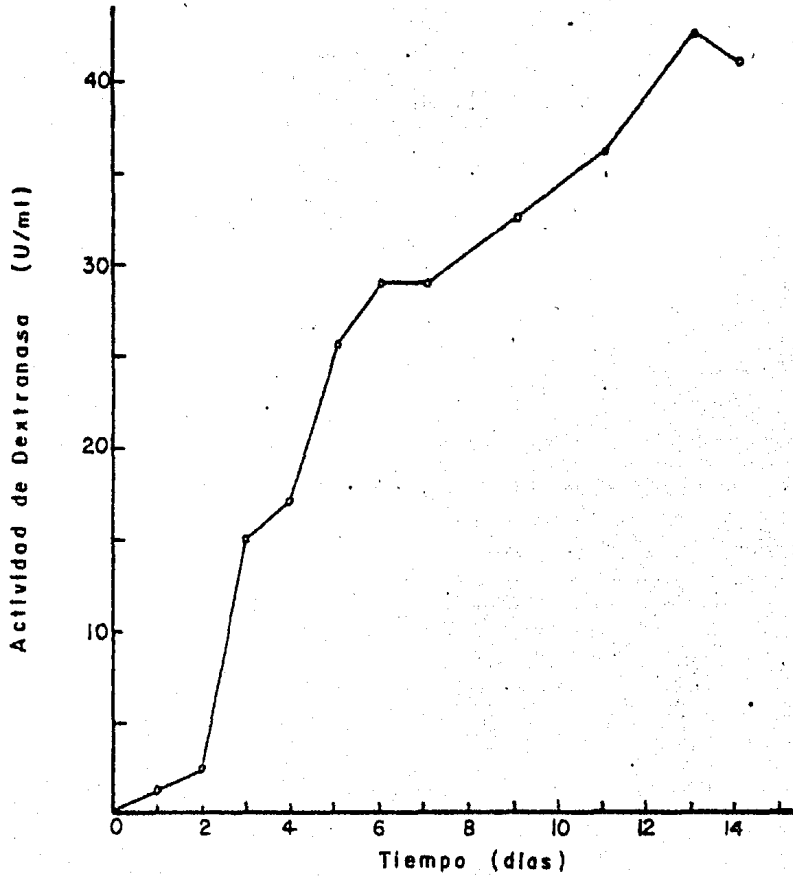


Fig. 4

Efecto del periodo de incubación en la producción de dextranasa de *Fusarium moniliforme* ⁶⁶.

TABLA VI

Factores de cultivo que afectan la producción de dextranasa en el medio de cultivo de Fukumota(1): efecto del pH y algunos constituyentes del medio ⁵¹.

Factor variado(1)	Concentración (%)	Actividad de dextranasa (U/ml)
K ₂ HPO ₄	0.2	60.0
	0.3	43.8
NaNO ₃	0.1	48.8
	0.2	58.8
NH ₄ NO ₃	0.1	45.0
	0.2	47.5
Peptona	0.2	40.0
	0.3	42.5
Extracto de levadura	0.2	70.0
	0.3	50.0
Licor de remojo de maiz.	0.1	30.0
pH	4.0	48.5
	5.0	50.0
	5.5	58.5
	6.0	58.0
	7.0	---
Medio de Fukumota optimizado. (2)		228.0

(1) Medio de Fukumota: Dextrana 0.5%; NaNO₃ 0.2%; K₂HPO₄ 0.1%; Extracto de levadura 0.1%; MgSO₄.7H₂O 0.05%; KCl 0.05%; FeSO₄.7H₂O 0.001%; pH 6.0²⁵.

(2) Dextrana (Sigma, P.M. 40x10⁶), 2%; NaNO₃, K₂HPO₄ y extracto de levadura, 0.2%; pH 6.3-6.5 y otras sales, con incubación a 30°C, 96 h con agitación.

TABLA VII

Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de dextranasa ⁵¹.

Fuente de carbono (1)	Concentración (%)	Actividad de dextranasa (U/ml)
Dextrana (P.M. 40x10 ⁰)	0.5	26.5
	1.0	56.0
	1.5	74.5
	2.0	60.0
Dextrana (P.M. 275,000)	1.0	20.0
Dextrana (P.M. 175,000)	1.0	16.5
Hidrolizado ácido (6N H ₂ SO ₄) dextrana	2.0	0
Dextrana rallis (P.M. 150,000 con glucosa)	1.0	5.0
Dextrana (P.M. 17,500)	1.0	10.5
Polvos de celulosa Whatman No.1	1.0	0
Almidón (BDH)	1.0	0
Dextrina (BDH)	1.0	0
Agar (Difco)	0.5	0
Levan (bacteriano)	1.0	0
D-glucosa	1.0	0
D-fructuosa	1.0	0
Sacarosa	1.0	0
Maltosa	1.0	0
Lactosa	1.0	0
Producto de reacción conc. (después de 2 h)	1.0	50.5
Dextrana (<i>Leuconostoc</i>)	1.0	74.0
Sefadex G-50	1.0	0

(1) La fuente de carbono se varió en el medio de Fukumota no optimizado.

Estos mismos autores observaron igualmente el efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento de *F. moniliforme* y la producción de dextranasa. Los resultados se muestran en la Tabla VIII. En ésta Tabla puede observarse que el pH inicial de 8.0 fué el mejor para el crecimiento y la producción de dextranasa. Para observar las diferencias de crecimiento se mide el diámetro de la colonia.

TABLA VIII

Efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de dextranasa de *Fusarium moniliforme*⁶⁶.

pH Inicial	pH Final (a)	Actividad de dextranasa (Unidades/ml)	Diámetro de la colonia(b) (cm)
4	2.7	0.30	2.30 ± 0.1000
5	2.7	0.38	2.50 ± 0.071
6	2.8	0.59	2.85 ± 0.035
7	4.0	31.63	3.38 ± 0.083
8	6.1	33.03	4.05 ± 0.206

(a) Medición después de 10 días de incubación en un medio líquido definido conteniendo 1% de dextrana y a una temperatura constante de 25°C.

(b) Medición después de 5 días de crecimiento en un medio sólido conteniendo 1% de dextrana e incubado a temperatura ambiente.

1.2.4.1 Cinética de la Fermentación.

A continuación se presenta el caso de la cinética de la producción de dextranasa de *Penicillium funiculosum*⁴⁴. La fermentación se puede dividir en dos fases, en función de la producción de dextranasa:

1. Fase de crecimiento.- El crecimiento celular es rápido, la masa celular es incrementada hasta la concentración máxima X_m que es alcanzada al tiempo t_m . La concentración del producto, en este caso dextranasa, permanece bajo.
2. Fase de producción.- La masa celular disminuye casi linealmente, mientras la concentración del producto se incrementa de modo estable hasta que es alcanzado el nivel máximo. La concentración del producto se expresa como una función de la masa celular (ecuación 3).

Estas dos etapas permiten suponer que el producto en este proceso, no está ligado al crecimiento, caso que ha sido contemplado por algunos modelos cinéticos. Una forma de analizar el proceso es la siguiente:

Se tiene:

X = concentración de masa celular, g/l.

P = concentración de dextranasa, DU/ml.

t = tiempo de fermentación en horas.

k_1, k_2 = constantes.

μ = velocidad específica de crecimiento, $\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$

q_p = velocidad específica de síntesis de

producto, $\frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$

Se encontró una relación lineal existente entre $\frac{P-X}{X}$ y el

tiempo, durante las 2 fases aunque con pendiente diferente (Fig. 5):

$$\frac{P - X}{X} = k_1 t + k_2 \dots\dots\dots(1)$$

diferenciando:

$$\frac{dP}{dt} = (k_1 t + k_2 + 1) \frac{dX}{dt} + k_1 X$$

rearrreglando:

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = (k_1 t + k_2 + 1) \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + k_1$$

$$qp = (k_1 t + k_2 + 1)\mu + k_1 \dots\dots\dots(2)$$

forma integrada:

$$P = P_0 + k_1 X t - X_0 t_0 + k_2 + X - X_0 \dots\dots(3)$$

donde t_0 , X_0 y P_0 son valores iniciales.

Las ecuaciones cinéticas más frecuentemente reportadas para la descripción de la síntesis de productos en procesos fermentativos son las siguientes:

<u>Modelo</u>	<u>Ecuación cinética</u>
Luedeking & Piret	$qp = k_1 \mu + k_2$
Kono & Asai	$qp = k_1 \phi + k_2 (1 - \phi)$
Le Duy	$\frac{dP(t)}{dt} = k_1 \frac{dX^*(t)}{dt} + k_2$
Modelo propuesto	$qp = (k_1 t + k_2 + 1)\mu + k_1$

donde:

ϕ = coeficiente aparente de actividad del crecimiento.

$X^*(t) = X(t - \delta)$ donde δ es la producción en la fase lag.

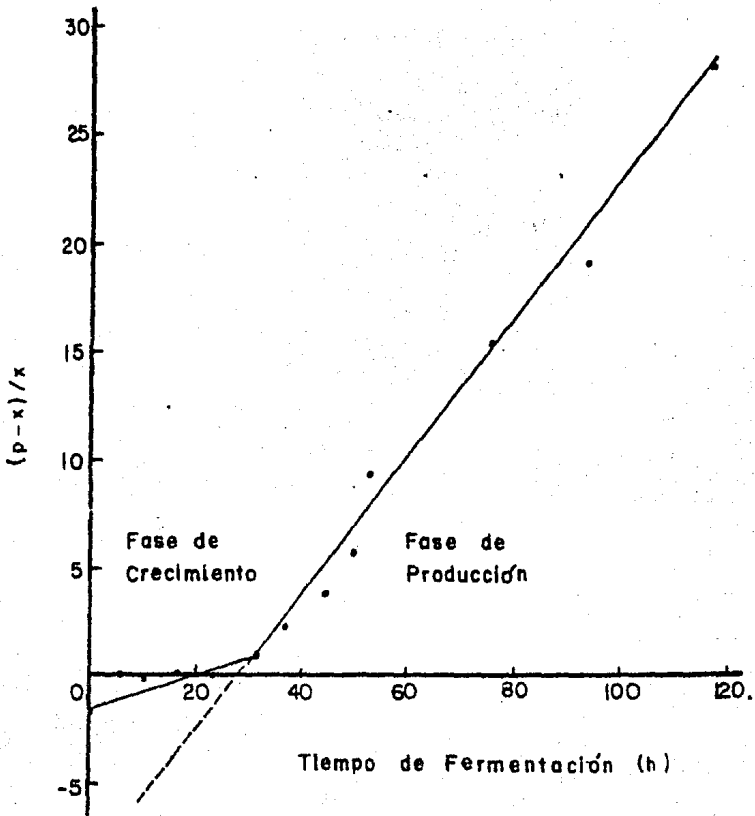


Fig. 5

Relación de $\frac{P - X}{X}$ con el tiempo de producción de dextranasa de *Penicillium funiculosum*.

Al modelo de Luedeking & Piret no se le encontró aplicación. El modelo de Kono & Asai correlaciona bien sólo arriba del punto de masa celular máxima ($t=30$ h). El modelo de LeDuy es completamente aplicable en el periodo de incubación. Sin embargo, la desviación de la concentración de la enzima observada, es grande para ser aceptable. El modelo propuesto es el único que correlaciona completamente bien el periodo de incubación incluyendo la fase de declinación de la masa celular.

La producción de la enzima se efectuó en cultivo sumergido, en el medio descrito anteriormente⁴. La actividad máxima obtenida es del orden de 200 DU/ml. Se encontró que ciertas condiciones son esenciales para la obtención de una alta producción de dextranasa. Primero, se requiere de un pH inicial de 5.8 - 6.0 y segundo, los cultivos inclinados usados para la inoculación, tienen que ser de 2 semanas. La última condición indica la importancia de las esporas en la propagación del cultivo y la producción de la enzima.

Se observó que la producción máxima se obtiene a las 120 horas; por otro lado, el máximo de biomasa se alcanza después de 30 h de incubación, lo que indica que el máximo de actividad se detecta después de que la biomasa empieza a decrecer y es evidente una autólisis definida (Fig.6) .

Un comportamiento diferente se muestra en la producción de dextranasa de *Penicillium aculeatum*⁵¹. La biomasa, la actividad de dextranasa y la actividad específica se incrementan durante el curso de la fermentación. Después de 144 h se estabilizan y posteriormente la proteína soluble se incrementa y la actividad específica decrece (Fig.7). En éste caso se obtiene un rendimiento de 228 a 230 unidades/ml de dextranasa.

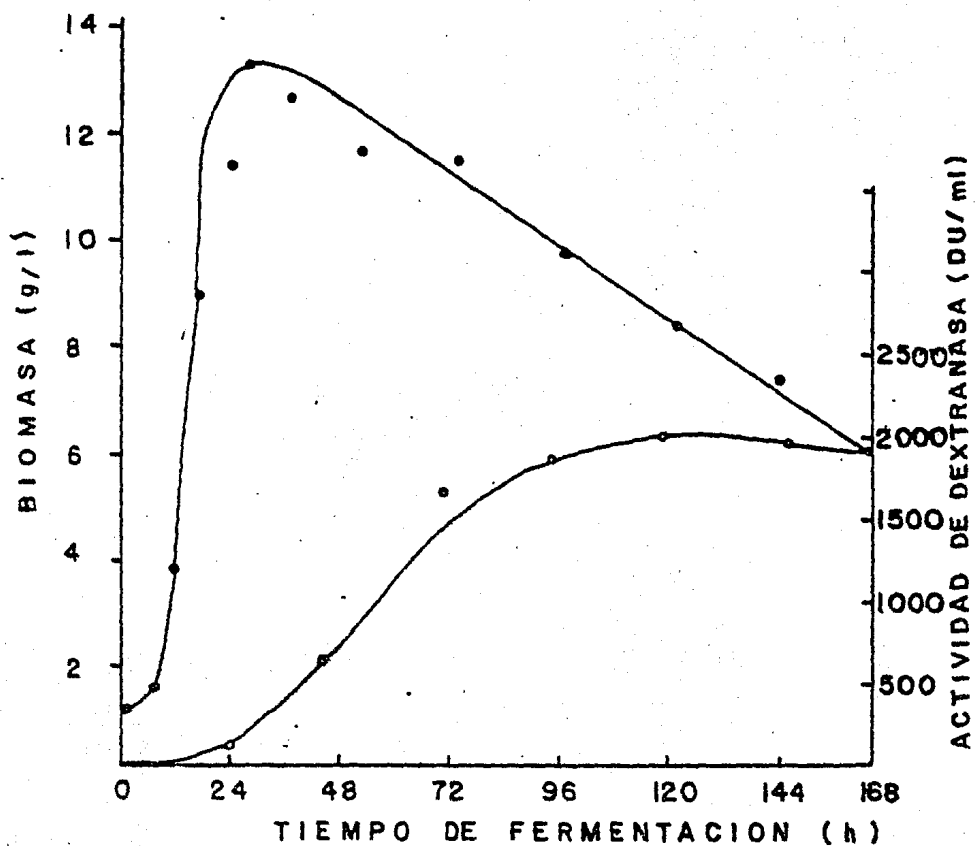


Fig. 6

Relación entre la biomasa y la actividad de dextranasa de *Penicillium funiculosum* con el tiempo de fermentación** (promedio de 3 corridas).

● Biomasa ; ○ Actividad.

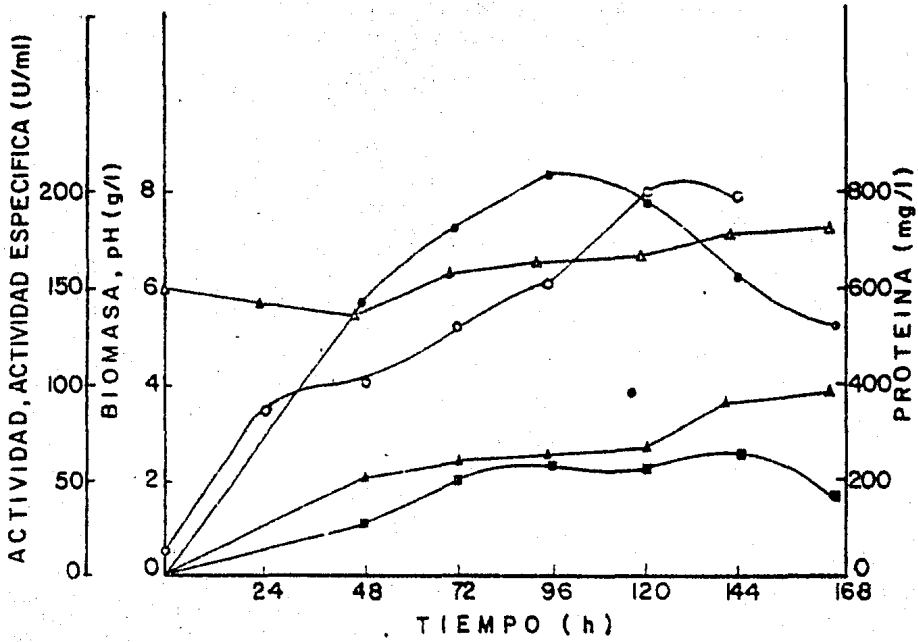


Fig. 7

Relación entre la biomasa, actividad, actividad específica, proteína y pH con el tiempo de fermentación de la dextranasa de *P. aculeatum*⁵¹.

○ Biomasa ; ▲ Actividad ; ● Actividad específica ; △ Proteína ; ■ pH.

En suma, se puede decir que la dextranasa se produce principalmente por hongos y algunas bacterias utilizándose un inóculo entre el 5 - 10 %. El pH y la temperatura óptimos de producción son de 3.5 - 5.0 y de 20°C - 37°C respectivamente. En la mayoría de los cultivos se utiliza agitación y el tiempo de fermentación es de 48 horas a una semana. De los microorganismos estudiados, se ha visto que se obtienen mejores rendimientos para la producción de dextranasa con *Penicillium funiculosum*. La composición del medio de cultivo es importante para una buena producción de la enzima, teniendo como principal componente dextrana, la cual se emplea en una concentración de 1.5 - 2.0 % y además de P.M. no muy elevado (generalmente se utilizan dextranas de P.M. del orden de 40,000), siendo el inductor de la enzima. Dependiendo de las necesidades del microorganismo empleado, se utilizan diversas fuentes de nitrógeno, magnesio, fósforo y sales minerales mencionadas.

1.2.4.2 Recuperación de enzimas.

Generalmente es necesario procesar materiales celulares frescos para la recuperación de la enzima. Con fuentes microbianas, a menudo pueden recuperarse enzimas de sobrenadante almacenados en refrigeración. Sin embargo, la viabilidad en las propiedades que presenta en el congelamiento y descongelamiento de las proteínas puede presentar dificultades para obtener datos reproducibles por pérdidas de actividad²⁸. Por lo tanto, después de terminada la fermentación, se recomienda procesar de inmediato el medio. Las vías a seguir para la recuperación y procesamiento de la enzima son muy variadas. En la Tabla IX se mencionan algunas alternativas.

Para el caso de enzimas intracelulares, es necesario señalar que se han efectuado algunos desarrollos inclusive a nivel industrial que evitan la extracción de la enzima empleando a la célula completa preservando la actividad en

TABLA IX

Alternativas de recuperación y procesamiento de enzimas ²⁶.

I. ENZIMAS EXTRACELULARES :

- a) Eliminación de células (filtración, centrifugación, sedimentación, etc.).
- b) Evaporación.
- c) Precipitación (con sales ó solventes).
- d) Ultrafiltración.
- e) Extracción.
- f) Secado.
- g) Precipitación fraccionada.
- h) Adsorción.
- i) Cromatografía.

II. ENZIMAS INTRACELULARES:

En éste caso, previo a la aplicación de cualquiera de las etapas antes mencionadas, se incluyen :

- a) Recolección de células.
 - b) Ruptura celular y extracción.
 - c) Eliminación de residuos celulares.
-

zimática de interés en el interior (caso de glucosa-isomerasa, *Bacillus cereus* ; penicilino-amidasa, *E. coli*, etc.)²⁸

En algunos casos de producción de dextranasa se incluye como primera etapa la separación de la biomasa, ya que las enzimas conocidas se localizan en el exterior de las células. Otros casos, dada la ubicación de la dextranasa, requieren de un pretratamiento. En la Tabla X se reportan los métodos de ruptura celular más empleados a escala laboratorio e industrial. A continuación se mencionan algunos ejemplos.

1.2.4.3 Recuperación de dextranasa.

Janson²⁹ mostró que la dextranasa de una cepa de *Cytophaga johnsonii* se localiza en la envoltura superficial de la célula. Para la extracción de ésta enzima, se requiere de varios tratamientos de solubilización con algunos detergentes (Tabla XI).

Con éstos experimentos demuestra que los surfactantes no iónicos son más adecuados que los iónicos para la extracción de dextranasa. Los mejores resultados fueron obtenidos con alquil-aril-polieter y alcohol lauril-eter, teniendo valores de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de alrededor de 13 a 14.

El detergente más eficiente fue Tritón X-100. La mejor solubilización fue alcanzada a pH entre 7-9 (Fig. 8) y a concentraciones de Tritón X-100 alrededor del 2% (p/v) ó mayores (Fig.9). El periodo de incubación con éste detergente requerido para la máxima solubilización, varía con la temperatura y concentración de envoltura/bacteria.

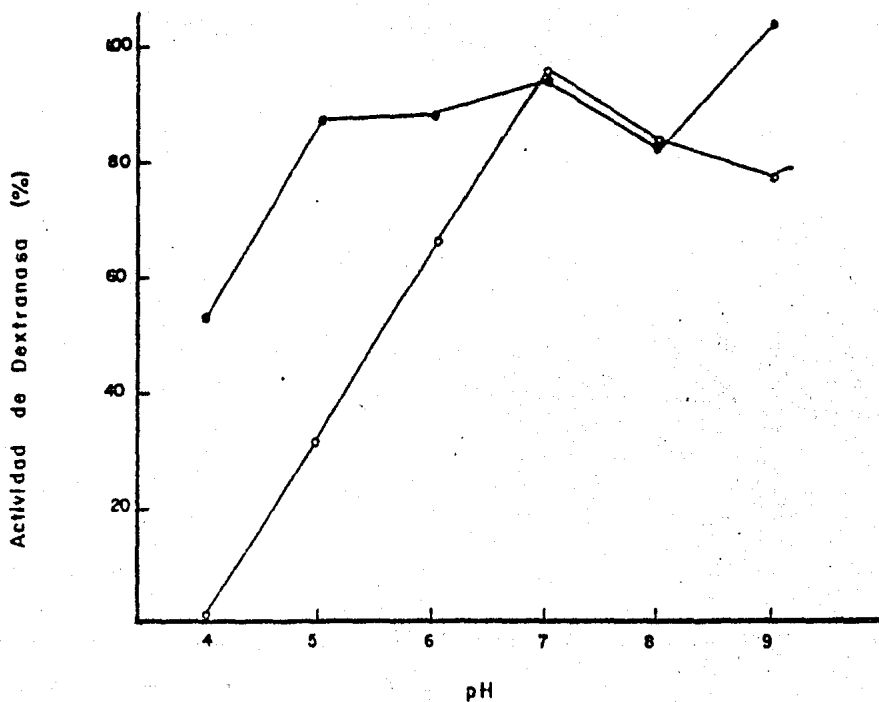


Fig. 8

Efecto del pH en la solubilización de dextranasa de *Cytophaga johnsonii* por Tritón X-100. La actividad se expresa como porcentaje. El detergente tiene una concentración del 2% (p/v) en sol. amortiguadoras 0.05M: acetatos a pH 4.0 y 5.0; fosfatos a pH 6.0 y 7.0 y tris-HCl a pH 8.0 y 9.0. Se incubó a 5°C, 2 h. en agitador rotatorio¹⁰.

● Actividad en incubado ; ○ Actividad en sobrenadante.

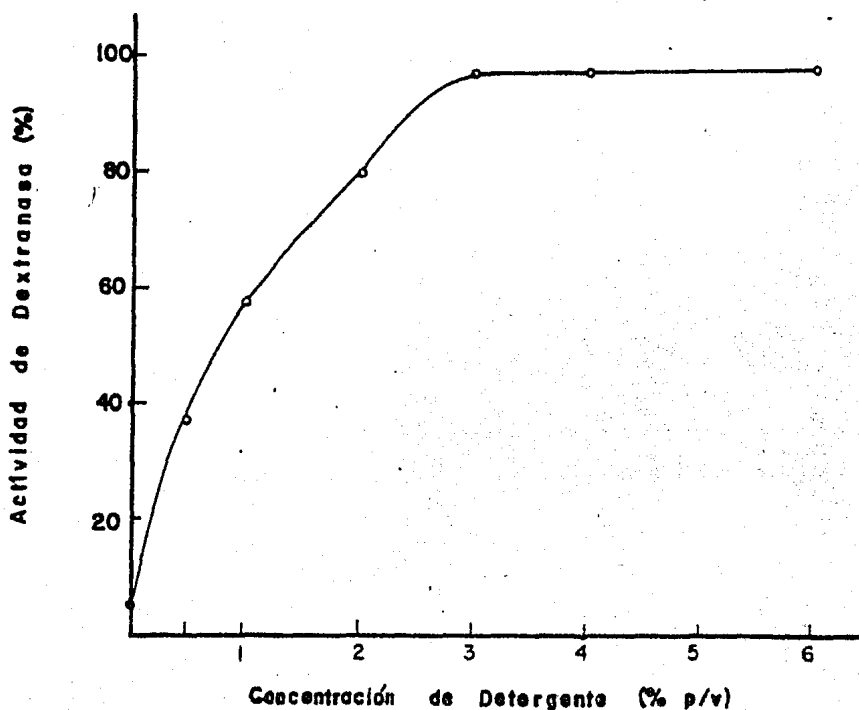


Fig. 9

Efecto de la concentración de detergente en la solubilización de la dextranasa de *Cytophaga johnsonii* por Tritón X-100. La concentración de envoltura es de 20 g peso húmedo/100 ml de suspensión. La incubación tiene lugar en un mezclador rotatorio a 5°C durante 90 min. Se utiliza sol. amortiguadora de fosfatos pH 7.5. Los efectos de la solubilización se expresan como porcentajes de actividad de incubado¹⁰.

TABLA X

Métodos de ruptura celular ⁴⁵.I. MECANICO.

A. Ruptura en líquido:

- a) Agitación mecánica, licuadora Waring.
- b) Ultrasonido.
- c) Presión:
 - Prensa Francesa.
 - Fraccionador Ribí.
 - Prensa.
 - Chaekoff.

B. Ruptura en sólido.

- a) Molienda:
 - Mortero.
 - Molino de bolas.
- b) Presión:
 - Prensa Hughes.
 - Prensa "X".

II. NO MECANICO.

A. Desecación.

B. Lisis.

C. Física.

- a) Choque osmótico.
- b) Descompresión.
- c) Congelamiento y descongelamiento.
- d) Secado por aire.
- e) Secado al vacío.
- f) Liofilización.
- g) Secado por solventes.

D. Química.

- a) Catiónica y aniónica.
- b) Detergentes.
- c) Antibiótica.
- d) Glicina.

E. Enzimática.

- a) Lisozima y enzimas relacionadas.
- b) Fagos.
- c) Antibióticos.

TABLA XI

Efecto de varios detergentes en la solubilización de la dextranasa de *Cytophaga johnsonii*^o.

Detergente	Valor de HLB	Actividad de dextranasa (%)	
		Incubado	Sobrenadante
Twenn 20	16.7	100	68
40	15.6	100	55
80	15.0	100	66
60	14.9	100	63
85	11.0	100	6
65	10.5	100	45
81	10.0	100	4
Tritón X-45	10.4	100	16
X-114	12.0	100	76
X-100	14.0	100	102
X-102	14.6	100	64
X-405	17.9	100	20
N-101	13.4	100	88
Berol 072	11.0	100	90
085	13.5	100	92
267	12.3	100	21
296	15.2	100	82
EMU-09	13.6	100	98
Brij 30	9.7	100	0
35	16.9	100	29
Myrj 51	16.0	100	17
53	17.9	100	40
Deoxicolato	----	95	62
SDS	40.0	84	84
CPC	----	32	0
CTB	----	28	0

Estos resultados están dados como porcentajes de la actividad de la suspensión control.

Todas las técnicas de desintegración probadas causan rompimiento y disminuyen el tamaño de las partículas de las membranas celulares con poca uniformidad entre ellas.

La oscilación sónica en éste caso, produce soluciones heterogéneas, las cuales requieren de velocidades muy altas de centrifugación debido a que el tamaño de partículas es demasiado pequeño⁴⁰.

Siguiendo los experimentos para recuperación de dextranasa de *Cytophaga johnsonii*, Janson⁴¹ utilizó enzimas y venenos de víbora para éste propósito. Los venenos de víbora son fuentes ricas de enzimas hidrolíticas y se demuestra que 7 de 9 venenos utilizados por Janson, liberan la dextranasa activa de las envolturas de las células de manera eficiente (Tabla XII).

Todas las enzimas proteolíticas listadas en la Tabla XI han sido efectivas en la liberación de dextranasa de la envoltura de la célula con una solubilización de más del 75%.

La α -quimotripsina fué elegida para algunos estudios por las ventajas que presenta en relación a su eficiencia, a sus propiedades de restituir la actividad de la dextranasa, su disponibilidad, pureza y su facilidad para separarla por métodos subsecuentes como se muestra en las figuras 10 y 11.

En general, hay 4 lugares donde las enzimas pueden estar ubicadas en células de las bacterias Gram negativas:

1. En la membrana externa.
2. En el espacio periplásmico.
3. En la membrana citoplásmica.
4. En el citoplasma.

TABLA XII

Habilidad de varios venenos de víbora y enzimas, para remover la dextranasa de la envoltura de *C. jonhsonii* ⁴⁰.

Reactivo	Actividad de Dextranasa		
	Incubado		Sobrenadante
	% de valor inicial	% de incubado	% de valor inicial
Venenos de víbora*			
Agkistrodom piscivorus	107	96	103
Bitis arietans	108	98	106
Bothrops atrox	110	94	104
Crotalus adamanteus	102	22	22
Dendroaspis polylepis	107	92	99
Hemachatus haemachates	106	90	95
Naja nigricollis	106	92	98
Trimeresurus okinavensis	101	63	64
Vipera russellii	104	25	26
Bee venom	97	7	6.5
Enzimas**			
Lipasa (páncreas)	98	6	6
Lipasa (germen húmedo)	99	3	3
Lipasa (microbiol.)	97	7	6.5
Tripsina	81	13	11
α -quimotripsina	101	96	97
Papaina	103	74	76
Aminopectidasa	95	5	5
Carboxipeptidasa	98	3	3
Proteinasa (<i>B. subtilis</i>)	49	72	35
Proteinasa (<i>Penicillium</i>)	103	97	100
Proteinasa (<i>Arthrobacter</i>)	43	81	35
Lisozima	93	8	7.5

* Concentración de pared: 75mg peso seco/ml ; concentración del veneno: 2mg/ml ; tiempo de incubación: 75 min.

** Concentración de pared: 160mg peso seco/ml ; concentración de la enzima: 1 mg/ml ; tiempo de incubación: 2 horas.

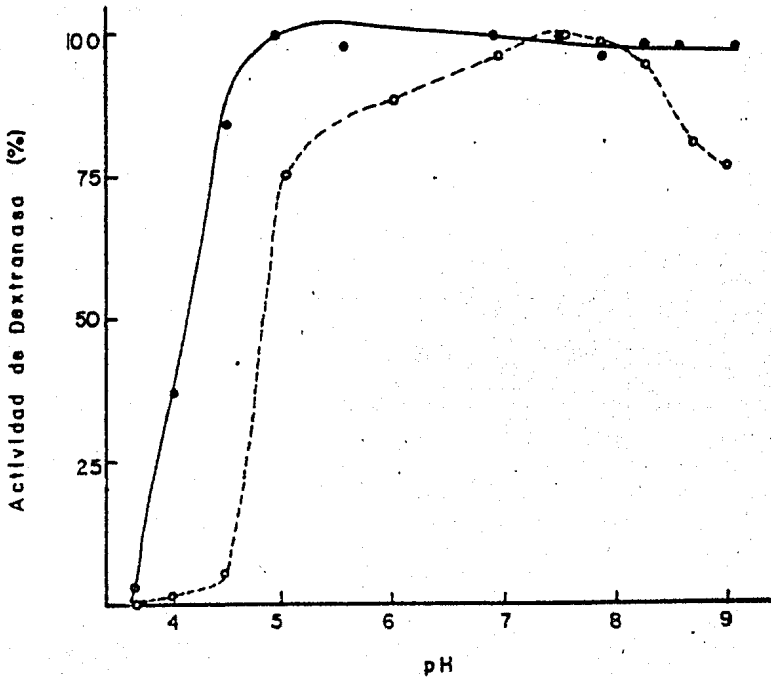


Fig. 10

Solubilización de dextranasa de *Cytophaga johnsonii* por α -quimotripsina a varios valores de pH ⁴⁰.

- Actividad de suspensiones después de la adición de α -quimotripsina.
- Actividad en el sobrenadante después de incubación y centrifugación.

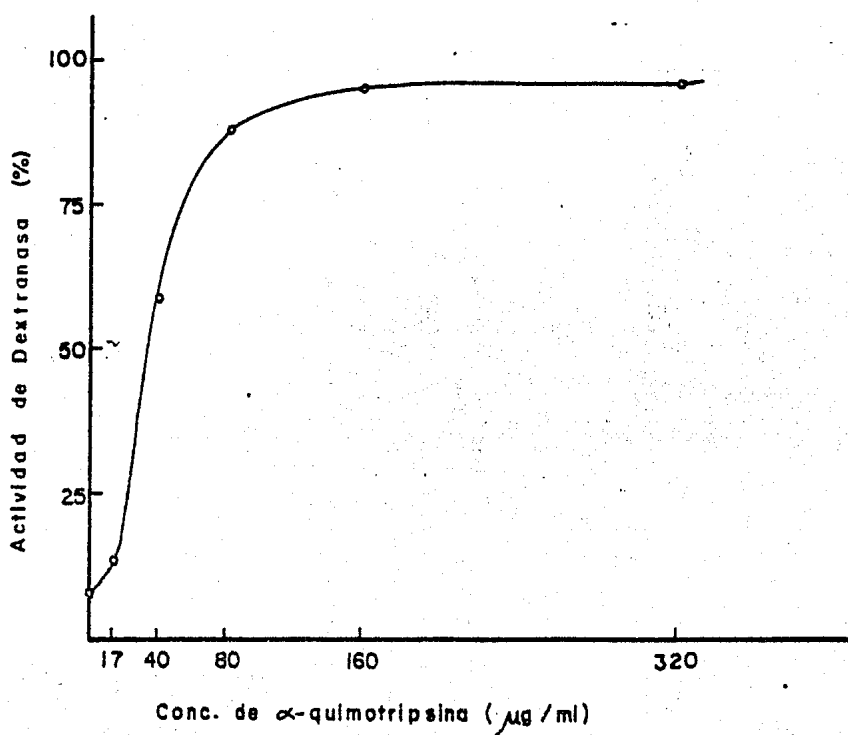


Fig. 11

Efecto de la concentración de α -quimotripsina en la solubilización de dextranasa de *C. johnsonii*⁴⁰.

Las enzimas localizadas en el espacio periplásmico o en el citoplasma, son liberadas cuando la bacteria es desintegrada y son obtenidas en el sobrenadante después de centrifugación, por los métodos anteriormente mencionados al igual que las que se encuentran en la membrana externa³⁹.

Otro caso de dextranasa intracelular es el reportado por Covacevich y Richards¹⁹, quienes después de la fermentación, tratan las células de *Pseudomonas* UQM-733 por sonicación durante 20 minutos en un ultrasonicador MSE 100 watts a una temperatura menor de 5°C en una solución amortiguadora de citratos (pH 5.5) seguido por centrifugación. Las enzimas intracelulares son aisladas de la solución sobrenadante por precipitación con sulfato de amonio seguido de centrifugación. El precipitado (designado enzima cruda) se redisuelve en sol. amortiguadora de citratos 0.02M (pH 5.5) y se dializa contra una solución de glicina al 1% por 24 horas,

En el caso de hongos productores de dextranasa intracelular (*P. funiculosum*, *P. lilacinum*) en cultivos de superficie, se colectan en un filtro se lavan y cortan en pequeñas piezas. Posteriormente son molidos con arena, tolueno y un volumen determinado de sol. amortiguadora de acetatos (pH 5.0). La mezcla obtenida se mantiene por un día a temperatura ambiente para autólisis, después se realizan dos extracciones con sol. amortiguadora de acetatos diluida (pH 5.0). El extracto obtenido se centrifuga. El sobrenadante contiene la dextranasa cruda, la cual almacenada en tolueno y bajo condiciones de refrigeración durante 8 meses, no presenta apreciable pérdida de actividad³⁶.

Las dextranasas extracelulares, generalmente se recuperan por centrifugación ó filtrado, por ejemplo, la dextranasa de *S. mutans*⁸⁷, después de la fermentación, el cultivo se centrifuga durante 10 minutos a 12,000 x g. Sugiu et al⁷¹ recuperan la dextranasa de *P. funiculosum* por filtración. Tanto Simonson et al⁶⁵ como Hiraoka et al³⁴ utilizan filtración seguida por succión para remover las células e impurezas insolubles en la recuperación de dextranasas de *Fusarium moniliforme* y de *A. carneus* respectivamente.

1.2.4.4 Purificación de la enzima.

La parte fundamental de la purificación consiste en una serie de fraccionamientos, mediante los cuales, la enzima de interés es separada de otras enzimas y proteínas.

Una vez que se cuenta con la proteína en solución, se somete al fraccionamiento, que puede realizarse en función de algunas de las siguientes características o de la combinación de ellas:

1. Solubilidad.
2. Carga eléctrica.
3. Tamaño.
4. Actividad biológica.

1.2.4.5 Purificación de dextranasa.

Para la purificación de la dextranasa de *Aspergillus carneus*, Hiraoka et al³³ utilizaron varios métodos como se muestra en la Tabla XIII siguiendo los pasos que a continuación se describen:

I. Primer fraccionamiento con sulfato de amonio.- Se filtran 12 litros del cultivo crecido a través de una mem

brana de celite, con succión para remover las células e impurezas insolubles. Para aclarar el filtrado se adicionó sulfato de amonio hasta una concentración final de 40% de saturación. Después de reposado durante la noche en refrigeración, el precipitado resultante se remueve por filtración a través de una membrana de celite. Al filtrado se adiciona sulfato de amonio sólido hasta un 80% de saturación, almacenando la mezcla durante 4 horas en refrigeración. El precipitado es recuperado por filtración, disuelto en una pequeña cantidad de sol. amortiguadora de fosfatos 5mM, pH 5.5 y después, dializado contra la misma solución amortiguadora durante 2 días, en los cuales, el líquido de diálisis se cambia cada 12 horas.

II. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.- Después de la remoción de los materiales insolubles por centrifugación, el sobrenadante se carga sobre una columna (4.0 x 80 cm) de DEAE-celulosa, previamente equilibrada con sol. amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 5.5 . La columna es lavada con 2 litros de la solución amortiguadora y la dextranasa adsorbida es eluida con un gradiente lineal incrementado en concentración de NaCl a una velocidad de flujo de 50 ml/h. El depósito contenía 1 litro de sol. amortiguadora de fosfatos 5mM - NaCl 1.0M, pH 5.5 y la cámara mezcladora contenía 1 litro de solución amortiguadora sin NaCl. El patrón de elución de la dextranasa está ilustrado en la Fig. 12.

III. Segundo desalado (salting-out) y cromatografía sobre columna de DEAE - celulosa.- A 540 ml de la fracción activa, se adicionó sulfato de amonio hasta un 80% de saturación. Después de mantenerlo toda la noche en refrigeración, el precipitado resultante se colecta por centrifugación, se disuelve en una pequeña cantidad de sol. amortiguadora de fosfatos 5 mM , pH 6.5 y después

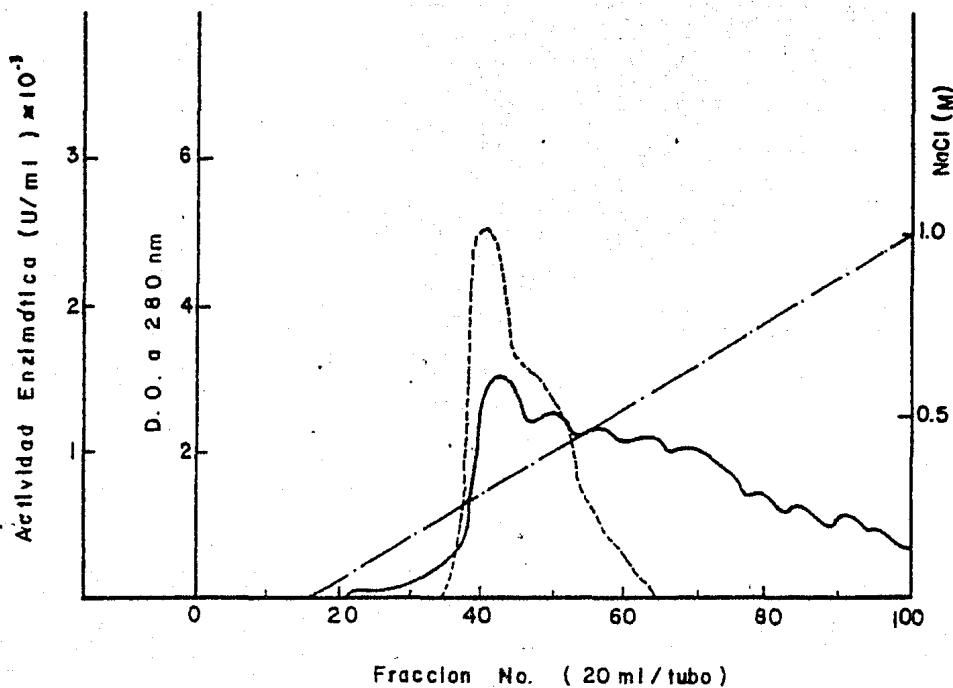


Fig. 12

Patrón de elución de una cromatografía en columna en DEAE-celulosa de una preparación de dextranasa cruda de *A. carneus*³³.

— D.O. a 280 nm ; ----- Actividad de dextranasa ;

----- Concentración de NaCl.

TABLA XIII

Purificación de dextranasa a partir de un cultivo filtrado
de *Aspergillus carneus*³³

Procedimiento	pH	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad total (x 10 ⁻³)	Actividad Específica	Recuperación (%)
Cultivo filtrado	8.4	11,900	34,200	1,310	38.2	100
Desalado y diálisis	5.5	300	2,320	838	363	64
Cromatografía DEAE-celulosa	5.5	540	613	762	1,220	58.1
Desalado y diálisis	6.5	24	462	712	1,540	54.3
Recromatografía DEAE-celulosa	6.5	115	281	550	1,960	42.0
Desalado y filtración en gel sobre Bio Gel-P-150	7.0	68	190	435	2,300	33.2
Desalado y diálisis	7.0	10	175	408	2,330	31.2
Corridas repetidas de elec- troenfoque.						
Dextranasa I	4.2	3.5	48.0	123	2,560	9.4
Dextranasa II	4.35	2.0	34.0	85	2,500	6.5

dializado contra la misma solución amortiguadora durante 2 días con cambios del líquido de diálisis cada 12 h. La solución de la enzima dializada, 24 ml, se carga sobre una columna (1.6 X 40 cm) de DEAE-celulosa, equilibrada con la misma solución amortiguadora para adsorber la dextranasa sobre el intercambiador de iones. Después de lavar la columna con 200 ml de la solución amortiguadora, la dextranasa se eluye con un sistema de gradiente lineal de NaCl a una velocidad de flujo de 20 ml/h. El depósito y la cámara mezcladora consistieron de 200 ml de la solución amortiguadora con y sin NaCl 0.6M respectivamente. Un perfil de elución representativo se muestra en la Fig. 13. A 115 ml de la fracción activa se adiciona sulfato de amonio hasta un 80% de saturación y después se mantiene toda la noche en refrigeración, el precipitado resultante se colecta por centrifugación.

IV. Filtración en Gel con BioGel P-150.

El precipitado se disuelve en una pequeña cantidad de solución amortiguadora de fosfatos 25mM, pH 7.0 y después se sujeta a filtración en gel con una columna de BioGel P-150 equilibrada con la misma solución amortiguadora. Se presentó un pico simétrico de proteína con una actividad específica de dextranasa constante (Fig. 14). Se combinan 68ml de la fracción activa y la dextranasa se precipita con la adición de sulfato de amonio sólido. Después de mantenerlo toda la noche en refrigeración, el precipitado se colecta usando una centrifuga, se disuelve en un volumen pequeño de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y después se dializa contra la misma solución durante 2 días.

V. Electroenfoque.

La preparación de la enzima dializada, (alrededor de 100 mg), se sujeta a electroenfoque, usando una columna de 440 ml con un anfolito de rango de pH de 3 a 6. Por este procedimiento, la enzima se separa en 2 fracciones activas, dextranasa I (pI 4.12) y dextranasa II (pI 4.35). Ambas fracciones activas son otra vez sujetas al electroenfoque bajo con-

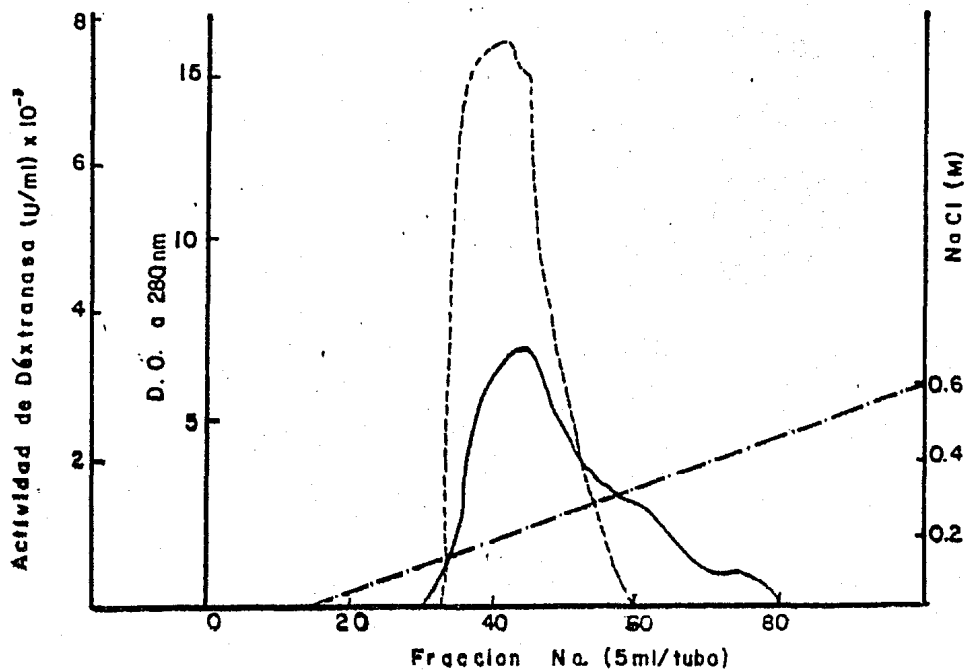


Fig. 13

Patrón de elución de una preparación de dextranasa de *A. carneus* parcialmente purificada en cromatografía sobre una columna de DEAE-celulosa³³.

—— D.O. a 280 nm ; ----- Actividad de dextranasa ;
 -.-.-.-.- Concentración de NaCl.

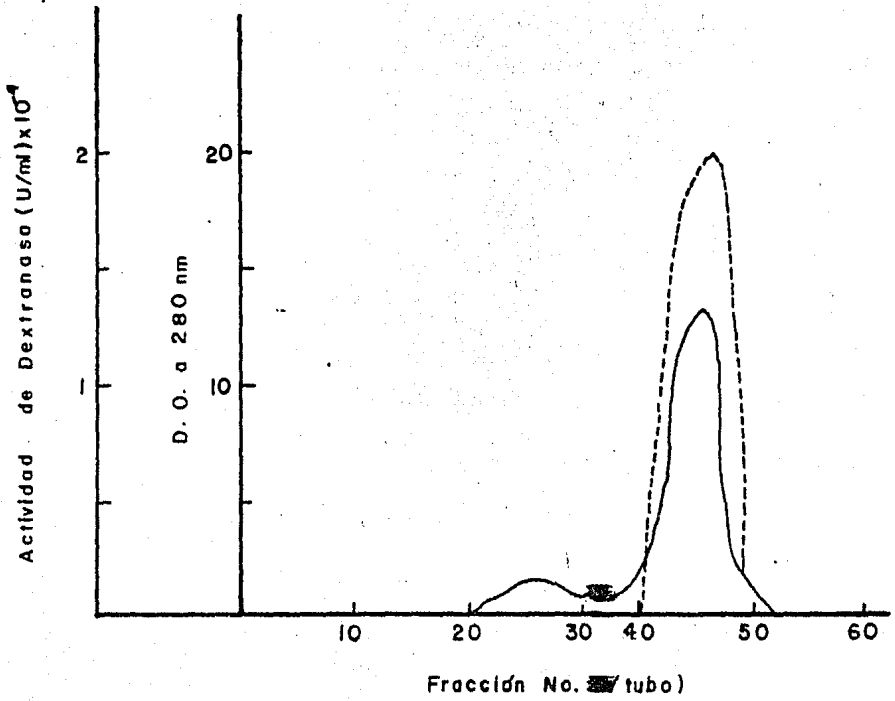


Fig. 14

Patrón de filtración en gel sobre BioGel de una dextranasa de *A. carneus* parcialmente purificada³³.

———— D.O. a 280 nm ; ----- Actividad dextranasa.

diciones similares. La fracción dextranasa I es de nuevo separada en dos fracciones. Apareció un componente activo en la misma posición con aquella del material inicial (dextranasa I) y la otra en la posición de dextranasa II. Por otro lado, la dextranasa II mostró un simple patrón simétrico en repetido experimento de electroenfoque. Ambas enzimas son purificadas alrededor de 65.5 veces por los procedimientos mostrados anteriormente y la actividad recobrada fue de 9.4% para dextranasa I y de 6.5% para dextranasa II.

Sugiura et al⁷² llevaron a cabo la purificación de dextranasa de *Penicillium funiculosum* con los procedimientos que se muestran en la Tabla XIV. La enzima cruda es sujeta a extracción con agua, fraccionamiento con sulfato de amonio y finalmente fraccionada con BioGel P-60, equilibrado con solución amortiguadora de acetatos 50mM (pH 5.0). En ésta etapa, la enzima es purificada alrededor de 20 veces. Posteriormente, la enzima es pasada a través de una columna de CM-celulosa, equilibrada con solución amortiguadora de acetatos 10mM (pH 5.0). La enzima adsorbida es eluida por un sistema de gradiente lineal. Por estos procedimientos, la dextranasa es purificada alrededor de 30 veces a partir de la enzima cruda. La fracción activa obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa, es sujeta a electroenfoque; son obtenidos dos picos con actividad de dextranasa, dextranasa I (pI 3.98) y dextranasa II (pI 4.19). Ambas preparaciones son electroforéticamente homogéneas. La recuperación total de actividad es alrededor del 24%.

Otros autores como Covacevich y Richards¹⁹ han utilizado los experimentos de electroenfoque para la purificación de la enzima dextranasa de *Pseudomonas* UQM 733; los experimentos de electroenfoque son conducidos a 4°C con una columna analítica LKB 8101 de 110 ml o una columna preparativa LKB 8102 de 440 ml. Para el gradiente de densidad se utiliza D-glucitol (grado R.A.). El foco se conduce con 1% de anfilitos en los rangos de pH de: 3 a 10; 7 a 9; 6 a 8 y de 4 a 6.

TABLA XIV

Procedimiento de purificación de dextranasa de *P. funiculosum*.⁷²

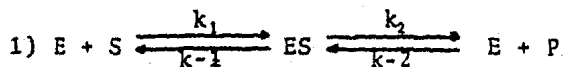
Procedimiento	Actividad total (unidades)	Actividad específica (Unidades/A nm)
Extracción con agua y fraccionamiento con sulfato de amonio (0.3-0.6 stn.) y disuelto en agua.	3984	43
Fraccionamiento con Bio Gel P-60	2643	125
Dializado contra agua y pasado en CM-celulosa.	1468	954
Adsorbido en DEAE-celulosa y eluido por un sistema de gradiente lineal de NaCl (0-0.5M).	1358	964
Dializado contra agua y liofilizado	904	1242
Poco Isoeléctrico.		
dextranasa I	----	1230
Dextranasa II	----	1260

1.2.5 Propiedades de las dextranasas.

1.2.5.1 Cinética.

Las enzimas son proteínas que pueden considerarse como catalizadores biológicos y por tanto siguen las reglas generales de la catálisis. Sin embargo, presentan una característica poco observada en catalizadores no enzimáticos, fenómeno que se conoce como la "saturación del sustrato". En la Fig. 15 se describe el comportamiento que presentan la mayor parte de las enzimas con respecto a la concentración del sustrato; a bajas concentraciones de sustrato se observa una variación lineal con la velocidad inicial aumenta hasta alcanzar un valor constante para cualquier valor de concentración de sustrato. En estas condiciones la reacción es de orden cero y en la zona de transición entre órdenes uno y cero se tiene un orden de reacción fraccionario.^{66 70}

El modelo más simple y más extendido en catálisis enzimática es el modelo de Michaelis-Menten, desarrollado en 1913 tomando en cuenta el fenómeno de saturación antes descrito. La teoría de Michaelis ha sido ampliamente desarrollada para reacciones en las que existe un sólo sustrato y supone la formación de un complejo enzima-sustrato que posteriormente da lugar al producto, regenerando la enzima, según se muestra en las siguientes reacciones:



Desarrollando las ecuaciones de velocidad que implican estas reacciones, suponiendo que se alcanza el régimen estacionario, $d(ES)/dt = 0$, que la reacción que da origen al producto es prácticamente irreversible y que la velocidad de reacción, dada por $v = dP/dt = k_2$, es máxima (V_{max}) cuando la totalidad de la enzima en el medio se encuentra en forma de complejo $V_{max} = X_2(E + ES)$, podemos llegar a la ecuación:

$$2) v = V_{max} \frac{S}{K_M + S} \quad \text{donde } K_M = \frac{k-1 + k_2}{k_1}$$

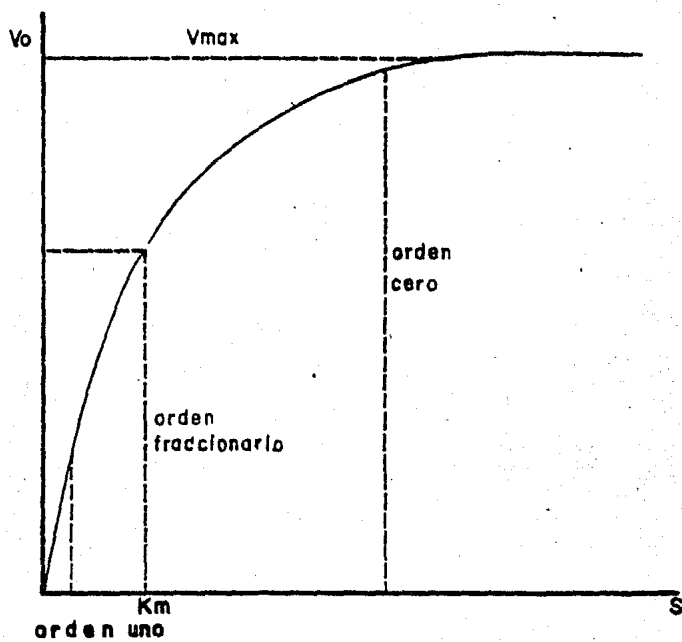


Fig. 15

Descripción gráfica del comportamiento cinético que presentan la mayor parte de las enzimas⁴⁵.

K_m es la constante de Michaelis y equivale a la concentración de sustrato para lo cual la velocidad es la mitad de la máxima. Este parámetro nos da también una idea sobre la afinidad que la enzima tiene por el sustrato en cuestión, pues mientras menor sea su valor, menor será la concentración de sustrato para la cual la enzima alcanza su valor de velocidad máximo y por ende mayor su afinidad^{46 70}

Como toda reacción química, las reacciones enzimáticas se ven afectadas por la temperatura; al fenómeno común de aumento en la velocidad de reacción con aumento de temperatura dada la mayor energía de las moléculas, se sobrepone la desnaturalización de la enzima dado su origen protéico. El resultado global de estas dos interacciones resulta en un perfil con un máximo de velocidad a una temperatura que se ha denominado óptima. La parte correspondiente al efecto cinético puede ser descrito por la Ley de Arrhenius:

$$3) K = A e^{-E_a/RT}$$

donde K es la constante de velocidad de reacción, R la constante general del estado gaseoso, T la temperatura en °K y E_a la energía de activación característica de cada enzima.

En cuanto al pH el comportamiento seguido por las enzimas es similar al descrito para la temperatura; este efecto puede ser debido a tres fenómenos independientes:

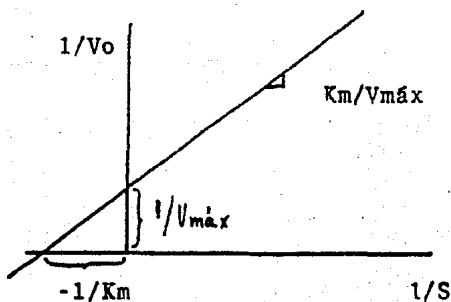
- a) Desnaturalización irreversible de las enzimas a pH extremos debido a la pérdida de su estructura espacial por ruptura de enlaces no covalentes.
- b) Ionización del sustrato si es que posee grupos polares.
- c) Estado de ionización de la enzima.

Es necesario el remarcar que el pH al cual la enzima alcanza su máxima actividad no necesariamente coincide con el pH al cual se observa su máxima estabilidad.

Un estudio cinético para una enzima dada, implica el determinar la variación de la velocidad inicial de reacción para diferentes concentraciones de sustrato, efectuados a las condiciones óptimas de pH y temperatura, para una concentración de enzima dada. La información cinética (K_m y V_{max}) pueden obtenerse directamente de una gráfica tipo Michaelis (V vs S), aunque con bastante frecuencia se emplea alguna de las siguientes modificaciones algebraicas de la ecuación de Michaelis:

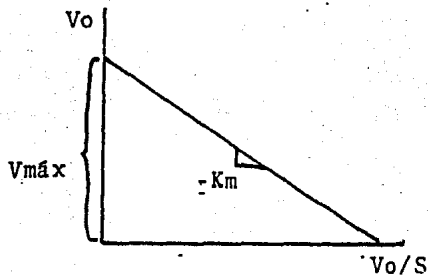
1) Lineweaver Burk.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$



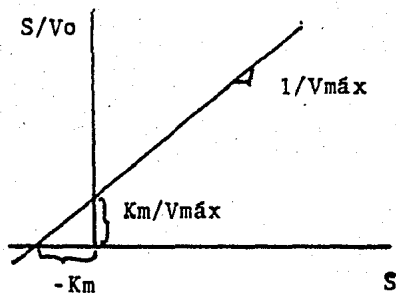
II) Eadie-Hofstee.

$$v = V_{\max} - k_m \frac{v}{S}$$



III) Hanes.

$$\frac{S}{v} = \frac{k_m}{V_{\max}} + \frac{S}{V_{\max}}$$



A continuación se muestran ejemplos de cinéticas de una dextranasa de origen fungal y otra de origen bacteriano.

Dextranasa de origen fungal.- Sugiura et al.⁷⁵ efectuaron estudios cinéticos de dextranasas y observaron el efecto de Co^{2+} en la energía de activación, la constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima de reacción (V_{max}) sobre la dextranasa obtenida de *Penicillium funiculosum*. En presencia y ausencia de Co^{2+} fue calculada la energía de activación a partir de gráficas de Arrhenius. Como se muestra en la Fig. 16, en presencia de Co^{2+} la energía de activación decreció de 9.0×10^3 cal/mol a 5.53×10^3 cal/mol. Con la reacción de dextranasa, fueron también investigados K_m y V_{max} a varias concentraciones de Co^{2+} a partir de gráficas de Lineweaver-Burk. Los resultados son presentados en la Tabla XV:

TABLA XV

Valores de K_m y V_{max} para Dextranasas I y II de *Penicillium funiculosum* a diferentes concentraciones de Co^{2+} ⁷⁵

Concentración de CoCl_2 (M)	V_{max} (μmol como glucosa)	K_m ($\times 10^{-1}$ %)
Ninguna	4.92	2.66
2×10^{-4}	6.50	2.87
Dextranasa I 1×10^{-4}	5.26	2.87
5×10^{-5}	5.21	2.87
2.5×10^{-5}	5.04	2.87
Ninguna	4.76	2.86
2×10	6.42	2.99
Dextranasa II 1×10	5.54	2.99
5×10	5.32	2.97
2.5×10	4.82	2.99

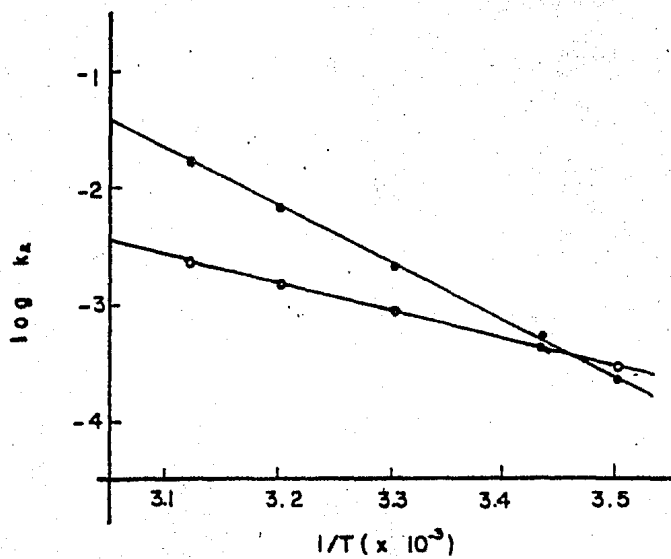


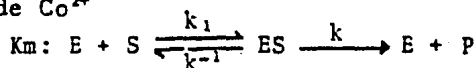
Fig. 16

Gráfica de Arrhenius para la reacción de Dextranasa II de *P. funiculosum* en presencia y ausencia de CoCl_2 ⁷⁵.

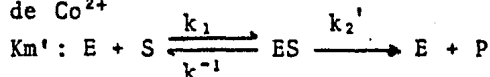
o con CoCl_2 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$); ● Sin CoCl_2 .

Los valores de K_m fueron constantes a varias concentraciones de Co^{2+} ; por otro lado, el valor de V_{max} incrementó con el incremento de concentración de Co^{2+} . A partir de éstos resultados Sugiura et al. proponen las siguientes reacciones.

En ausencia de Co^{2+}



En presencia de Co^{2+}



Las ecuaciones para la velocidad son como siguen:

$$v = \frac{k_2 \cdot e}{\frac{K_m}{s} + 1}$$

$$v_{Co^{++}} = \frac{k_2' \cdot e}{\frac{K_m}{s} + 1}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\frac{1}{v_{Co^{++}}} = \frac{K_m'}{V_{maxCo^{++}}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V_{maxCo^{++}}}$$

donde, e y s son las concentraciones de la enzima y sustrato respectivamente. K_m y K_m' son las constantes de disociación del complejo enzima-sustrato en ausencia y presencia de iones Co^{++} respectivamente.

Los resultados anteriores sugieren que, en la reacción de dextranasa, el Co^{2+} acelera la descomposición del complejo enzima-sustrato en enzima y producto, esto causa el incremento de la constante de velocidad k_2 y por lo tanto la constante k_2'

Dextranasa de origen bacteriano.- (Efecto del P.M. del sustrato). Sugiura e Ito⁷⁷ utilizaron una dextranasa de *Brevibacterium fuscum* para obtener los parámetros cinéticos y observar el efecto del P.M. del sustrato sobre los mismos.

La constante de Michaelis y la velocidad máxima fueron

calculados a partir de gráficas de Lineweaver-Burk como se muestra en la Tabla XVI. Las gráficas fueron lineares con todos los sustratos probados. Con ésta dextranasa los valores de K_m y V_{max} decrecieron con un incremento en el P.M. de dextranas probadas y los valores de K_m fueron de 0.067% a 0.041% y los valores de V_{max} . $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot. fueron de 76 a 128. Lo anterior nos indica que la dextranasa tiene mayor afinidad por las de P.M. menor.

TABLA XVI

Efecto del sustrato sobre K_m y V_{max} de la dextranasa de *B. fuscum* ⁷⁷.

Peso molecular Dextrana	K_m (%)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot.)
1.4×10^4	0.0665	128
5.3×10^4	0.0625	102
1.06×10^5	0.0575	89
1.0×10^6	0.0435	78
1.0×10^7	0.0405	76

1.2.5.2 pH y Temperatura.

Como se mencionó anteriormente, para efectuar un estudio cinético de cualquier enzima éste se debe hacer tomando en cuenta el pH y temperatura óptimos y así determinar correctamente la cinética. Para que se determine tanto el pH como la temperatura óptimos de la enzima, se tienen que realizar experimentos donde se varíen estos parámetros respectivamente y se tenga constante tanto la concentración de enzima como la de sustrato, siguiendo la reacción a intervalos determinados midiendo la evolución de la reacción enzimática por el método más adecuado. En la Tabla XVII se presenta una lista de algunas dextranasas y sus valores de pH y temperatura óptimos.

TABLA XVII

Valores de pH y temperatura óptimos de algunas dextranasas.

<u>Dextranasa</u> <u>(Microorganismo)</u>	<u>pH</u> <u>óptimo</u>	<u>Temperatura</u> <u>óptima (°C)</u>
<i>F. moniliforme</i> ⁶⁵	5.5	55
<i>A. carneus</i> ³³	5.0 - 5.5	60
<i>L. bifidus</i> ⁶	5.5 - 6.5	41 - 50
<i>P. funiculosum</i> ⁷⁶	6.0	37
<i>B. fuscum</i> ⁷⁶	7.0 - 7.5	55

1.2.5.3 Composición de aminoácidos.

El contenido de aminoácidos en una enzima es diferente aún tratándose del mismo tipo de enzima pero de diversos orígenes. Por ejemplo la composición de aminoácidos de las dextranasas de *B. fuscum* y *P. funiculosum* difieren significativamente, según los estudios de Sugiura e Ito⁷⁶ quienes determinaron el contenido de aminoácidos de estas dos enzimas de la siguiente manera: la enzima pura y liofilizada fue hidrolizada con HCl 6N y preparada para un análisis de aminoácidos del cual, los resultados se presentan en la Tabla XVIII. El peso molecular de la dextranasa de *B. fuscum* y de *P. funiculosum* es de 5.5×10^4 y de 4.4×10^4 , respectivamente, encontrándose se que la enzima está compuesta de más de 429 residuos de aminoácidos de 17 aminoácidos y que la última contiene más de 349 residuos de 18 aminoácidos. La composición de aminoácidos es muy similar, excepto por la cistina. Esta es una diferencia particular ya que en la dextranasa de *P. funiculosum* se encuentran 2 residuos por mol de enzima, no encontrándose residuo alguno en la dextranasa de *B. fuscum*.

1.2.5.4 Fracción de carbohidratos.

Siguiendo el estudio sobre dextranasas, Sugiura e Ito⁷⁶

TABLA XVIII

Composición de aminoácidos de las dextranasas de *B. fuscum* y de *P. funiculosum*.⁷⁶

Aminoácido	Fuente de la dextranasa	
	<i>B. fuscum</i>	<i>P. funiculosum</i>
	(No. de residuos/mol) P.M.5.5 x 10 ⁴	(No. de residuos/mol) P.M.4.4 x 10 ⁴
Asp a)	54	41
Thr b)	33	26
Ser b)	34	33
Glu a)	42	25
Pro a)	22	21
Gly a)	32	29
Ala a)	25	20
Cys c)	0	2
Val d)	32	25
Met d)	12	10
Ileu d)	20	25
Leu a)	20	15
Tyr a,e)	22	17
Phe a)	16	17
Lys a)	25	12
His a)	12	8
Arg a)	12	9
Try f)	16	11

- a) valores promedio de los hidrolizados de 24,30 y 48 h
 b) valores extrapolados al tiempo cero de hidrólisis
 c) determinación colorimétrica con DTNB
 d) fueron adoptados los valores máximos
 e) determinados espectrofotométricamente
 f) determinados con el método de p-dimetilaminobenzaldehido

realizaron también la determinación de azúcares en las dextranasas de *B. fuscum* y *P. funiculosum*. Los azúcares neutros contenidos en la enzima fueron estimados por el método de fenol-H₂SO₄ ²⁰ y la glucosamina fue también determinada por el procedimiento de Elson Morgan ¹⁴. El contenido de azúcares de ambas dextranasas, es presentado en la Tabla XIX.

TABLA XIX

Cuantificación del contenido de azúcares de las dextranasas de *B. fuscum* y de *P. funiculosum*. ⁷⁶

Método analítico	Fuente de la Dextranasa	
	<i>B. fuscum</i> equivalente mol/mol (P.M. 5.5 x 10 ⁴)	<i>P. funiculosum</i> equivalente mol/mol (P.M. 4.4 x 10 ⁴)
Fenol-H ₂ SO ₄ a)	10.9	10.1
Elson-Morgan b)	3.1	1.1

a) contenido de azúcares neutros como equivalente de glucosa

b) Contenido de azúcares aminados como equivalentes de glucosamina.

Se encontró que la dextranasa de *B. fuscum* contiene 11 moles de azúcares neutros como glucosa y 3 moles de azúcares aminados como glucosamina por una mol de enzima; en la dextranasa de *P. funiculosum* la primera fue de 10 moles y la última fue de una mol.

1.2.5.5 Peso molecular.

para la determinación del Peso Molecular de la dextranasa, Sugiura e Ito, Simonson et al y Sugiura et al ^{76 65 72} utilizaron la técnica de filtración en gel. Simonson et al ⁶⁵ realizaron el siguiente experimento.

Para estimar el P.M. de la dextranasa de *Fusarium moniliforme* se utilizó una columna (1.5 x 85 cm) de BioGel P-150 (Bio-Rad) y una solución amortiguadora de elución, de fosfato de sodio 0.05M y NaCl 0.1M, pH 6.0 Una muestra de 0.5 ml

se somete a cromatografía a una velocidad de flujo de 0.25 a 0.30 ml/min, utilizando dextransa azul (Farmacia) para determinar el volumen muerto y colectando fracciones de 3.0 ml a 4°C.

La columna se calibra con estándares de proteínas teniendo los siguientes pesos moleculares: albúmina sérica bovina (Armour) 67,000; ovoalbúmina (Miles) 45,000; pepsina (Mann) 35,000 y ribonucleasa A (Mann) 13,700. Es por este método que se asigna un peso molecular de 39,000 a la dextransa de *F. moniliforme* (Fig. 17).

En las Fig. 18 y 19 se muestran las gráficas de otras determinaciones de P.M. para diferentes dextransas, obteniéndose de ellas un P.M. para la dextransa de *P. funiculosum* de 44,000⁷⁶ y en la otra para las dextransas de *B. fuscum* y de *P. funiculosum* también, de 55,000 y de 44,000 respectivamente⁷².

1.2.5.6 Punto Isoeléctrico.

Para determinar el punto isoelectrico de las enzimas, se utilizan experimentos de electroenfoque. Sugiura e Ito⁷² determinaron el punto isoelectrico de la dextransa de *B. fuscum*, llevando a cabo un experimento de electroenfoque por 48 horas con un potencial de 700 V a 4°C, obteniéndose un pI de 4.17 para esta dextransa.

Hiraoka et al³⁴ reportan los puntos isoelectricos de las dextransas de *Aspergillus carneus* y de *P. luteum* como 4.12 y 4.1 respectivamente. Estos valores son similares a los reportados por Sugiura e Ito⁷⁶ para la dextransa de *B. fuscum* (pI 4.17) y de las dextransas I y II de *P. funiculosum* (3.98 y 4.19 respectivamente).

1.2.6 Inmovilización de enzimas.

La alternativa de limitar la acción de las enzimas a un

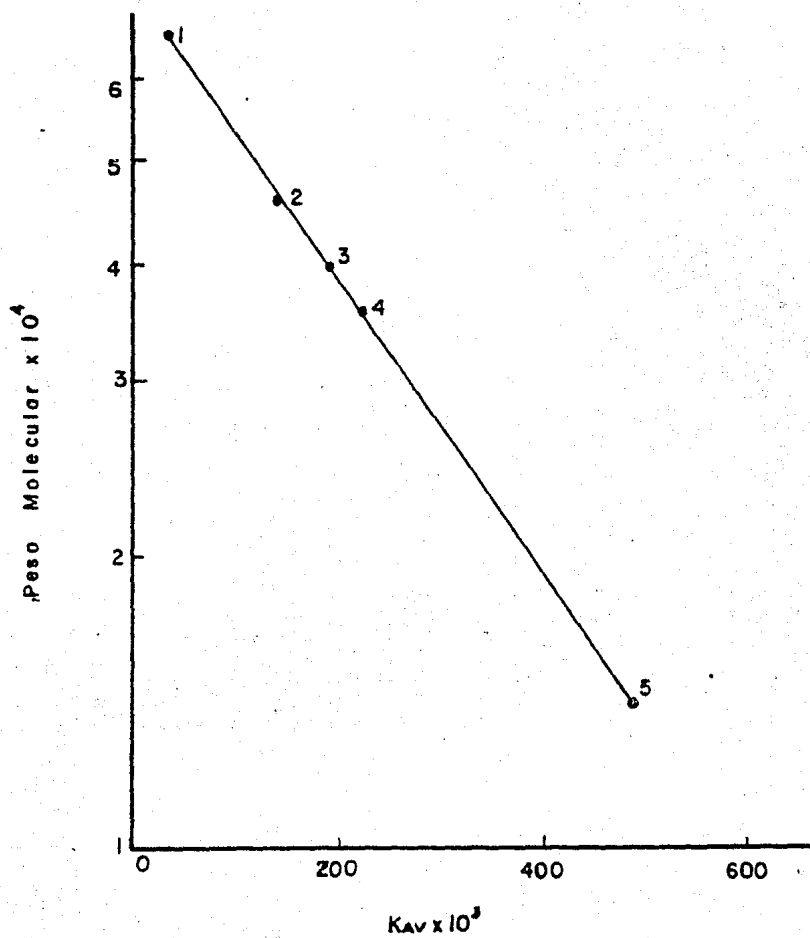


Fig. 17

Determinación del P.M. de la dextranasa de *F. moniliforme* por permeación en gel en BioGel P-150⁶⁵.

(1) albúmina sérica bovina; (2) ovoalbúmina; (3) dextranasa de *F. moniliforme*; (4) pepsina; (5) ribonucleasa A.

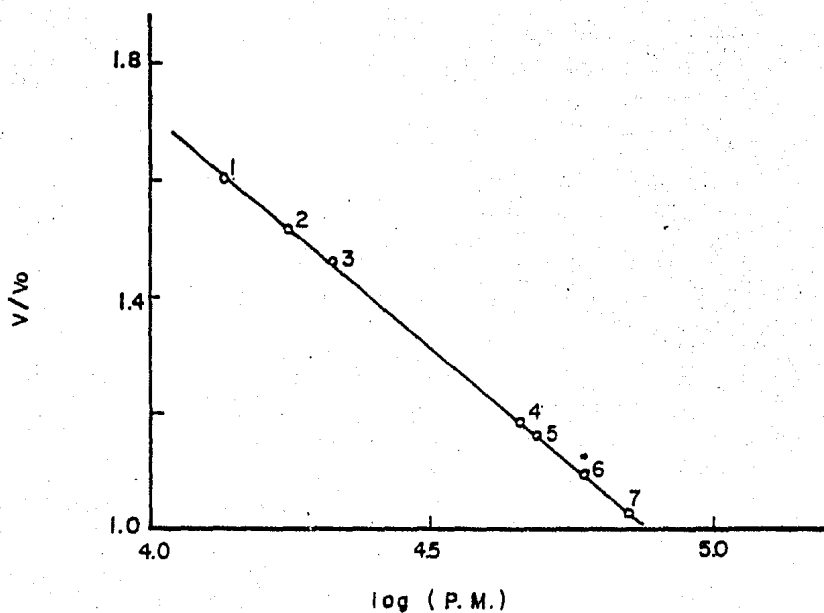


Fig. 18

Determinación del P.M. de dextranasas de *P. funiculosum* y de *B. fuscum* por filtración en gel sobre BioGel P-100⁷⁶.

- 1, citocromo C (P.M. 1.3×10^4) ; 2, mioglobina (P.M. 1.79×10^4) ;
 3, α -quimotripsina (P.M. 2.2×10^4) ; 4, dextranasas I y II de *P. funiculosum* ;
 5, ovoalbúmina (P.M. 4.5×10^4) ; 6, dextranasa de *B. fuscum* ;
 7, albúmina sérica bovina (P.M. 6.9×10^4).

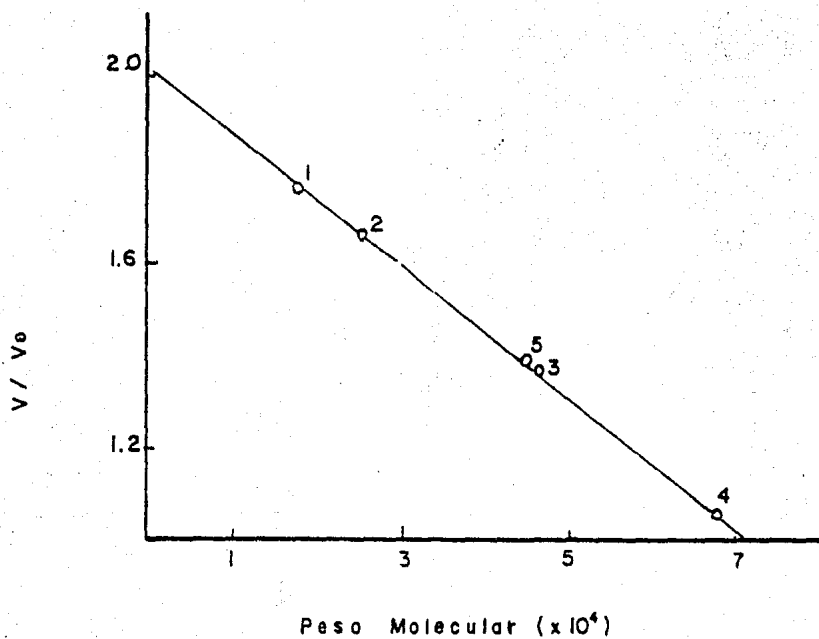


Fig. 19

Determinación del P.M. de dextranasas I y II de *P. funiculosum* por filtración en gel en BioGel P-60⁷².

- (1) mioglobina (P.M. 18,400) ; (2) α -quimotripsina (P.M. 20,000) ;
 (3) ovoalbúmina (P.M. 15,000) ; (4) albúmina sérica bovina (P.M. 69,000) ;
 (5) dextranasas I y II.

estado inmovilizado ha atraído el interés de numerosos centros de investigación e industrias, pues la posibilidad de utilizarlas con mayor eficiencia y de operar sistemas continuos ofrece ventajas no sólo económicas, sino también de simplificación de los procesos.

Las últimas dos décadas han sido prolíficas en lo que a reportes científicos se refiere, lo que abarcan desde la producción, la recuperación, la purificación y la inmovilización de enzimas, y el diseño global de los procesos. Para finales de los años sesenta se hablaba ya de procesos comerciales, tanto para la hidrólisis de la penicilina como para la isomerización de la glucosa. En la siguiente década existían seis tipos de isomerasas y dos de penicilina amidasa, incluyendo además la aspartasa, la aminociclase, la fumarasa y lactasa.²⁷

Hoy en día los procesos que emplean enzimas inmovilizadas se han incrementado; sin embargo representan aún un pequeño porcentaje en comparación con el número de procesos en los que se emplean enzimas solubles.²⁷

Algunas enzimas se comercializan ya en forma inmovilizada como es el caso de la glucosa isomerasa de *Actinoplanes missouriensis*, atrapada en gelatina de Gist Brocades; la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, atrapada en polianilina de Sigma, etc.²⁷

La dextranasa inmovilizada tiene una aplicación potencial en la industria alimenticia como en la preparación de jarabes glucosados y es también una enzima de importancia biomédica.⁵⁸

Ramesh y Singh⁵⁸ describen la inmovilización de una dextranasa bacteriana (Beckman Labs.) en un soporte inorgánico como vidrio de zirconio cubierto de alquilamina por un método

simple de acoplamiento con glutaraldehído.

En general, los soportes inorgánicos no son sujetos al ataque microbiano y el soporte no tiene cambio de configuración sobre un rango extenso de pH o bajo condiciones de varios solventes. Por otro lado, son más fáciles de usar en sistemas continuos y las preparaciones enzimáticas que se obtienen no son caras, son de fácil manufactura y poseen una larga vida de trabajo.

De acuerdo a Weetall,^{8b} la inmovilización se lleva a cabo de la siguiente manera: se activa 1 g de vidrio de zirconio cubierto de alquilamina por la adición de 10 ml de glutaraldehído al 2.5% con agitación por una hora y el exceso de glutaraldehído se lava con agua. Se agregan 100 mg de dextranasa bacteriana en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 (0.05M) a 1 g del soporte activado y se incuba toda la noche a 4°C para acoplamiento. Al final, la enzima no enlazada se lava con solución amortiguadora de acetatos pH 5.4 (0.05M) hasta que no pueda ser detectada actividad enzimática en la solución de lavado y la enzima inmovilizada se almacena en la misma solución amortiguadora a 4°C. Para uso en experimentos posteriores la enzima inmovilizada se seca al aire.

En la Tabla XX se muestra que se obtuvo un alto rendimiento de conjugación de 18 mg/g de soporte para la dextranasa inmovilizada por el método anterior. La enzima retiene 62% de la actividad inicial después de la conjugación y por lo tanto la pérdida de actividad es del 38%. Estos tres últimos parámetros indican que el soporte es aceptable para dextranasa.

La constante de Michaelis K_m , para la enzima inmovilizada decreció de 0.60% a 0.40% indicando un incremento significativo en la afinidad del enlace de dextranasa para su sustrato (dextrana), además de que no se muestra alteración en el valor de V_{max} (Tabla XX). En el presente caso la energía de

TABLA XX

Parámetros cinéticos de una dextranasa bacteriana soluble y otra conjugada con alquilamina.⁵⁸

Parámetro	Dextranasa soluble	Dextranasa conjugada con alquilamina.
1. Rendimiento de conjugación.	--	18 mg/g de soporte
2. Pérdida en la actividad específica después de la conjugación.	--	38%
3. Actividad específica retenida.	--	62%
4. Km	0.60%	0.40%
5. Vmax (μ moles de glucosa/min/1)	620	616
6. pH óptimo	5.4	5.2-6.2 (plateau)
7. Ea (calorías)	9,000	6,500
8. Temperatura óptima	35°C	50°C
9. Estabilidad térmica	Estable arriba de 50°C por 1 hora	Estable arriba de 60°C por 1 hora
10. Estabilidad	--	Altamente activa si se almacena a 4°C después de 20 días. Ocurre pérdida completa de actividad a 37°C en 8 días.
11. Vida media	--	5 días a 37°C
12. pI (suramin)	4.3	4.3

Km y Vmax fueron determinados de las gráficas de Lineweaver-Burk, graficando $1/V$ vs $1/T$. pI se determinó por el método de Wills. Las dos soluciones amortiguadoras usadas para los estudios del efecto del pH fueron: acetatos (0.05M) (pH 3.6-5.6) y fosfatos (0.05M) (pH 5.7-6.6). Las condiciones experimentales se dan en el texto en Materiales y Métodos.

activación (E_a) de la dextranasa inmovilizada, exhibe un decline comparado con la enzima soluble (9000 a 6500 calorías) indicando un incremento en estabilidad y eficiencia de la enzima después de la conjugación. Se incrementa también la estabilidad térmica al inmovilizar la enzima y la actividad de la enzima conjugada se da a valores de pH mayores que los de la enzima soluble.

Sugiura e Ito⁷⁴ utilizaron sefarosa 4B activada con BrCN para la inmovilización de dextranasa de *P. funiculosum*. La actividad obtenida de la dextranasa inmovilizada fue de un 30% con respecto a la enzima nativa. No se observó cambio en los valores de pH y temperatura óptimos, aunque sí se incrementa la estabilidad térmica (de 40°C a 55°C). La inmovilización ocasiona también un incremento en el valor de la K_m de 2 a 5 veces con respecto a la dextranasa nativa.

Por otro lado, Smiley et al⁶⁷ inmovilizaron dextranasas de *P. funiculosum* y *P. lilacinum* en sílica-silanizada porosa y una resina de fenol-formaldehído. Una dextrana comercial de P.M. relativamente bajo (aprox. 2×10^6) se degradó por la dextranasa inmovilizada, con la formación de azúcares reductores, pero con un pequeño decremento en viscosidad. En contraste, la dextranasa soluble causó una rápida pérdida de viscosidad pero solo un suave incremento en azúcares reductores. Una dextrana nativa de alto peso molecular de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 fue atacada muy suavemente por la dextranasa inmovilizada con el desprendimiento de oligosacáridos de bajo peso molecular.

CAPITULO II

APLICACIONES

II.1 Dextranasas.

Industria azucarera.- Como se mencionó con anterioridad, las dextranas son la causa de diversos problemas cuando son sintetizadas en el jugo de caña de azúcar. El microorganismo que comunmente se localiza en la caña de azúcar, con capacidad para producir dextranas mediante la acción de la enzima dextran-sacarasa es *Leuconostoc mesenteroides*, el cual infecta a la caña de azúcar quemada y recién cortada, rápidamente (después de 2 h de almacenamiento) para producir dextranas. La infección se ha localizado 6 pulgadas arriba del extremo cortado y las dextranas producidas pasan al jugo cuando se realiza la molienda⁵³. Conforme transcurre el tiempo el problema se agrava, pues al haber presencia en el jugo tanto de enzima como de sacarosa, la síntesis continúa.

Además de los problemas de pérdida de sacarosa, las dextranas ocasionan un incremento en la viscosidad del jugo, lo que da como resultado una baja en el punto de ebullición, clarificación pobre y alargamiento de los cristales de azúcar, dañando así el proceso de refinación⁵². Se ha propuesto el uso de dextranasa para el tratamiento del jugo de caña de azúcar y el jugo de remolacha⁵⁵ contaminados con dextrana.

Tilbury⁸³ produjo dextranasa con *P. funiculosum*. Primero cultivó *L. mesenteroides* en un medio de azúcar para producir la dextrana y después remueve el *Leuconostoc* e inocula el cultivo con *Penicillium*. El medio inoculado se mantiene a pH 5.5 - 7.0 y a una temperatura de aproximadamente 30°C durante 4-5 días. La dextranasa obtenida por filtración del cultivo, se disuelve en una solución amortiguadora de acetatos a pH 5.3 adicionando el jugo de caña de azúcar (conteniendo dex-

trana) previamente calentado y adicionado de cal, dejando la mezcla a 40°C para tomar muestras diferentes tiempos; la dextrana residual se determina para cada uno de los tiempos. El nivel de dextrana inicial se expresa como °Brix. Los resultados de algunas pruebas se reportan en la Tabla XXI. En otro experimento, se adicionan 3 UI de dextranasa de *P. funiculosum* a 100 ml de jugo mezclado a pH 5.4 y 32°C con 0.4 °Brix. El jugo se mantiene a 40°C durante 20 min. Se encontró que el 68% de la dextrana se degrada primeramente a isomaltosa e isomaltotriosa. El jugo de caña se sujeta después a un calentamiento convencional, adición de cal, clarificación, evaporación y cristalización para producir un azúcar crudo. La viscosidad específica del jugo se redujo a 0.024 cp. inmediatamente después del calentamiento y adición de cal comparado con 0.110 cp. de un control corrido sin la adición de dextranasa. Los productos de degradación de la dextrana se reportan como remanentes con las melazas después de la cristalización de sacarosa.

Sector salud.- Mencionado ya el problema que causan las dextranas en éste sector, las dextranasas pueden ser utilizadas para reducir la caries dental, al remover la capa de dextrana que se forma en los dientes por la acción de varios microorganismos de la flora bucal y por lo tanto, los residuos alimenticios no tendrán soporte alguno para adherirse a los dientes⁶⁵. Para este caso, se pueden realizar aplicaciones periódicas de dextranasa (p. ej. en pastas dentales)⁶³. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de algunos microorganismos productores de dextranasa en la placa dental humana, ayudando a eliminar el problema⁶³.

Se ha propuesto también el uso de dextranasa para la producción controlada de dextranas de bajo peso molecular, tal es el caso de las dextranas clínicas⁶⁵. Por otro lado, la dextrana clínica se produce a nivel industrial por síntesis enzimática (dextransacarasa de *L. mesenteroides* seguida de

hidrólisis ácida para obtener la dextrana de bajo peso molecular.¹³

Por otro lado, se ha estudiado el uso de materiales enzimáticos de *Penicillium lilacinum* (dextranasa) para obtener dextrana clínica por hidrólisis del caldo de fermentación de *L. mesenteroides* NRRL B-512⁵⁷. El procedimiento seguido para la obtención de la dextrana clínica por el método anterior es el siguiente: el contenido del tanque de fermentación conteniendo el caldo fermentado por la dextran-sacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512 se calienta a 80°C, enfriando después a 23°C. El pH se ajusta a 6.0, agregando enseguida 80 unidades de enzima por litro de medio de fermentación. La mezcla se agita hasta que la viscosidad relativa llega a 2.4 cp. Se agrega ácido a la mezcla de reacción hasta un pH de 2.5 y se eleva la temperatura a 40°C a fin de inactivar la enzima. El pH se ajusta a 6.0 y la mezcla se fracciona con alcohol. La dextrana clínica producida por este método cumple con las directrices de la Food and Drug Administration y se ha usado clínicamente.

Las dextranas clínicas se presentan en forma de polvos blancos amorfos y son empleados en soluciones de dextrosa del 9 al 10% o en soluciones isotónicas de cloruro de sodio y esterilizadas en autoclave antes de la inyección¹. Las preparaciones comerciales son caracterizadas por su peso molecular, siendo éstos de:

40,000 para la dextrana 40 (Dextran 40)

70,000 para la dextrana 70 (Dextran 70)

etc...

Las propiedades terapéuticas de la dextrana están ligadas a su carácter coloidal en solución. Su mecanismo de acción es esencialmente no específico y produce los siguientes efectos¹:

-TABLA XXI

Degradación de dextrana contenida en jugo de caña de azúcar por dextranasa de *P. funiculosum*.⁵⁹

Cantidad inicial de dextrana (°Brix)	Dextranasa adicional (UI/100ml)	Periodo de incubación (min)	Dextrana removida (%)
1.440	30	30	78.9
1.260	30	30	69.8
0.807	30	30	88.1
0.500	30	30	98.2
2.020	30	15	74.7
0.882	30	15	91.0
0.556	30	15	82.4
0.230	30	15	100.0
0.796	12	15	81.3
0.676	12	15	65.3
0.654	12	10	73.0
0.476	12	10	69.0
0.672	3	20	69.2
0.510	3	20	100.0
0.672	3	10	62.5
0.510	3	10	87.2

efectos:⁸¹

- a) Aumento en el volumen plasmático.- Esta es la propiedad principal de la dextrana que permite retener el agua en el sistema vascular y asegurar así un incremento en el volumen plasmático, por lo cual, se indica en las hipobolemias de diversa etiología.

- b) Mejoramiento de la circulación periférica.- Al aumentar el volumen plasmático, la dextrana disminuye la viscosidad sanguínea y mejora la circulación general. Esto resulta de una disgregación de células sanguíneas que obstaculizan la microcirculación periférica, originando estados de choque y traumatismos. Se ha probado clínicamente un efecto terapéutico sobre las escamas de las extremidades debidas al colágeno¹¹, el efecto investigado es producido por la dextrana 40 así como por la proporción de dextrana 70. Para beneficiar estos dos efectos, L. Thoren⁸¹ propone la terapéutica siguiente: cuando el objetivo principal es restaurar un volumen plasmático normal, se procederá a la inyección de dextrana 70 asociada a las células sanguíneas concentradas, con el objeto de mantener la hemodilución cuando el volumen plasmático regrese a lo normal y si persiste una mala circulación periférica se utilizará la dextrana 40 a vasodilatadores.

- c) Efecto antitrombótico.- La dextrana se indica en la profilaxis de trombosis de venas profundas y de la embolia pulmonar. Su mecanismo de acción es doble, no específico (aumento del volumen plasmático) y específico, debido a un efecto sobre el factor VIII interviniendo el mecanismo de la coagulación.

Aunque es menos eficaz que la heparina y las anti-vitamina K, su empleo es más frecuente porque no provoca hemorragias. Pero la dextrana clínica como todo medicamento, tiene efectos

colaterales:

- La dextrana 40 rápidamente excretada provoca en las células de los túbulos distales y proximales una nefrosis osmótica con una antidiuresis pudiendo ser grave en los sujetos con insuficiencia renal o deshidratación.¹¹
- La dextrana induce reacciones alérgicas produciendo erupción cutánea benigna al choque enfiláctico con paro cardíaco o respiratorio. Se sitúa a 100,000 el peso molecular mínimo que puede provocar una reacción anafiláctica y el riesgo aumenta con el aumento del peso molecular de la dextrana.¹²

Lo anterior muestra la importancia de tener preparaciones de dextrana presentando una distribución de peso molecular bien establecida, a fin de situarlas en la zona terapéutica investigada y evitar la aparición de reacciones colaterales.

Dextranas sustituidas o acomplejadas.-

- i) Fe-dextrana.- Es un complejo de hidróxido férrico y de dextrana de bajo peso molecular (5000 a 7500). Se indica en el tratamiento de la carencia de fierro en medicina humana o veterinaria y se administra por vía oral o parenteral.
- ii) Sulfato-dextrana.- Este derivado contiene de 15 a 17% de azufre complejo a dextranas de peso molecular comprendido entre 8,000 y 40,000 se utilizan como hipolipidemiantes y en la terapéutica de úlceras pépticas.
- iii) Dietilaminoetil-dextrana.- Este producto se prepara a partir de dextranas de peso molecular aproximado de 500,000 es igualmente empleada para reducir la absorción de lípidos y ha sido objeto de estudios como

coadyuvante en vacunas.

La dextrana y sus derivados han sido objeto de numerosos trabajos, principalmente en inmunología, pero no se aplican en casos donde la información no es concreta.

II.2 Otras enzimas que pueden actuar sobre los mismos sustratos que las dextranasas.

Kobayashi y Matsuda⁴² reportan que la glucoamilasa (α -1,4-glucoan hidrolasa, EC 3.2.1.3), la cual cataliza rápidamente la remoción de grupos α -1,3 ó α -1,6 también como malto-oligosacáridos. Esta enzima se ha utilizado tentativamente en algunos casos como una exo-dextranasa.

La actividad exo-dextranasa de la enzima, es medida por Kobayashi y Matsuda⁴² mediante incubación de una alícuota de 0.5 ml de glucoamilasa (*Rhizopus niveus*, cristalizada; Sukagaku Kogyo Co.; 4.0 unidades/0.17 mg de proteína) con 0.5 ml de una solución al 1% de varias dextranas en solución amortiguadora de acetatos (pH 5.2) a 40°C. Por el mismo método reportado para dextranas, la glucoamilasa se incuba con almidón de papa (0.1% en solución amortiguadora de acetatos 0.02M). Después de la incubación, la reacción se detiene por calentamiento a 100°C durante 5 minutos. La cantidad de glucosa producida se determina por el método de Nelson-Somogyi⁴² y el de glucosa-oxidasa (Glucosa B-Test; Wako Pure Chemical Industries).

Como se muestra en la Fig. 20, la reacción a 55°C, alcanza un máximo en 4 o 8 horas y el grado de hidrólisis (D.H.) de la dextrana clínica y del almidón de papa es de 2.5% y 64% respectivamente. Cuando la incubación se lleva de 16.3% a 24 horas de incubación (Tabla XXII), por el contrario, en las mismas condiciones, la digestión con una endodextranasa típica de *Chaetomium gracile* es elevada en series de oligosacáridos con enlaces α -1,6, mostrando un D.H. de 21.5%.

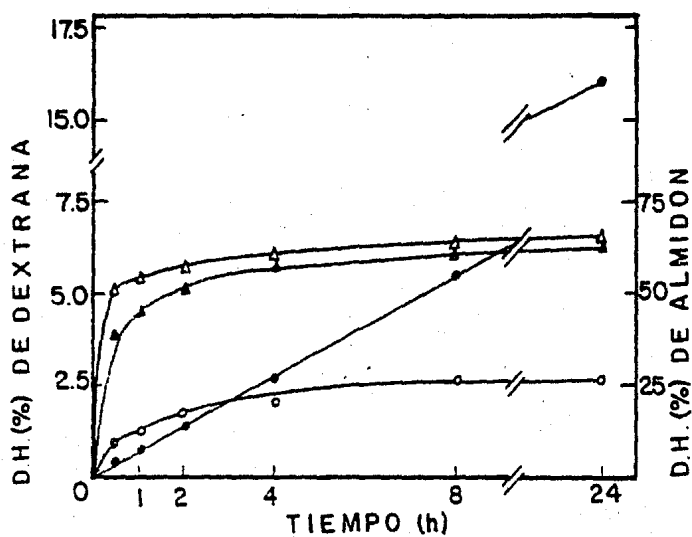


Fig. 20

Acción de la glucoamilasa sobre dextrana clínica y almidón de papa⁴². La dextrana clínica (0.5% p/v) y almidón de papa (0.05% p/v) son hidrolizados con la glucoamilasa.

- hidrólisis de dextrana a 40°C ; ○ hidrólisis de dextrana a 55°C ;
- ▲ hidrólisis de almidón de papa a 40°C ; △ hidrólisis de almidón de papa a 55°C.

De estos resultados, es claramente demostrable que la preparación comercial de glucoamilasa puede ser usada para remover residuos de D-glucosa de las terminaciones no reducidas de las dextranas. La Tabla XXII muestra la susceptibilidad de varias dextranas a la glucoamilasa por incubación prolongada. Aunque la glucoamilasa puede atacar enlaces α -1,6 y α -1,3, puede tener problemas de hidrólisis sobre dextranas ramificadas pues los enlaces α -1,4, α -1,2 y α -1,3 de los puntos de ramificación de las dextranas, pueden ser una barrera para la enzima.

II.3 Características de productos comerciales.

Para hacer un buen uso de cualquier enzima, es importante conocer sus características, a continuación se presentan las características de 2 dextranasas utilizadas industrialmente:

a) Dextranasa distribuida por ENMEX, S.A. de C.V.^{2,3}

Dextranasa DL	<i>Chaetomium gracile</i> var.
Actividad	22,000 DU/ml
Presentación	líquido no viscoso
Color	ligeramente anaranjado
Solubilidad	completamente soluble en agua

TABLA XXII

Susceptibilidad de varias dextranas a la glucoamilasa^{4,2}.

Dextrana	Enlace α -1,6 (%)	D.H. (% como glucosa) a)	
		24 h	168 h
Cepa B-1299	51	0.1	0.1
Cepa B-1307	88	0.4	0.4
T-110 ^{b)}	95	13.4	27.9
Clínica ^{c)}	95	16.3	32.1
T-40 ^{b)}	95	16.4	24.5

a) Cada dextrana (0.5% p/v, en sol. amortiguadora de acetatos 0.02M, pH 5.2) se hidroliza a 40°C durante 24 y 168 h.

b) Farmacia Co.

c) Meito Sangyo Co.

pH óptimo (uso)	4.0 - 7.0
Tem. óptima (uso)	65°C máx.

Beneficios:

1. Hidroliza las gomas reduciendo considerablemente la viscosidad del jugo de caña.
2. Elimina problemas de turbiedad en jugos clarificados y evita ensuciamiento acelerado de los filtros de cachaza.
3. Incrementa el tiempo de corrida de los evaporadores.
4. Evita problemas por elongación de cristales.
5. Mantiene las centrifugas dentro de los límites óptimos de operación.
6. Evita pérdida de sacarosa, incrementando la recuperación hasta en un 4%.

b) Dextrana nativa de origen fúngico⁵⁶

Rango de pH óptimo	5.3 - 5.8
Rango de Temp. óptima	55-60°C
Pérdida de actividad/min a 55°C	3.0%
Pérdida de actividad/decena a 25°C	19.8%
Residual microbiano viable	

Lugares y condiciones para la aplicación.

Ingeniería de crudos: en tanquería de Meladura, Mieles A y B, reduciendo a 55 - 60°C y con agitación, cuando el jugo mezclado tenga 0.35°Brix de goma o más.

Refinerías: en el derretido de azúcar afinado a crudo, usando agua a 55 - 60°C cuando éstas procedan de jugos mezclados con las características anteriores y no se haya tratado en crudos.

Dosis y formas de aplicación.

En tanquerías de Meladura y Mieles A con agitación mediante aire, en dilución de 1:2 a 1:3 a razón de 39.2 a 52.5 Kg/1000 TM de caña (45 a 60 litros/100 000 abs) para ingenios de crudos.

En refinería de 50 a 90 Kg/100 TM de azúcar crudo o afinada a procesar, en diluciones similares y dosificado de forma continua en el tanque de derretido.

Resultados:

Remoción de gomas de crudos	68.0%
Remoción de gomas de refinería	56.0%
Reducción de purezas de mieles finales entre 35.0 y 34.4%	5.5%
Reducción cuando están entre 38.2 y 42.8%	7.5%
Aumento del °Brix de licores de refinería	3.6%
Reducción de agua de lavado en masas B en crudo	51.8%

Recomendaciones:

Para la obtención de los mejores resultados, las cantidades a emplear de esta enzima nativa por día, se dividirá en tres partes iguales, uno por cada turno de 8 horas que se prepara de un turno para otro, aplicándose como se ha indicado, evitando subdosis y sobredosis que promedian, al parecer, correcta aplicación y sin embargo, en el proceso se detectan altas y bajas, debido a estos problemas sencillos de malas operaciones.

CAPITULO III

C O N C L U S I O N E S

En el presente trabajo se han revisado las características bioquímicas, la producción, la purificación y las aplicaciones de la enzima dextranasa. Esta enzima es actualmente producida a nivel industrial, aunque su mercado es limitado a la industria azucarera y en algunos casos en el sector salud. Es en este último, donde es posible que nuevas aplicaciones derivadas de la producción de dextranasas de peso molecular específico, permitan una mayor participación de las dextranasas en el mercado de las enzimas microbianas.

Para la producción de dextranasa, las características y altos rendimientos obtenidos con el hongo *Penicillium funiculosum* son las causas por las que se ha preferido este microorganismo para la producción industrial.

La dextrana es el principal componente del medio de cultivo para la producción de la enzima, ya que actúa como inductor. Diversas fuentes de nitrógeno, magnesio, fósforo y sales minerales, son empleadas (en cantidad y calidad) dependiendo de las necesidades del microorganismo. La mayor parte de las dextranasas son extracelulares, aunque se han reportado algunas intracelulares, requiriendo éstas últimas de operaciones de recuperación más complejas. Esta es otra de las causas por las que, a nivel industrial, se emplea *P. funiculosum*, al excretar la enzima durante el crecimiento.

Para la purificación de dextranasa, los métodos más reportados son: el desalado (salting-out), la diálisis y la cromatografía (en diferentes soportes). Por lo general se utilizan combinaciones de éstos métodos y en ocasiones se requiere de la repetición de alguno de ellos. Estas técnicas han sido empleadas fundamentalmente con fines de caracterización bio-

química de la enzima, pues la producción industrial no requiere de preparaciones de alta pureza.

La dextranasa actúa principalmente sobre los enlaces glucosídicos α -1,6 de la dextrana, dando como resultado oligosacáridos de varios tamaños (aunque predominantemente isomaltosa e isomaltotriosa) los cuales, al continuar la reacción son hidrolizados a partir primeramente al 2o. y posteriormente del 3er. enlace glucosídico, de las terminaciones no reducidas de la cadena, dando como resultado oligosacáridos más pequeños y en algunas ocasiones también D-glucosa.

La capacidad hidrolítica de las dextranasas, a través de mecanismo endo y exo, es la propiedad que ha permitido su aplicación en la industria azucarera para la remoción de las frecuentes contaminaciones con dextrana que se presentan en el jugo de caña de azúcar. Es conveniente señalar que ésta aplicación, aunque eficiente, no representa una solución real al problema, pues la pérdida de sacarosa es irreversible y tan solo se evitan los problemas inherentes a la presencia de gomas en el jugo (alta viscosidad, taponamiento de tubería, etc.).

En el sector salud, el panorama resulta más amplio. En efecto, existen en la actualidad dentríficos formulados con la enzima dextranasa, con el fin de degradar la placa dental. Hemos indicado que el origen de las caries se encuentra en la síntesis de dextrana a partir de sacarosa por la microflora salival. En este campo es probable que en el futuro se den nuevos desarrollos pues son múltiples las investigaciones al respecto. Se ha planteado inclusive la posibilidad de desarrollar vacunas anticaries basadas en la inactivación de la enzima responsable de la síntesis.

Es probablemente en la producción de dextranas de peso molecular controlado, donde más desarrollos se den en el cor-

to plazo, ya que existe actualmente un gran mercado para dextranas de bajo peso molecular producidas a través de procesos de hidrólisis (Fe-dextrana, Sephadex, dextrana clínica, etc.). Es probable, en la medida en que se controle eficientemente la acción de dextranasas, que estos productos puedan ser elaborados directamente, eliminando todos los inconvenientes del proceso ácido (subproductos, bajos rendimientos, etc.).

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

1. Alsop, R.M.; INDUSTRIAL PRODUCTION OF DEXTRANS,
Progress in Industrial Microbiology, Vol. 18.
Ed. M.E. Bushel, Elsevier Scientific Publishing, Co.
Amsterdam (1983); p.1 - 42
2. Andrews, P.; ESTIMATION OF THE MOLECULAR WEIGHTS OF PROTE-
INS BY SEPHADEX GEL FILTRATION; J. Biochem.,
91: 222-233, (1964).
3. Anónimo. DEXTRANUM 40; Pharmacopea of Japan.
Eighth Edition Part. I, 186-190 (1971)
4. Anónimo. IRON DEXTRAN INJECTION,
British Pharmacopea, p.254-255. (1973).
5. Badui, D.S.; QUIMICA DE LOS ALIMENTOS;
Ed. Alhambra, 1a. Ed. (1981).
6. Bailey, R.W. y Clarke, R.T.J.; A BACTERIAL DEXTRANASE.
Bioch., 72: 49-54, (1959).
7. Baker, R.W.; METHODS OF FRACTIONATING POLYMERS BY ULTRA
FILTRATION; Journal of Applied Polymer Science., 13:369-
376, (1969).
8. Baret, J.A.; TENDANCES EN ENZYMOLOGIE INDUSTRIELLE.
Biófutur (1985); 33
9. Basedow, A.M.; Macromol. Chem., Vol. 176 (1975) p. 745
10. Basedow, A.M.; Polymer. Bull., 2, 337-342, (1980).
11. Bergland B., Swanbeck G., Heclin H.; LOW MOLECULAR WEIGHT
DEXTRAN THERAPY FOR DIGITAL ISCHAEMIE DUE TO COLLAGENE
VASCULAR DISEASE: Nordling. Dermatológica, 163,353-357,(1981)

12. Bernfeld P.; ENZYMES OF STARCH DEGRADATION AND SYNTHESIS
Adv. Enzymol. 12: 379-428, (1951).
13. Bixler G.H. et al.; DEXTRAN , Industrial and Engineering
Chemistry, 45(4) 692-705, 1953.
14. Blix, G.; Acta Chem. Scand., 2, 467 (1948).
15. Bloom, J. y Rosted, C.O.; Acta Chem. Scand., 1, 32 (1947).
16. Boyer, L.M.; THE ENZYMES; Academic Press, 6, 292 (1975).
17. Cherry, J.P.; USE OF ENZYMES AS BIOLOGICAL INDICATORS; en:
Enzymes: Use and control in foods. Ed. F.W. Cooler, IFT
Short Course Committee, (1976).
18. Colin, H. et Belval, H.; SUR LA CONSTITUTION AU DEXTRANE;
Compt. Rend. Acad. Sci.(Paris) Vol. 210, 517-520, (1940).
19. Covacevich, M.T. y Richards G.N.; PURIFICATION OF
INTRACELULAR DEXTRANASES AND D-GLUCOSIDASES FROM *Pseudomonas*
UQM 733; Carbohydrate Research., 64, 169-180, (1978).
20. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, R.A. y
Smith, F.; Anal. Chem., 28, 350 (1956).
21. Dunhill, P., Wiseman, A., Blakeborough.; ENZYMIC AND NON
ENZYMIC CATALYSIS; Soc. of Chem. Ind., London (1980).
22. Durand, G., Monsan, P.; LES ENZYMES PRODUCTION ET UTILIZA
TION INDUSTRIELLES; Gauthier-Villard, Paris, (1982).
23. ENZYMAS PARA LA INDUSTRIA AZUCARERA; ENMEX, S.A. de C.V.
24. Evans, H.; IN ADVANCES IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY, Vol. II,
p. 209 (1946).

25. Fukumoto, J., Tsuji, H. y Tsuru, D.; STUDIES ON MOLD DEXTRANASES I. *Penicillium luteum*: ITS PRODUCTION AND SOME ENZYMATIC PROPERTIES; J. Biochem, 69, 1113-1121 (1971).
26. Fukumoto, J. Tsuji H. y Tsuru D.; J. Biochem., 71,57(1972)
27. García, G.M. y López Munguía C.A.; ENZIMAS INMOVILIZADAS Y SU APLICACION EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA; Ciencia y Desarrollo No. 58, Sept-Oct. (1984): 39-48.
28. García, H.F.; ASPECTOS SOBRE ESCALAMIENTO DE SISTEMAS DE RECUPERACION DE ENZIMAS; en: Biotecnología de enzimas; Huitrón C.; I.I.B., U.N.A.M., (1982).
29. Godfrey T y Reichtel, J.; INDUSTRIAL ENZYMOLOGY. THE APLICATION OF ENZYMES IN INDUSTRY; The Nature Press.(1982)
30. González, O.M.; ENZIMAS PARA ALIMENTOS EN MEXICO. Tesis (1981); Fac. de Química, U.N.A.M.
31. Hattori, A. e Ishibashi K.; SCREENING OF DEXTRANASE PRODUCING MICROORGANISM; Agric. Bio. Chem. 45(10)2347-2349 (1981).
32. Hellin, H., Richter, W., Mexxmerk y Rench H.; INCIDENCE, PATHOMECHANISM AND PREVENTION OF DEXTRAN INDUCED ANAPHYLACTOID ANAPHYLACTIC REACTION IN MAN; Clinical data: WHO (IABC Symposium on the standarization of Albumin, Plasma substitutes and plasmaphoresis: Geneve (1980), edité par KARGELS, BALE 1981). Develop. Biol. Standard 48, 144-155.
33. Hiraoka N., Fukumoto, J. y Tsuru D.; STUDIES ON MOLD DEXTRANASES. III PURIFICATION AND SOME ENZYMATIC PROPERTIES OF *Aspergillus carneus* DEXTRANASE; J: Biochem., 71,57-64(1972)

34. Hiraoka, N., Tsuki H., Fukumoto, J., Yamamoto, T. Tsuru, D.; Int. J. Peptide Protein Res., 5, 161 (1973).
35. Honing, P., PRINCIPIOS DE TECNOLOGIA AZUCARERA; Tomo I, C.E.C.S.A., México, (1974). p. 38.
36. Hultin, E., y Nordstrom, L.; INVESTIGATIONS ON DEXTRANASE I. ON THE OCURRENCE AND THE ASSAY OF DEXTRANASE; Acta Che mica Scand., 3, 1405-1417, (1949).
37. Hutson, D.H. y Weigel H.; STUDIES ON DEXTRANS AND DEXTRANASES. 4. MECHANISM OF THE ACTION OF INTRA AND EXTRA-CELLULAR MOULD HYDROLASES; J. Biochem., 88, 588-591, (1963).
38. Ingelman, B.; ENZYMATIC BREAKDOWN OF DEXTRAN; Acta Chemica Scand., 2, 803-812, (1948).
39. Janson, J.C.; STUDIES ON DEXTRAN-DEGRADING ENZYMES. ISOLA TION AND IDENTIFICATION OF A DEXTRANASE PRODUCING STRAIN OF *Cytophaga johnsonii* AND STUDIES ON THE FORMATION OF THE SURFACE BOUND ENZYME; Journal of General Microbiology, 88, 205-208, (1975).
40. Janson, J.C.; STUDIES ON DEXTRAN-DEGRADING ENZYMES. SOLU BILIZATION OF THE SURFACE BOUND DEXTRANASE OF *Cytophaga john sonii* BY PROTEOLYTIC ENZYMES, SNAKE VENOMS AND DETERGENTS; Journal of General Microbiology, 88, 209-217 (1975).
41. Kobayashi, M. y Matsuda, K., Biochim. Biophys. Acta., 370, 441, (1974).
42. Kobayashi, M. Matsuda, K.; ACTION OF THE GLUCOAMILASE ON DEXTRANS AS AN EXODEXTRANASE; Agric. Biol. Chem., 42(1)181 -183 (1978).

43. Koh, T.Y. y Khouw, B.T.; A RAPID METHOD FOR THE ASSAY OF DEXTRANASE; Canadian Journal of Biochemistry, 48(1) 225-227 (1970).
44. Kosaric, N., Yu, K y Zajic, J.E.; DEXTRANASE PRODUCTION FROM *Penicillium funiculosum*; Biothechnology and Bioengineering, Vol. XV, 729-741 (1973).
45. Lambert, P.W.; INDUSTRIAL ENZYME PRODUCTION AND RECOVERING FROM FILAMENTOUS FUNGI; en: The Filamentous Fungi. (1983) (Smith J., Beni, D.E.) Vol. IV, Chapter 9 Edward Arnold Publishers, London.
46. Lehninger A.L.; BIOCHEMISTRY; Worth Publishers, Inc., New York., (1970).
47. Linderstrom-Lang, K y Holter, H.; Medd. Carlsberg, Lab., 19 (1933) No. 14.
48. López Munguía C.A.; PRODUCTION, PURIFICATION ET INMOVILIZATION DE LA DEXTRANASACHARASE DE *Leuconostoc mesenteroides*; Tesis Doctoral, INSA Toulouse, Francia (1979).
49. López Munguía C.A. PROCESO ENZIMATICO Y AROMA DE LOS ALIMENTOS; en: Cuadernos de Posgrado. Ed. DEPg, Fac. de Química, U.N.A.M., (1982); 4(Vol. II): 109.
50. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.; J. Biol. Chem., (1951). 193, p.205.
51. Madhy y Prabhu, K.A.; STUDIES ON DEXTRANASE FROM *Penicillium aculeatum*; Enzyme Microb. Technol., 6,217-220 (1984).
52. Martínez, E.J.P.; DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE DEXTRANAS; Tesis (1985), Fac. de Química, U.N.A.M.

53. Meade, G.P.; CANE SUGAR HANDBOOK; 10° Ed. New York, J. Wiley (1977), Cap. 17.
54. Miller, G.L.; Anal. Chem., (1959), 31, 426.
55. Monsan P., López Munguía, C.A. (1981); ON THE PRODUCTION OF DEXTRAN BY FREE AND IMMOBILIZED DEXTRANSUCRASE; Biotechnol. Bioeng., 23, 2027-2037.
56. Obregón, L.J. de J.; ASPECTOS PRACTICOS DEL CONTROL DE POLISACARIDOS MEDIANTE EMPLEO DE LAS ENZIMAS. EFECTOS ADICIONALES Y PERSPECTIVAS; Deleg. Prov. MINAZ, Sancti Spiritus.
57. Prescott, S.C. y Dunn, C.G., MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL; McGraw Hill, (1959).
58. Ramesh V. y Singh, C.; BACTERIAL DEXTRANASE IMMOBILISED ON ZIRCONIA COATED ALKYLAMINE GLASS USING GLUTARALDEHIDE; Biochemical and Biophysical Research Communications, 97(2) 779-786, (1980).
59. Reed G.; ENZYMES IN FOOD PROCESING; 2a. Edición, (1975), Academic Press, 509-510.
60. Reiner, J.M.; BEHAVIOR OF ENZYME SYSTEMS; Ed. Burgess Publishing Co., (1959).
61. Richards, G.N. y Streamer M.; STUDIES ON DEXTRANASES. IV. MODE OF ACTION OF DEXTRANASE D₁ ON OLIGOSACCHARIDES; Carbohydrate Research, 32, 251-260, (1974).
62. Sawai, T. Ikigai, Y y Nawa, A.; IDENTIFICATION OF AN ISOMALTODEXTRANASE PRODUCING BACTERIUM, *Arthrobacter globiformis*; Agr. Biol. Chem., 40(6) 1249-1250, (1976).

63. Schaffer, P.A. y Somogy, M.; J. Biol. Chem., 100,695 (1933).
64. Shipew, W.F.; ENZIMATIC MODIFICATION OF FOOD FLAVOR; En: Enzymes in food and beverage processing. Ed. Ory, R.L. & St. Angelo, A.J., ACS Symp. Ser. (1977): 47.
65. Simonson, L.G. etal: CHARACTERIZATION OF AN EXTRACELLULAR DEXTRANASE FROM *Fusarium moniliforme*; Applied Microbiology, Nov. (1975), 855-861.
66. Simonson, L.G. y Liberta, A.E.; NEW SOURCES OF FUNGAL DEXTRANASE; Mycologia, 67, 845-851 (1975).
67. Smiley, K.L., Boundy, J.A. y Hensley, D.E.; ACTION PATTERNS OF IMMOBILIZED DEXTRANASE; Carbohydrate Research, 104, 319-324, (1982).
68. Sohns, V.E., Rogovin, S.P., Conway, H.F. y Langford, C.T.; PILOT-PLANT PRODUCTION OF CLINICAL-SIZED DEXTRAN BY ACID HIDROLYSIS OF THE ENZYMATICALLY SYNTHESIZED HIGH POLYMER; U.S. Dept. Agr. Bur. Agr. and Ind. Chem.; Mimeographed Circ. Ser., AIC; 372; Jun. (1954).
69. Staat, R.H. etal.; DETECTION ON PRELIMINARY STUDIES ON DEXTRANASE-PRODUCING MICROORGANISMS FROM HUMAN DENTAL PLAQUE; Infection and Immunity, 8;61009-1016 (1973)
70. Stryer, L.; BIOCHEMISTRY; W.H. Freeman and Company, Sn. Francisco, (1974).
71. Suga, K., Dedem, G. y Moo-Young, M.; ENZYMATIC BREAKDOWN OF WATER INSOLUBLE SUBSTRATES; Biotechnology and Bioengineering, Vol. XVII, 185-201 (1975).

72. Sugiura, M. et al.; STUDIES ON DEXTRANASE. PURIFICATION OF DEXTRANASE FROM *Penicillium funiculosum* AND ITS ENZYMATIC PROPERTIES; *Biochemica et Biophysica Acta*, 109, 299-301 (1973).
73. Sugiura, M. e Ito, A.; STUDIES ON DEXTRANASE. III. ACTION PATTERNS OF DEXTRANASE FROM *Penicillium funiculosum* ON HYDROLYSIS REACTION BY SUBSTRATE ANALOGUES; *Chem. Pharm. Bull.*, 22, 71593-1599 (1974).
74. Sugiura, M. e Ito, A.; STUDIES ON DEXTRANASE. IV. IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE FROM *Penicillium funiculosum* IAM 7013; *Chem. Pharm. Bull.*, 22(12)2941-2946 (1974)
75. Sugiura, M. et al.; STUDIES ON DEXTRANASE. V. ACTIVATION OF DEXTRANASE FROM *Penicillium funiculosum* IAM 7013 BY Co^{++} ; *Chem. Pharm. Bull.* 22, 122953-2958 (1974).
76. Sugiura M. e Ito A.; STUDIES ON DEXTRANASE. VI. SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND AMINO ACID COMPOSITIONS OF DEXTRANASES FROM *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* AND *Penicillium funiculosum* IAM 7013; *Chem. Pharm. Bull.* 23(6)1304-1308, (1975).
77. Sugiura, M. e Ito, A.; STUDIES ON DEXTRANASE. VII THE KINETIC PARAMETERS OF *Brevibacterium fuscum* DEXTRANASE AND MOLECULAR PROPERTIES OF THE DIGESTION PRODUCTS; *Chem. Pharm Bull.*, 23, 71532-1536 (1975).
78. Sugiura, M. e Ito, A.; STUDIES ON DEXTRANASE. VIII. SOME ENZYMATIC PROPERTIES OF IMMOBILIZED DEXTRANASE FROM *Brevibacterium fuscum* var *dextranlyticum*; *Chem. Pharm. Bull.*, 23(12)223-3227, (1975).
79. Takagi, S. et al.; AN ISOMALTOTRIOSE-PRODUCING DEXTRANASE FROM *Flavobacterium* sp. M-73: ACTION PATTERN OF THE ENZYME: *Carbohydrate Research*, 129 (1984) 167-177.

80. The Index Merck of Chemicals and Drugs. Sixth Ed., (1952)
81. Thoren, L.; THE DEXTRANS; Clinical data. WHO (IABC Symposium on the standarization of Albumin, Plasma substitutes and plasmaphoresis: Geneve (1980). edité par KARGELS., BALE 1981). Develop. Biol. Standard 48, 157-167,
82. Tilbury, R.H. (1972). British Patent 1290694.
83. Tsuchiya, H.M. etal: DEXTRAN-DEGRADING ENZYMES FROM MOLDS J. Bacteriol., 64, 513-519 (1952).
84. Tsuru, D., Hiraoka, N., Hirose, T. y Fukumoto, J.; Agr. Biol. Chem., 35, 1727 (1971).
85. Tsuru, A., Hiraoka, N. y Fukumoto, J. STUDIES ON MOLD DEXTRANASES IV: SUBSTRATE SPECIFICITY OF *Aspergillus carneus* DEXTRANASE; J. Biochem., 71, 653-660 (1972).
86. Walker, G.J. y Dewar, M.D.; THE ACTION PATTERN OF *Penicillium lilacinum* DEXTRANASE; Carbohydrate Research., 39, 303 315 (1975).
87. Walker, G.J., Murray, V.L. y Morrey-Jones, J.C.; REGULATION OF DEXTRANASE SYNTHESIS BY *Streptococcus mutans*; FEBS LETTERS, 115(2) 206-208 (1980)
88. Weetall, H.H.; IMMOBILIZED ENZYMES, ANTIGENS, ANTIBODIES AND PEPTIDES; Marcel Dekker, Inc., New York. 13-17 (1975)
89. Weiman, R.L.; PREPARING CLINICAL DEXTRAN; United States Patent Office; Pat. 2,784,143 (1957).
90. Wheatley, M.A. y Moo-Young, M.; DEGRADATION OF POLISACCHARIDES BY ENDO AND EXOENZYMES: DEXTRAN-DEXTRANASE MODEL SYSTEMS; Biotechnology and Bioengineering, Vol. XIX, 219-233 (1977).

91. Whitaker, J.R.; PRINCIPLES OF ENZYMOLOGY FOR THE FOOD SCIENCES; John R. Whitaker, M. Dekker. New York (1972).