

T-UES
1506
A 973p
1992
Ej.2

Universidad de El Salvador
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Escuela de Ingeniería Química



PRODUCCION DE DEXTRANAS NATIVAS
A PARTIR DE AZUCAR DE CAÑA

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

Flore Celeste Ayala Calero
Fernando Teodoro Ramirez Zelaya
Francisco Wilmer Guevara

15100 938

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO QUIMICO

15100938

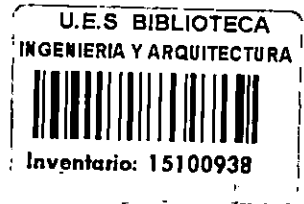
JUNIO DE 1992

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA

Rec. 23 julio/92



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA

SECRETARIO GENERAL:

LIC. MIGUEL ANGEL AZUCENA

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO

ING. JUAN JESUS SANCHEZ SALAZAR

SECRETARIO

ING. JOSE RIGOBERTO MURILLO CAMPOS

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA



Roberto Aristides Castellon Murcia
ROBERTO ARISTIDES CASTELLON MURCIA
DIRECTOR

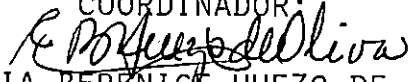


UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

TRABAJO DE GRADUACION

"PRODUCCION DE DEXTRANAS NATIVAS A PARTIR DE
AZUCAR DE CAÑA"

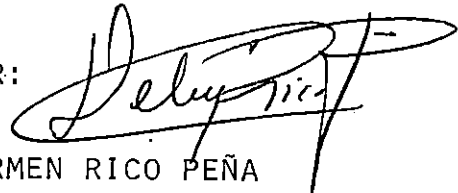
COORDINADOR:



DRA. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA



ASESOR:



ING. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA

AGRADECIMIENTOS

EXPRESAMOS NUESTROS AGRADECIMIENTOS A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE HAN CONTRIBUIDO EN FORMA DIRECTA Y/O INDIRECTA AL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, CON MENCIÓN ESPECIAL A LAS SIGUIENTES - PERSONAS:

ING. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA
DRA. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA
LIC. VICTOR MANUEL SEGURA
ING. ANA CECILIA DIAZ
SR. NAPOLEON ERNESTO PALACIOS
ING. THOMAS WILSON PALACIOS

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO DE GRADUACION, LO DEDICO ESPECIALMENTE.

A MIS PADRES, ZOILA ISABEL CALERO DE AYALA Y VICTOR MANUEL
AYALA, POR SU APOYO INCONDICIONAL EN TODO MOMENTO

A MIS HERMANOS, MELVIN NED. Y FANNIE LOTTY, POR SU COMPREN -
SIÓN Y PACIENCIA

A MIS AMIGOS Y FAMILIARES.

FLOR CELESTE

DEDICATORIA

A MIS PADRES, HERMANOS, FAMILIARES Y
AMIGOS.

FERNANDO TEODORO

DEDICATORIA

A QUIEN CON SU ESFUERZO, TESON Y SACRIFICIO ES PARTE DEL DESARROLLO DEL PAIS: LA MUJER SALVADOREÑA.

Y EN ESPECIAL, AL EJE QUE MUEVE MI SER: MI MADRE, DIGNA DEL CARMEN GUEVARA.

FRANCISCO WILMER GUEVARA

RESUMEN

Las dextranas son polímeros de glucosa que de acuerdo a su peso molecular, tienen una gran variedad de aplicaciones en la industria y la investigación principalmente en las áreas de alimentos y farmacia. En este trabajo se estudia el método fermentativo a escala de laboratorio, para la producción de dextranas utilizando azúcares de caña como materia prima. La fermentación se realizó bajo diferentes condiciones de operación con el objetivo de evaluar su efecto sobre la producción del polímero. Los parámetros evaluados fueron: concentración inicial de azúcar en el medio de fermentación, pH, temperatura, agitación y concentración del reactivo amortiguador (K_2HPO_4).

Para llevar a cabo el proceso fermentativo, se aisló una bacteria productora de dextrana a partir de dextrana formada en jugo de caña. Después de realizar pruebas microbiológicas y bioquímicas se concluyó que la bacteria aislada era Leuconostoc mesenteroides. Esta fue sometida a una serie de acostumbramientos, aumentando la concentración de sacarosa de 10 en 10% hasta llegar a 60% p/v de sacarosa en el medio, comprobándose que la bacteria es capaz de producir dextrana hasta con una concentración máxima de 50% p/v. El volumen ensayado para cada concentración fue de un litro.

Los resultados obtenidos en la fermentación utilizando 10 y 30% de sacarosa inicial en el medio, una temperatura de 25°C, sin control del pH, ni agitación, muestran ser los más satisfactorios, reportando rendimientos de 78.03% y 43.35% respectivamente, expresados como g de dextrana/100 g de azúcar en el medio. Estos datos son altos comparados con el rendimiento estequiométrico de 49%, debido a que no fue posible separar completamente la masa celular de la dextrana precipitada; por lo que se recomienda continuar las investigaciones sobre el proceso empleado, realizando análisis de pureza del producto terminado y aplicando los métodos de purificación recomendados. Así mismo, se sugiere investigar la producción de dextrana por el método enzimático utilizando enzima inmovilizada.

También se determinó el peso molecular promedio de cada una de las dextranas producidas durante la investigación, mediante la elaboración previa de una curva de calibración utilizando dextranas comerciales de peso molecular conocido, resultando dentro de un rango de 80,000 a 620,000 para concentraciones iniciales del 10% al 50% de sacarosa en el medio de fermentación.

INDICE

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCION	
CAPITULO I	
ASPECTOS ECONOMICOS Y DE INDUSTRIALIZACION DE LA CAÑA DE AZUCAR	4
1.1 Panorama del Azúcar en El Salvador	5
1.2 Panorama Mundial del Azúcar	6
1.3 Alternarivas de Diversificación del Azúcar de Caña	10
CAPITULO II	
DEXTRANAS	
2.1 Definición de Dextranas	15
2.2 Historia de las Dextranas	16
2.3 Estructura de las Dextranas	17
2.4 Propiedades Físicas y Químicas de las Dextranas	21
2.5 Aplicaciones de las Dextranas y de sus Derivados	25
2.5.1 Aplicaciones Médicas	25
2.5.2 Aplicaciones en la Industria de los Alimentos	28

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
2.5.3 Otras Aplicaciones	32
2.5.4 Derivados de la Dextrana	32
CAPITULO III	
NUTRICION Y EFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE	
<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	36
3.1 Generalidades	36
3.2 Bacterias del Género <u>Leuconostoc</u>	36
3.3 <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	37
3.3.1 Efecto de la Temperatura sobre <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	40
3.3.2 Efecto del pH sobre <u>Leuconostoc</u> <u>mesenteroides</u>	40
3.3.3 Cultivo de <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	44
3.3.4 Mantenimiento de <u>Leuconostoc</u> <u>mesenteroides</u>	47
CAPITULO IV	
METODOS DE PRODUCCION	49
4.1 Materias Primas	50
4.2 Mecanismos de la Fermentación	50
4.3 Proceso Fermentativo	52
4.3.1 Propagación de <u>Leuconostoc</u> <u>mesenteroides</u>	54

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
4.3.2 Síntesis de Dextrana Nativa	56
4.3.3 Producción de Dextrana Clínica	56
4.3.4 Recuperación de la Dextrana	58
4.4 Proceso Enzimático para la Producción de Dextrana	59
4.4.1 Producción de Dextransacarasa	61
4.4.2 Eliminación de Bacterias	63
4.4.3 Síntesis de Dextrana	64
4.4.4 Reprecipitación, lavado y secado de la Dextrana	64
4.5 Métodos de Depolimerización de Dextrana Nativa	65
4.5.1 Método Químico de Depolimerización de Dextrana Nativa	65
4.5.2 Método Enzimático para Depolimerizar la Dextrana Nativa	67
4.5.3 Métodos Físicos de Depolimerización de Dextranas Nativas	69
 CAPITULO V	
PRODUCCION EXPERIMENTAL DE DEXTRANAS	70
5.1 Objetivos del Trabajo	70

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
5.2 Aislamiento e Identificación de un Micro-organismo Productor de Dextrana	71
5.2.1 Aislamiento de <u>Leuconostoc</u>	72
5.2.2 Identificación del Microorganismo Aislado	74
5.3 Determinación de las Concentraciones de Sacarosa en el Medio de Fermentación, Adecuadas para la Producción de Dextrana	80
5.4 Efecto de la Concentración Inicial de Sacarosa sobre la Producción de Dextrana	87
5.4.1 Preparación del Medio de Producción de Dextrana	88
5.4.2 Preparación del Fermentador	88
5.4.3 Resultados del Efecto de la Concentración Inicial de Sacarosa sobre la Producción de Dextrana	91
5.5 Curvas de Crecimiento de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> Nativo en Soluciones con 10% y 30% p/v de Sacarosa Inicial	100

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
5.5.1 Determinación de la Población Celular por el Método de Conteo en Placa Extendida	101
5.6 Producción de Dextrana en un Medio con pH Controlado	107
5.6.1 Resultados del Efecto de Mantener el pH del Medio Constante en 5.2	108
5.7 Producción de Dextrana en un Medio con Agitación Mecánica	111
5.8 Producción de Dextrana por Fermentación Natural a Diferentes Temperaturas	117
5.9 Evaluación de la Calidad y Concentración de K_2HPO_4 en el Medio de Cultivo para la Producción de Dextrana Nativa	123
5.10 Determinación del Tiempo de Secado y del contenido de Humedad de la Dextrana Producida	125
5.11 Determinación del Peso Molecular Medio de las Dextranas Nativas Producidas	129
5.11.1 Curva de Calibración para la Determinación de Pesos Moleculares	129

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
5.11.2 Determinación de los Pesos Moleculares de la Dextrana Nativa Producida	134
OBSERVACIONES	144
CONCLUSIONES	146
RECOMENDACIONES	148
REFERENCIAS	151
APENDICES	
Apendice A: Determinación de Azúcares Reductores y Sacarosa Remanente por el Método de Lane y Eynon	158
Apendice B: Determinación de Humedad por el Método de Arrastre con Tolueno	162
Apendice C: Determinación de Pesos Moleculares de Polímeros y su relación con la Viscosidad	164

TEMAPAGINA

Apendice D: Pruebas Toxicológicas para soluciones de Dextrana In- yectable: DEXTRAN 40	174
Apendice E: Reactivos Utilizados en la Producción de Dextrana Na- tiva	186

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1-	Oferta Azucarera Nacional en el Período de 1987 a 1991	6
2-	Principales Productos Derivados del Azúcar de Caña, Forma de Obtención y sus Usos	12
3-	Precios de Dextranas Producidas por la Cepa <u>Leuconostoc mesenteroides</u> B-512	14
4-	Clasificación de las Dextranas	23
5-	Propiedades de las Dextranas	24
6-	Áreas de Aplicación y Propiedades Funcionales de las Dextranas	33
7-	Derivados de la Dextrana y sus Aplicaciones	35
8-	Requerimientos Nutricionales del <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	41
9-	Medio de Aislamiento HASID/BAKER para <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	44
10-	Medio de Desarrollo para <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	45
11-	Medio de Desarrollo BASAMIN/BUSCH para <u>L. mesenteroides</u>	46
12-	Medio de Mantenimiento para <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	48
13-	Composición del Medio Líquido de Desarrollo del Inoculante para Producción de Dextrana	55
14-	Medios de Cultivo para <u>Leuconostoc mesenteroides</u> que Pueden ser Utilizados para Controlar el Peso Molecular de la Dextrana Producida	57
15-	Composición del Medio para Producción de Dextransacarasa	61

Cuadro	Página
16- Diferentes Características de las Especies del Género <u>Leuconostoc</u>	76
17- Medio para Crecimiento de <u>L. mesenteroides</u> con Altas Concentraciones de Cloruro de Sodio	78
18- Resultados de las Pruebas Bioquímicas Efectuadas al Microorganismo Aislado del Jugo de Caña	79
19- Composición de la Solución de Sales Utilizada en los medios de Fermentación	82
20- Volúmenes Utilizados en la Preparación de los medios de Fermentación	82
21- Investigación de Concentraciones a las cuales <u>L. mesenteroides</u> Nativo Crece sin Ambientación Previa en Diferentes Concentraciones de Sacarosa	84
22- Investigación de Concentraciones a las cuales <u>L. mesenteroides</u> Nativo Produce Dextrana con Ambientación Previa a Diferentes Concentraciones de Sacarosa	86
23- Rendimiento de Dextrana en Función de la Concentración de Sacarosa en el Medio de Fermentación	99
24- Crecimiento Celular Máximo de <u>Leuconostoc</u> Nativo en Medio Conteniendo 10% y 30% p/v de Sacarosa Inicial	102
25- Comparación de Rendimiento en Medios con y sin Control de pH	108
26- Comparación de Rendimientos de Producción de Dextrana y Porcentajes de Sacarosa Remanente en Medios con y sin Agitación	116
27- Resultados del Efecto de la Temperatura sobre la Producción de Dextranas	118

Cuadro	Página
28- Costo del Medio Basamin-Busch para la producción de Dextrana. Reactivos Calidad Analítica	123
29- Resultado de la Evaluación de la Calidad y Concentración del Reactivo Amortiguador del Medio de Cultivo para la Producción de Dextrana Nativa	124
30- Dextranas Patrones Utilizadas para Construir la Curva de Calibración de Pesos Moleculares	130
31- Determinación de Viscosidades Relativas para Dextranas Patrones en el Viscosímetro Ostwald. (Volúmenes de Muestra 8 ml a 20°C)	132
32- Viscosidades Intrínsecas de las Dextranas Patrones de Diferentes Pesos Moleculares Promedios Graficados en la Curva de Calibración de la Figura 34	133
33- Resumen de los Resultados de Viscosidades Intrínsecas y Pesos Moleculares Promedios Obtenidos en una Fermentación Natural a 28°C y Utilizando Diferentes Concentraciones Iniciales de Azúcar	141
34- Resumen de los Resultados de Viscosidades Intrínsecas y Pesos Moleculares Promedios Obtenidos en Diferentes Condiciones de Fermentación utilizando 10% p/v de Azúcar Inicial en el Medio	142
35- Resumen de los Resultados de Viscosidades Intrínsecas y Pesos Moleculares Promedios Obtenidos en Diferentes Condiciones de Fermentación Utilizando 30% p/v de Azúcar Inicial en el Medio.	143

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1 -	Diversificación de la Industria de la Caña de Azúcar en El Salvador	4
2 -	Consumo Mundial de Azúcar en las Últimas Décadas	7
3 -	Perspectivas de la Distribución del Mercado de Edulcorantes en el Mundo a Medios de la Década de los Noventa	8
4 -	Productos Principales Obtenidos de la Sacarosa por Métodos Fermentativos	13
5 -	Estructura de Polisacáridos Formados por Unidades de Glucosa	19
6 -	Estructura Básica de la Dextrana Producida por <u>Leuconostoc mesenteroides</u> cepa B-512	21
7 -	Cultivo Típico de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> Ampliación x1250	38
8 -	Colonias Típicas de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> Aislada de Jugo de Caña	39
8a-	Efecto de la Variación del pH Externo Sobre el pH Interno en <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	43
9 -	Reacción de Formación de Dextrana a Partir de la Sacarosa	51
10 -	Curvas de Variación de pH y Concentraciones de Sacarosa y Dextrana para una Fermentación Típica de Sacarosa Utilizando <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	53
11 -	Diagrama de Bloques del Proceso de Producción de Dextrana a Partir de Azúcar Cruda Aplicando el Proceso Fermentativo	60
12 -	Efecto de pH sobre la Estabilidad de la Dextransacarasa a 25°C	63
13 -	Etapas de Ambientación de Medio de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> por Escalamiento de Volumen	83

Figura	Página
14 - Fermentador Utilizado a Escala de laboratorio para la Producción de Dextranas	90
15- Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 10% p/v Inicial de Sacarosa a 28°C	94
16- Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 20% p/v Inicial de Sacarosa a 28°C	95
17- Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 30% p/v Inicial de Sacarosa a 28°C	96
18- Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 40% p/v Inicial de Sacarosa a 28°C	97
19 - Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 50% p/v Inicial de Sacarosa a 28°C	98
20- Método de Dilución en Tubo para Recuento de Bacterias en Caja Petri	103
21- Curva de Crecimiento de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> en Medio de Cultivo con 10% p/v de Sacarosa Inicial y 28°C	105
22- Curva de Crecimiento de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> Nativo en Medio de Cultivo con 30% p/v de Sacarosa Inicial y 28°C	106
23- Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 10% p/v Inicial de Sacarosa a pH 5.2	109

Figura		Página
24-	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 30% p/v Inicial de Sacarosa a pH 5.2	110
25-	Fermentador con Agitador Mecánico Utilizado en las Pruebas de Laboratorio, para la Producción de Dextranas	113
26-	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 10% p/v Inicial de Sacarosa y Agitación a 70 rpm a 28°C	114
27-	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 30% p/v de Sacarosa Inicial y con Agitación a 70 rpm a 28°C	115
28-	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 10% p/v Inicial de Sacarosa a 25°C	119
29	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 30% p/v Inicial de Sacarosa a 25°C	120
30-	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 10% p/v Inicial de Sacarosa a 32°C	121
31-	Seguimiento con el Tiempo del Consumo de Sacarosa, Azúcares Reductores y pH de una Fermentación con 30% p/v Inicial de Sacarosa a 32°C	122
32-	Curvas de Secado para Muestras de Dextrana a Diferentes Temperaturas	127

Figura	Página
33- Gráfica de la Relación del Logaritmo Natural de la Viscosidad Relativa vrs. Concentración de las Dextranas Comerciales de Diferentes Pesos Moleculares	136
34- Curva de Calibración para la Determinación de Pesos Moleculares de las Dextranas Nativas Producidas (a 20°C)	137
35- Determinación de los valores de las Viscosidades Intrínsecas de Soluciones de Dextranas Producidas por Fermentación Natural Reportados en el Cuadro 33	138
36- Determinación de los Valores de las Viscosidades Intrínsecas de Soluciones de Dextrana Producidas en medios con 10% p/v de Sacarosa Inicial Reportados en el Cuadro 34	139
37- Determinación de los Valores de las Viscosidades Intrínsecas de Soluciones de Dextranas Producidas en Medios con 30% p/v de Sacarosa Inicial Reportados en el Cuadro 35	140

INTRODUCCION

Tradicionalmente, El Salvador se ha caracterizado porque sus fuentes de divisas se han basado en rubros de origen agrícola, como café y azúcar, principalmente. Los montos de las divisas obtenidas son variables dependiendo de los precios que estos productos tengan en el mercado internacional, los cuales, por lo general, son bastante fluctuantes.

Debido a estas fluctuaciones, resulta importante para El Salvador el investigar alternativas tecnológicas que permitan el desarrollo de nuevos productos y mercados a partir de recursos nacionales que además, tengan mayor valor agregado en el mercado internacional.

Dentro del gran número de posibilidades ofrecidas por la sucroquímica se encuentra la producción de dextranas utilizando como sustrato azúcar morena.

Las Dextranas son polímeros lineales de D-glucosa, constituidos por varios miles de unidades, obtenidas a través de la acción enzimática de la dextransacarasa, la cual, es una enzima inducida producida por cultivos de Leuconostoc mesenteroides.

Las cadenas naturales o nativas se producen normalmente por fermentación de sacarosa o por método indirecto.

to que implica la obtención previa de la dextransacarasa y posterior síntesis enzimática.

La utilización de las dextranas nativas está limitada a las aplicaciones de exploración, sondeos y extracción de petróleo, pinturas, pegamento en cigarrillos, etc. Sin embargo, la hidrólisis y fraccionamiento de la dextrana nativa permite la obtención de dextranas de diferentes pesos moleculares que pueden tener diversas aplicaciones en la industria, en especial en la farmacéutica en presentaciones como dextrana clínica utilizada como expansor sanguíneo, ferrodextrana para el tratamiento de anemias y sulfatodextrana muy utilizada como anticoagulante.

Este trabajo de graduación pretende desarrollar un estudio preliminar sobre la producción de dextranas en El Salvador; utilizando para ello, un proceso fermentativo discontinuo a nivel de laboratorio, así como proponer una alternativa para la utilización de azúcar morena como materia prima en el substrato para la producción de dextranas. Además, aislar una cepa nativa de Leuconostoc mesenteroides que esté acostumbrado a las condiciones climáticas y nutricionales del medio ambiente nacional, con su subsecuente aplicación en la producción de las dextranas.

Así, las dextranas se constituyen en un producto con un mercado diversificado y de mayor valor agregado para El

Salvador, por lo que el desarrollo de un trabajo de esta naturaleza, sienta no sólo un precedente bibliográfico, sino las bases a posteriores investigaciones a fin de aprovechar efectivamente un recurso por métodos biotecnológicos, que pueda generar mejores perspectivas económicas para El Salvador.

CAPITULO I
ASPECTOS ECONOMICOS Y DE INDUSTRIALIZACION
DE LA CAÑA DE AZUCAR

Uno de los principales rubros agrícolas en El Salvador, es la caña de azúcar, de la que se obtienen los derivados presentados en la figura 1, donde se puede observar que los productos principales son azúcar y alcohol etílico.

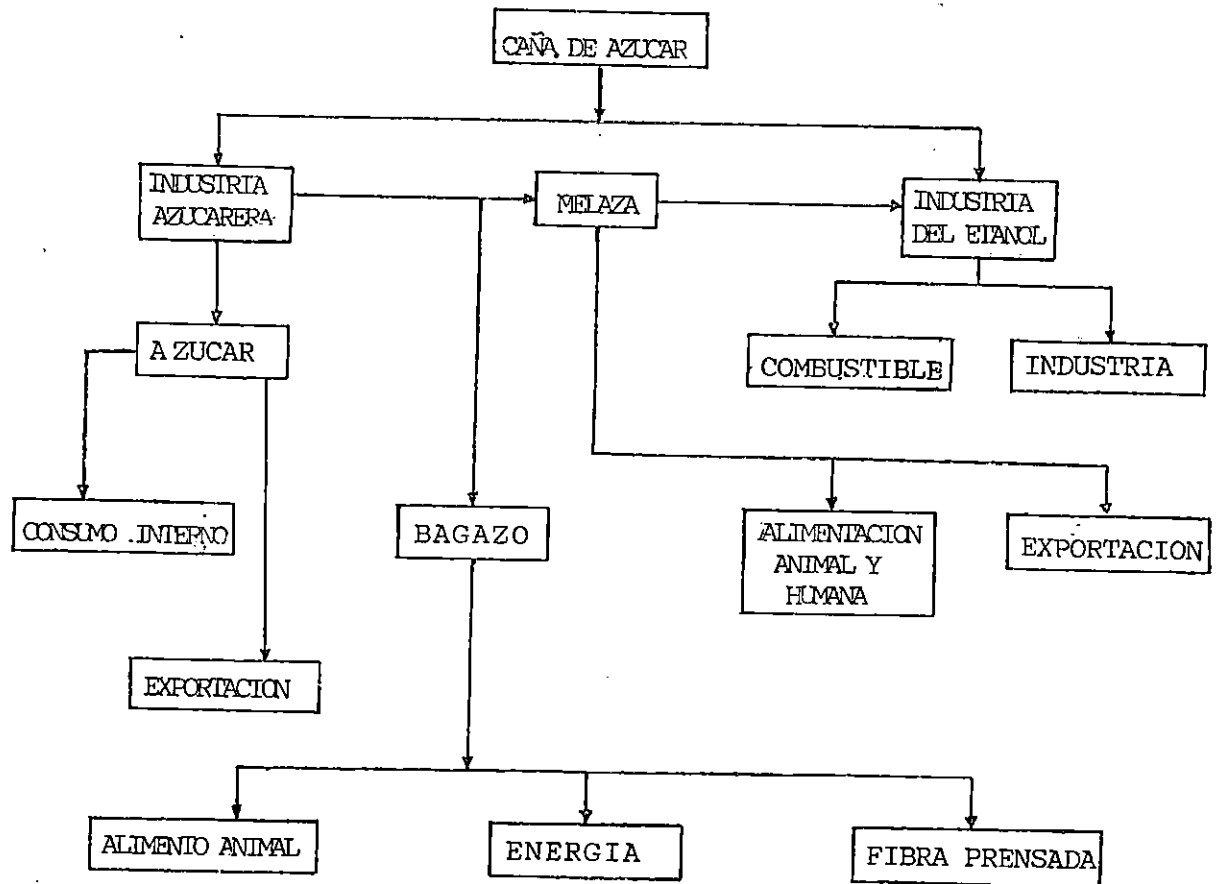


FIGURA 1: Diversificación de la industria de la caña de azúcar en El Salvador.

1.1 PANORAMA DEL AZUCAR EN EL SALVADOR

La zafra 1989-1990, dió una producción de caña de azúcar de 2,1850,100 toneladas cortas (TC), 24% superior a la del año anterior. Para la zafra 1990-1991, se estimó una cifra record de producción de caña de aproximadamente 3,514,150 TC, 23% más alta que el año de 1989-1990, y 53% superior a la zafra 1988-1989. En el mismo año 1990-1991, se obtuvo una producción de azúcar de aproximadamente 306,451 toneladas cortas. Este aumento en la producción se debió fundamentalmente a un incremento en el área cultivada, tal como puede verse en el cuadro 1. Esto fue el resultado de mejores precios y de favorables condiciones para la siembra de caña (FUSADES, 1991).

También ha habido un incremento sostenido en los rendimientos agrícolas durante los últimos años. Sin embargo, en la fase industrial los rendimientos de azúcar son bastante bajos. Este problema se origina por la falta de incentivos al agricultor para entregar caña con mayor contenido de azúcar, ya que el valor a pagar en los últimos años se ha basado en el peso de la caña y no en la calidad. Sin embargo, para la zafra 1991-1992, algunos ingenios azucareros acordaron pagar por el contenido de azúcar (FUSADES 1991).

El consumo interno de Azúcar para 1989-1990 fue: 180,000 TC (79% de la producción nacional). Para la cosecha 1990-1991, se incrementó a 190,000 TC. Esto representa un 62% de la producción alcanzada para este mismo año, por lo que las exportaciones de azúcar se ven incrementadas considerablemente (FUSADES 1991).

CUADRO 1
OFERTA AZUCARERA NACIONAL EN EL PERIODO DE 1987 A 1991

RUBROS	1987-1988	1988-1989	1989-1990	1990-1991
Superficie Rosada (Manzanas)	51,195.00	44,265.00	47,190.00	55,321.00
Producción de Caña (TC)	2,526,908.00	2,290,295.00	2,850,100.00	3,513,150.00
Rendimiento Agrícola (TC/Mz)	49.36	51.71	60.39	63.50
Producción de Azúcar (TC)	205,185.00	191,233.00	227,848.00	306,451.00
Rendimiento Industrial (Lb. Azúcar/TC Caña)	162.40	167.00	159.80	173.00
Producción del Alcohol (Litros)	8,514,000.00	2,800,000.00	1,349,802.92	7,570,000.00
Consumo de Azúcar (TC)	176,272.00	180,000.00	180,000.00	190,000.00
Exportaciones de Azúcar (TC)	28,913.00	11,233.00	47,848.00	116,451.00

FUENTE: FUNDACION SALVADOREÑA PARA EL DESARROLLO (FUSADES 1991).

1.2 PANORAMA MUNDIAL DEL AZUCAR

El consumo mundial de azúcar de caña y de remolacha ha tenido una evolución estable en las últimas décadas, pero pre-

senta, desde los años 80, una tendencia al estancamiento, debido tanto a la saturación de la demanda como a la creciente adopción de sustitutos como los jarabes de glucosa y fructosa derivados del almidón y los edulcorantes sintéticos (sacarina, ciclamato, aspartato, etc). Es bastante probable que en las próximas décadas haya una disminución de la demanda de azúcar de caña y remolacha debido a estos factores (CODETEC, 1991).

La figura 2 muestra la evolución del consumo de azúcar en el mundo, en las últimas décadas.

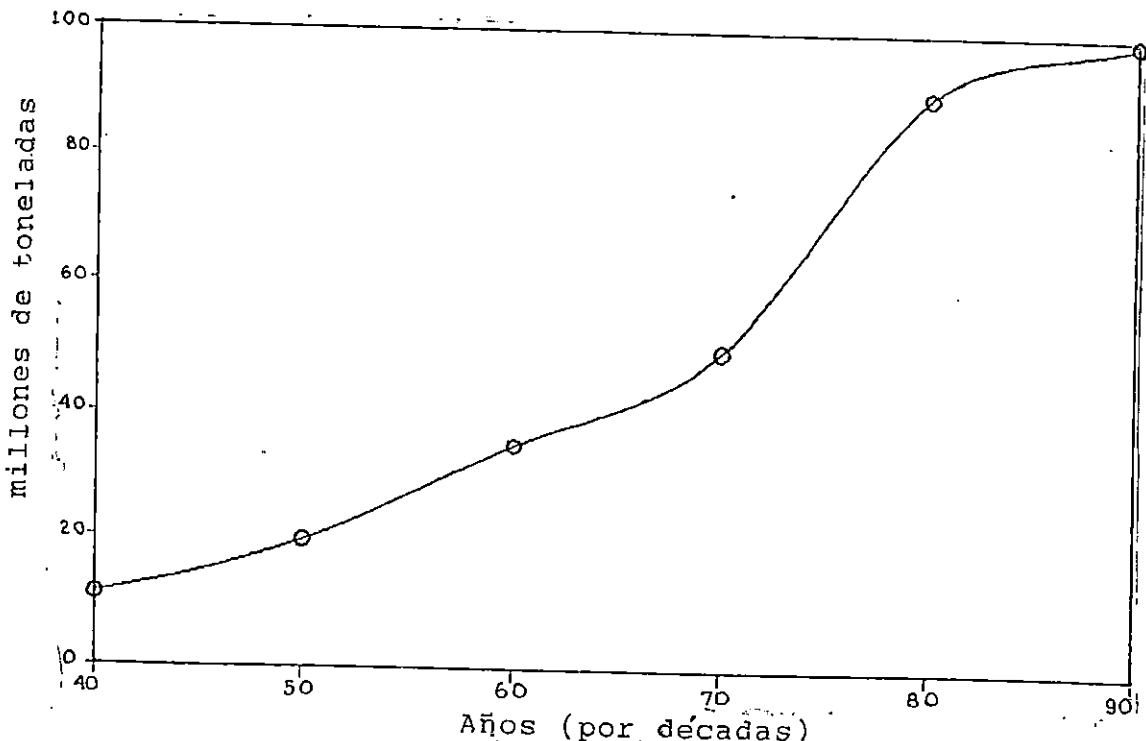


FIGURA 2: Consumo mundial de azúcar en las últimas décadas
FUENTE : CODETEC, 1991b

En los Estados Unidos, en 1985, el azúcar de caña y remolacha ocupaba el 60% del mercado total de 13 millones de toneladas de edulcorantes. Las perspectivas para la división del mercado mundial de edulcorantes entre los varios productos concurrentes a mediados de la década de los noventa están representados en la figura 3 (CODETEC, 1991b).

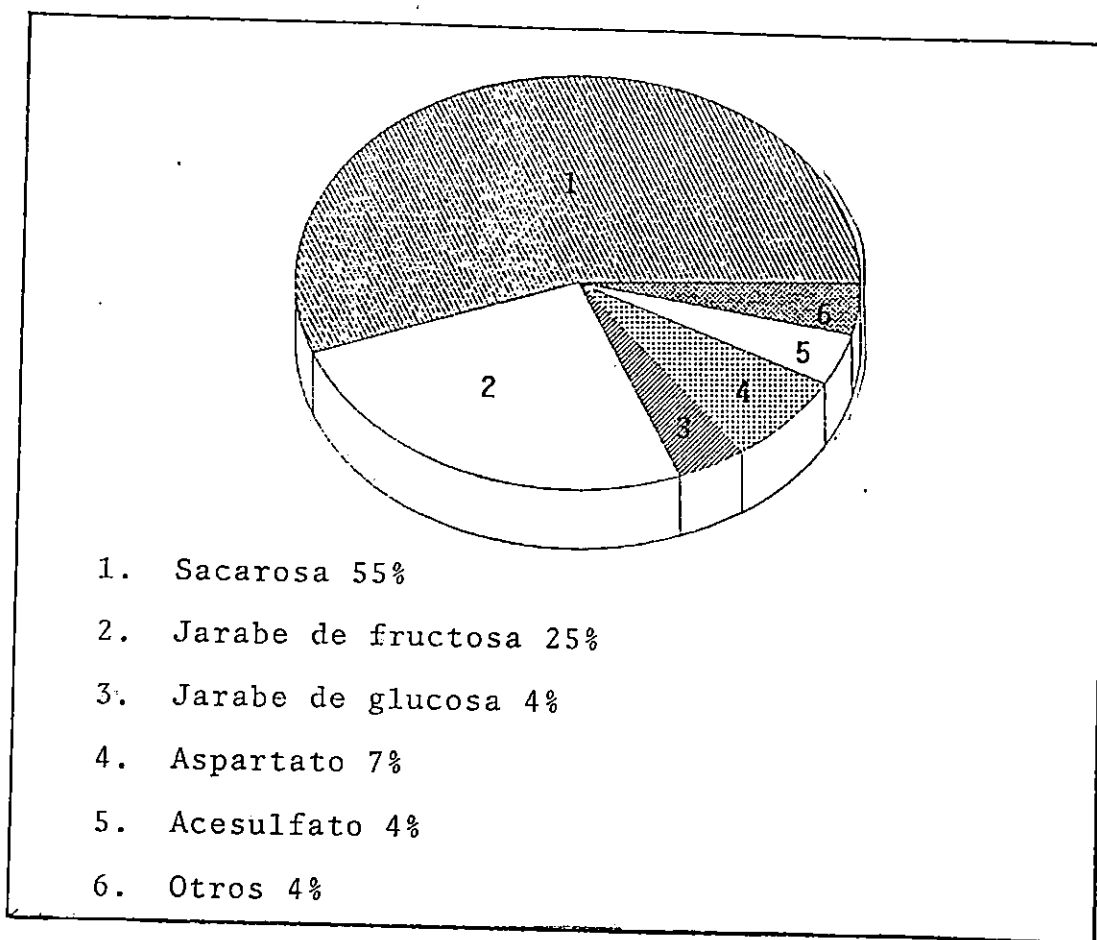


FIGURA 3: Perspectivas de la distribución del mercado de edulcorantes en el mundo a mediados de la década de los noventa.

FUENTE: CODETEC, 1991b.

En El Salvador, la sacarosa o azúcar de caña constituye el principal edulcorante, y las perspectivas son de que los jarabes de fructosa y glucosa no tendrán tanta penetración como en los Estados Unidos y otros países productores de almidón.

FUSADES* previó que en El Salvador en el período 1990/1991, el 38% de la producción de azúcar estaría disponible para exportación, con lo que se esperaría exportar unas 33,272 TC al mercado estadounidense, dejando para el mercado mundial 83,179 TC. Los precios en el mercado estadounidense se han mantenido relativamente estables debido al alto grado de intervención estatal con la fijación de cuotas de importación.

Los precios de mercado estadounidense han oscilado alrededor de los 23.50 centavos de dólar la libra, a diferencia del mercado mundial en el que los precios han tenido una tendencia a la baja, cayendo de un promedio de 15.24 centavos de dólar la libra a 12.90 centavos de dolar en el período de abril a junio de 1990.

De esta manera, se vuelve importante, para los países productores de azúcar, la adopción de una política de regulación del equilibrio oferta-demanda, lo que sugiere la creación de nuevos productos y mercados a partir de la caña de azúcar (CODETEC, 1991b).

FUSADES: Fundación para el Desarrollo de El Salvador

1.3 ALTERNATIVAS DE DIVERSIFICACION DEL AZUCAR DE CAÑA

Durante los últimos años la química azucarera ha despertado gran interés debido a las numerosas posibilidades de aplicación industrial que se han abierto para el azúcar; sin embargo, a pesar de su abundancia en el mercado, de su costo relativamente bajo y de proceder de un recurso renovable, se considera que no más del 0.1% de los actuales 100 millones de toneladas de azúcar producidas en el mundo, son utilizados como materia prima química.

El azúcar de la caña se puede emplear como materia prima en los tres estados diferentes en que se encuentra durante el proceso de fabricación, ya sea como guarapo, melaza o azúcar cruda (Serrano, 1983).

El azúcar de caña fabricada en los ingenios en general contiene un 97.5% de sacarosa, 0.86% de azúcares reductores, 0.46% de otros compuestos orgánicos, 0.43% de cenizas y un 0.15% de agua; de manera que se considera sacarosa casi pura (Serrano, 1983).

La sacarosa es un disacárido no reductor que contiene ocho grupos alcohólicos. Está formado por una molécula de glucosa y una de fructosa, enlazadas formando un enlace del tipo β (2,1) entre el carbono anomérico de ambos residuos.

La sacarosa puede ser modificada tanto por vía química como por vía fermentativa o enzimática.

La conversión química de la sacarosa se puede obtener también por medio de reacciones degradativas de las que resultan nuevos productos de peso molecular inferior. Algunos de éstos, como el sorbitol y el manitol tienen variedad de aplicaciones industriales (Serrano, 1983).

Por su composición química y estructura la sacarosa es una excelente materia prima para la obtención de un gran número de productos, tal como se muestra en el cuadro 2.

En el ramo de las transformaciones bioquímicas complejas, la sacarosa es frecuentemente la fuente preferencial de carbono y energía para diversos productos fermentativos, como los citados en la Figura. 4.

Así, tomando en cuenta esta coyuntura y relacionándola con los precios atractivos que tienen las dextranas, como se muestra en el cuadro 3, se puede ver fácilmente que la implementación de la utilización del azúcar morena para la producción de dextranas representaría una alternativa viable para percibir mayores ingresos en calidad de divisas para El Salvador.

CUADRO 2
PRINCIPALES PRODUCTOS DERIVADOS DEL AZUCAR DE CAÑA FORMA DE OBTENCION Y SUS USOS

PRODUCTO	PROCESO	UTILIZACION
Glucosa y fructosa	Hidrólisis enzimática o ácida	Alimenticia y farmacéutica
Enzimas (glucosa invertasa, etc.)	Fermentación	Alimenticia y química
Acido levulínico y levulinato	Transformación química de la glucosa	Química y farmacéutica
Vitamina B2	Transformación química a través del ácido arabinónico	Farmacéutico
Vitamina C	Transformación química y fermentativa	Farmacéutica y alimenticia.
Sorbitol	Transformación química de la glucosa	Química, alimenticia y farmacéutica.
Manitol	Transformación química de la fructosa	Farmacéutica.
Octabenzoato de sacarosa	Esterificación	Plásticos
Acetato isobutirato de sacarosa	Esterificación	Alimenticia, plásticos y química.
Esteres grasos de sacarosa	Transesterificación	Química y Farmacéutica
Octaacetato de sacarosa	Esterificación	Plásticos, carburantes y Adhesivos
Polióxidos	Reacción con óxido de propileno	Espuma de Uretano
Resinas sacarosa melanina formaldehído y sacarosa fenol-formaldehído	Condensación	Plásticos y textiles
Alil-sacarosa	Alilación	Adhesivo y Plásticos
Acido láctico	Fermentación y por hidrólisis de la sacarosa	alimenticia, textil y química
Acido itacónico	Fermentación	Resinas y aplicación química
Etanol	Fermentación	Combustible y química
Gomas xantanas y dextrana	Fermentación	Farmacéutica, química, explotación de petróleo.
Acido cítrico	Fermentación	Alimenticia y farmacéutica
2-3 Butilenglicol	Fermentación	Química
Antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, etc), Vitamina B12	Fermentación	Farmacéutica
Aminoácidos (lisina, glutamato, triptofano, etc) y proteína unicelular.	Fermentación	Alimenticia
Otros ácidos orgánicos - (ácido inosínico, ácido guanilico, ácido agílico)	Fermentación	Alimenticia

FUENTE: CODETEC 1991b.

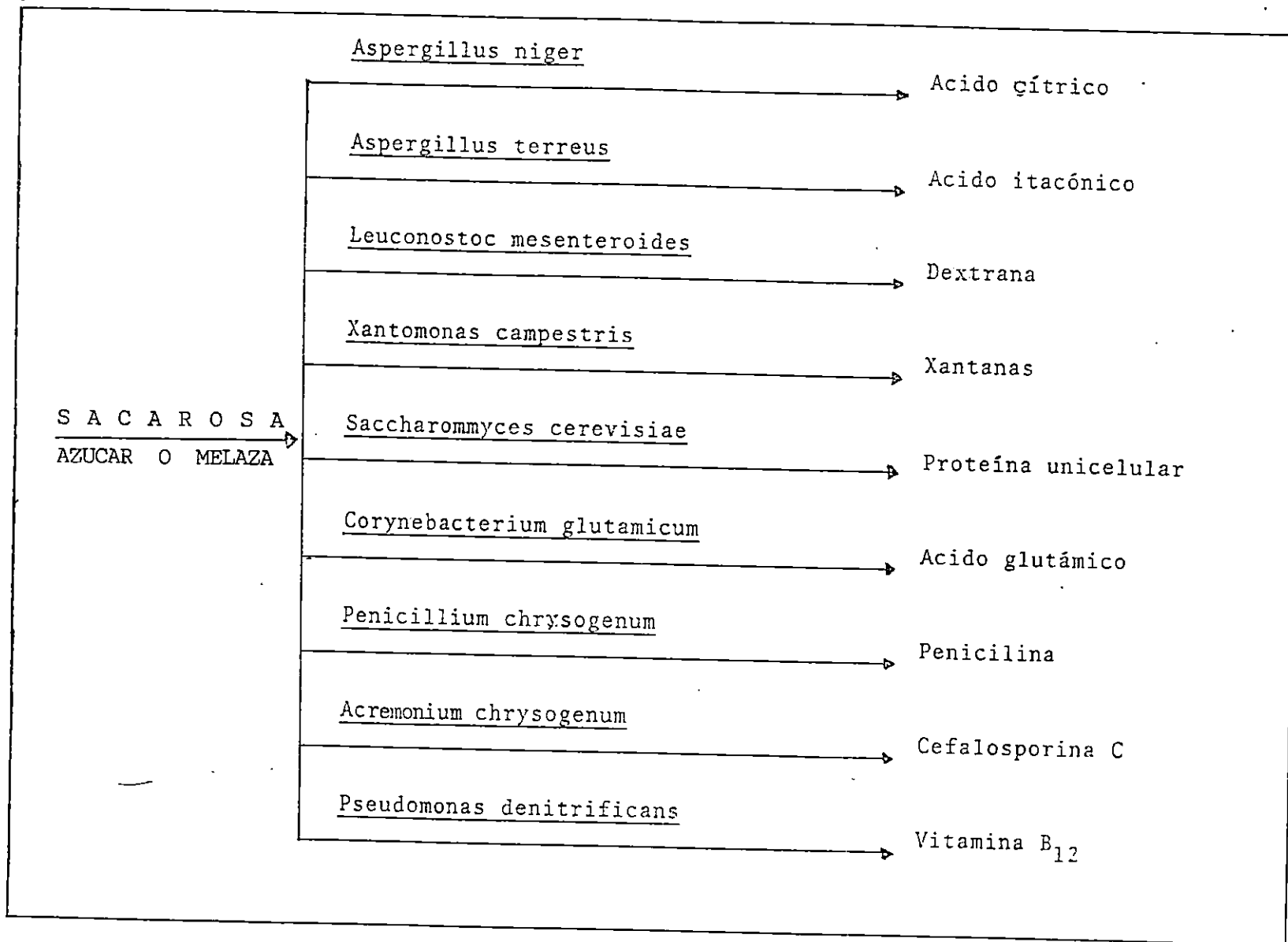


FIGURA 4: Productos principales obtenidos de la sacarosa por métodos fermentativos.
 FUENTE: CODETEC 1991a.

CUADRO 3

PRECIOS DE DEXTRANAS PRODUCIDAS POR LA CEPA
Leuconostoc mesenteroides B - 512

PESO MOLECULAR (g / g mol)	PRECIOS (FOB) \$/500 g
10,000	268.00
40,000	290.00
70,000	330.00
500,000	338.00
2,000,000	353.00
Grado Industrial	
5,000,000 - 40,000,000	39.50

FUENTE: Catálogo SIGMA, 1991.

CAPITULO II

DEXTRANAS

Las dextranas, son consideradas como productos no deseables en los ingenios azucareros, debido a que para su formación es necesaria la sacarosa, lo que hace descender el rendimiento en producción de la misma; sin embargo, las dextranas tienen diversidad de usos o aplicaciones que dependen de su peso molecular, formación de complejos, viscosidad, y de otras propiedades.

A continuación se presenta información general sobre la composición y estructura química de las dextranas, así como de sus propiedades y aplicaciones en diferentes campos industriales y de investigación.

2.1 DEFINICION DE DEXTRANAS

Las dextranas son polímeros lineales constituidos de miles de unidades de D-glucosa, sus pesos moleculares varían de varios miles a millones. Se obtienen a través de la acción enzimática de la dextransacarasa (sacarosa: 1,6 α - glucosiltransferasa, EC 2:4:1:5) producida por diferentes microorganismos, entre ellos, la bacteria llamada Leuconostoc mesenteroides, que es

la utilizada comercialmente para su producción.

2.2 HISTORIA DE LAS DEXTRANAS

El primer reporte de las dextranas data de 1822 y refiere que se enviaron cuatro botellas conteniendo jugo de caña desde La Martinica hasta Francia, pero, al llegar se encontró que el jugo se había transformado en una masa mucogelatinosa. Se estudió esta masa gomosa, pero no se pudo determinar su composición, probablemente por la falta de procedimientos analíticos (Underkofler, 1954).

En 1861, Pasteur describió dos "Clases de fermentaciones viscosas" debidas a dos clases de "fermentos organizados". Durín, estaba convencido de que esta goma era un compuesto de celulosa, pero la verdadera composición, consistía únicamente en moléculas de glucosa, que fue descubierta primero por Scheibler. El la nombró dextrana por ser semejante a la dextrina, pero fue un error creer que la sustancia se encontraba naturalmente en las células de la remolacha (Underkofler, 1954).

El organismo causante de esta fermentación fue nombrado primeramente por Cienkowski como Ascococcus mesente-

roides, creyendo que la masa mucogelatinosa era debida a una verdadera formación zoogleal. Tieghem, dió la primera descripción adecuada del organismo notando su similitud con el género Nostoc de las algas verdes y lo nombró Leuconostoc mesenteroides (Underkofler, 1954).

2.3 ESTRUCTURA DE LAS DEXTRANAS

La principal estructura general de un polisacárido es la repetición de unidades, siendo la D-glucosa la subunidad más frecuente (Nester, 1973).

Los polisacáridos se encuentran en la naturaleza ya sea como formas de almacenamiento de carbón y energía, o como componentes estructurales de la célula. La celulosa, es el principal componente estructural de las paredes de las células vegetales, siendo sintetizada además, por algunas bacterias; es un polímero de subunidades de D-glucosa, conectadas por enlaces glucosídicos β (1,4).

El almidón y el glucógeno, constituyen reservas energéticas, encontrándose, el primero en semillas, raíces y tubérculos; y el segundo almacenado en animales y algunas bacterias. Son moléculas ramificadas y tam

bién están formadas solamente por unidades de D-glucosa, pero unidas por enlaces α (1,4) en sus porciones lineales y α (1,6) en los puntos de ramificación.

Las estructuras de las dextranas, glucógeno y almidón, presentan ciertas similitudes estructurales a la celulosa, como puede verse en la Figura 5.

Todos estos polímeros están formados de residuos de glucosa. Sin embargo, tienen distintas moléculas ya que difieren en la manera en que las unidades de glucosa están enlazadas, en el tipo de ramificación y en el número de subunidades. Los polisacáridos que poseen la misma subunidad, pueden diferir ya sea en el tamaño del polímero, el grado de ramificación de la cadena y en los átomos de carbono involucrados en el enlace glucosídico.

Las dextranas difieren entre sí por determinadas características físicas y químicas, por ejemplo, rotación específica, viscosidad intrínseca, solubilidad en el agua, naturaleza del producto sólido y proporción de las diversas unidades glucopiranosicas presentes.

Una característica constante de las dextranas es su casi exclusivo contenido de unidades α -D-glucopirano

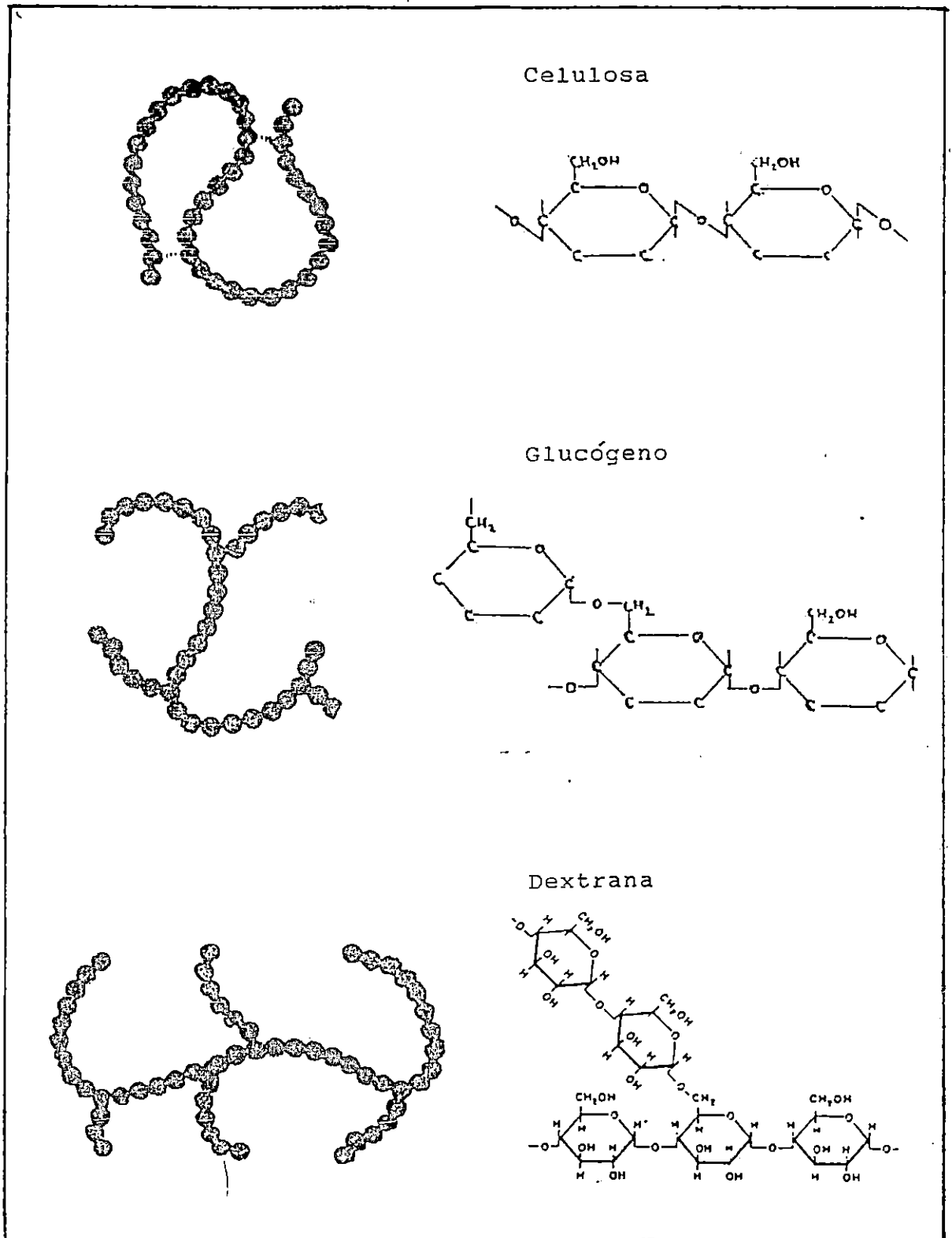


FIGURA 5: Estructura de polisacáridos formados por unidades de glucosa.

FUENTE : Nester, 1971.

sil. Las otras características químicas y físicas de las dextranas varían considerablemente.

Estudios estructurales llevados a cabo por Sloan y colaboradores en 1954 demostraron que la dextrana producida por la cepa B-512 contenían 95% de unidades D-anhidroglucopiranosas, unidas por enlaces (1,6) y 5% enlazadas en la forma (1,3). Van Cleve y colaboradores (1956), subsecuentemente demostraron que la dextrana de la cepa B-512, contenía un segmento repetitivo de aproximadamente 23 unidades anhidro-D-glucopiranosiles. De éstas, 21 unidades tienen enlaces (1,6), una unidad es una ramificación enlazada de la forma (1,3) y una unidad es un grupo terminal. Un segmento estructural típico es mostrado en la Figura 6 (Glicksman, 1969).

El peso molecular del polímero formado depende del medio de fermentación. Si no está presente un iniciador, la dextrana formada tiene un peso molecular de más de $100_1 100,000$. Si se utiliza, un iniciador como la maltosa las moléculas de dextrana tendrán predominantemente un peso molecular abajo de 50,000. Si el iniciador empleado tiene un peso molecular entre 15,000 y 40,000 la mayoría de la dextrana resultante tendrá un peso molecular de $75,000 \pm 25,000$, el tipo

preferido para uso como expansor sanguíneo (Glicksman, 1969).

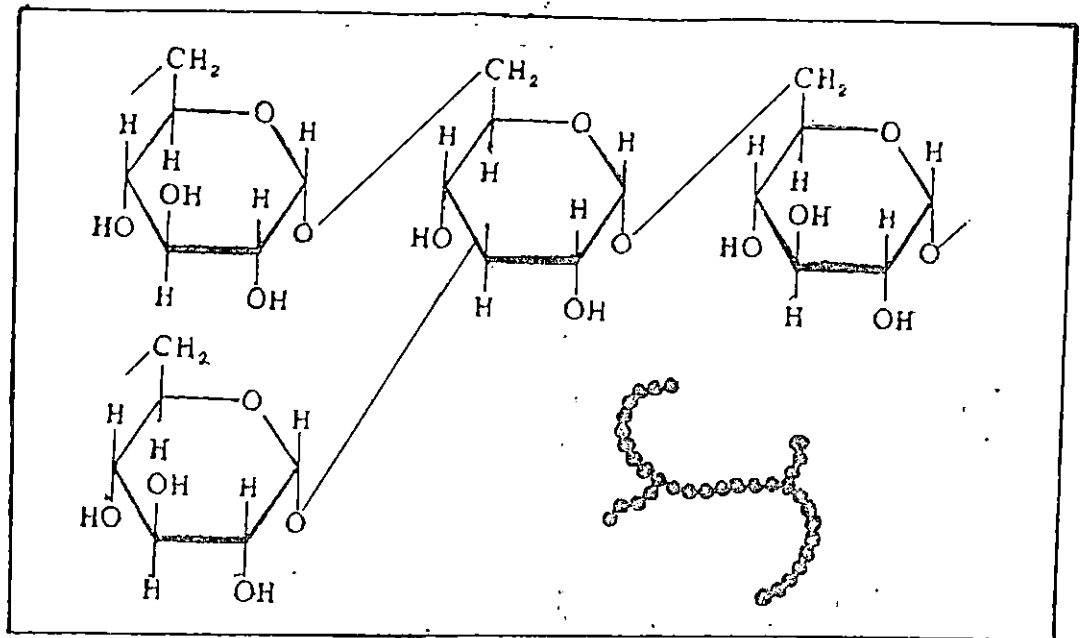


FIGURA 6: Estructura básica de la dextrana producida por Leuconostoc mesenteroides cepa B-512.
FUENTE: Glicksman, 1969.

2.4 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS DEXTRANAS

La dextrana es un polisacárido neutro, soluble en agua caliente y fría dando soluciones claras y viscosas. Es insípida, químicamente inerte y compatible con la mayoría de ingredientes utilizados normalmente en alimentos.

Tiene características hidrocoloidales típicas tales como propiedades emulsificantes y estabilizadoras en

sistemas aceite-agua. Es también conocida por sus cualidades humectantes, espesantes y retenedoras de agua.

Fisiológicamente, cuando la dextrana es ingerida, es hidrolizada lentamente a formas absorbibles de carbohidratos. Esto ha sido demostrado en exámenes nutricionales en animales y humanos.

Exámenes biológicos recientes, muestran que cuando dextranas con alta proporción de enlaces (1,6) son incluídas en el régimen regular en una dieta normal, es inhibida la ganancia de peso corporal. Sin embargo, la dextrana es comestible, y asimilada sin efectos desfavorables en los sistemas humanos; parece ser que los enlaces (1,6) son resistentes al ataque de las bacterias y enzimas presentes en el tracto intestinal. Esto sugiere su uso en alimentos de bajas calorías o en dietas reductoras (Martín 1969).

Los cuadros 4 y 5 muestran un resumen de las propiedades de la dextrana de acuerdo al tipo de enlace y su viscosidad intrínseca.

CUADRO 4
CLASIFICACION DE LAS DEXTRANAS

	Atomos de carbono de la anhidroglucosa que participan en los enlaces glucopiranosicos			
	C ₁ (o C ₁ y C ₆)	C ₁ (o C ₁ y C ₆)	C ₁ (o C ₁ y C ₆)	NUMERO DE DEXTRANAS
	Designación y porcentaje de enlaces			
	Tipo 1:6	Tipo 1:4	Tipo 1:3	
A	97-50	0-50	0-2	47
B	95-86	0-8	3-6	15
C	85-50	0-36	6	28
Dextranas molecularmente heterogéneas que han sido fraccionadas dando componentes principales pertenecientes a dos o más de las otras clases.				

FUENTE: Prescott, 1954.

CUADRO 5
PROPIEDADES DE LAS DEXTRANAS

GRUPO	TIPO DE ENLACE	VISCOSIDAD INTRINSECA 25°C	NATURALEZA DEL POLIMERO	APARIENCIA DE LA SOLUCION ACUOSA
1	A, B	1.2 - 0.6	Muy cohesivo, goma dura flocculante.	Muy turbia
2	A, C	0.5 - 0.2	Fino o precipitado flocculante	Solución opaca
3a	A, B	0.9 - 0.5	Fino o precipitado flocculante o goma densa.	Solución muy turbia
3b	C	1.4 - 0.5	Precipitado flocculante o goma densa.	Solución muy turbia
4a	A, B	1.3 - 1.0	Goma suave	Ligeramente opaca
4b	A, B	2.0 - 1.6	Cohesiva, goma fibrosa	Ligeramente opaca
4c	A, C	1.4 - 0.4	Fibrosa o gomas fluidas	Clara ligeramente turbia.
5a	A, B	1.2 - 0.6	Cortas o gomas fibrosas.	Turbia o ligeramente opaca.
5b	A, B	1.0 - 0.9	Precipitado flocculante o goma corta.	Ligeramente turbia a muy turbia.

2.5 APLICACIONES DE LAS DEXTRANAS Y DE SUS DERIVADOS

A medida que se han ido desarrollando las técnicas de investigación y métodos de análisis, los usos de las dextranas cada vez se van ampliando de tal forma, que hasta ahora, existe toda una gama de aplicaciones tanto de la dextrana nativa como de sus derivados ya sea en medicina, en alimentos, en la industria, etc.

2.5.1 APLICACIONES MEDICAS

La dextrana ha sido utilizada principalmente como un expansor del plasma sanguíneo y su aplicación le ha servido para que los investigadores le proporcionen mayor atención. Dos de las dextranas más comúnmente utilizadas son las que tienen pesos moleculares de 40,000 y 70,000. Esta última, en infusiones, reduce los hematócritos y hace decaer los fibrinógenos, pero, incrementa ligeramente la viscosidad del plasma y es utilizada principalmente para la expansión del volumen. La dextrana con peso molecular de 40,000 atraviesa rápidamente el espacio extravascular, es fácilmente

excretada por los riñones y por lo tanto, tiene limitado poder de expansión, por lo que se utiliza para reducir la viscosidad de la sangre y para mejorar la microcirculación en condiciones de bajo flujo. Actualmente la dextrana está presente en más de 300 aplicaciones clínicas. En humanos, las dextranas con pesos moleculares de 40,000 y 75,000 no causan cambios en el tiempo de sangramiento de Duke o Ivy, pero en pacientes con diátesis hemorrágica, sólo puede utilizarse con seguridad la de 40,000 (Murphy, 1973).

La dextrana de peso molecular de 15,000 se ha reportado que reduce ligeramente la velocidad de sedimentación y la viscosidad de la sangre, pero las dextranas con pesos moleculares entre 45,000 y 450,000 causan incremento en ambos factores, aproximadamente proporcionales al peso molecular. En inyecciones intraparenterales en ratas, las dextranas con pesos moleculares de 40,000 , 75,000 y 200,000, causan edemas, mientras que en infusiones intravenosas lentas causan hipertensión arterial.

Después de examinar los efectos, sobre la coa-

gulación de la sangre de la dextrana de peso molecular de 40,000, se concluyó que no debe administrarse a personas con desórdenes hemorrágicos (Murphy, 1973).

Las dextranas son antigénicas, y esta antigenicidad puede ser utilizada para indicar sus estructuras. La inyección de dextrana con peso molecular de 800,000 causa necrosis del hígado y de las células renales de los perros, mientras que humanos inyectados con dextranas de peso molecular de 700,000 sufren inflamación, urticaria, dolor de cabeza y broncoespasmo. Estos efectos son debidos a la excesiva ramificación de esta dextrana (Murphy, 1973).

Murphy reporta que las dextranas disminuyen los niveles de lípidos y colesterol en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol. Sin embargo, el mismo autor expone que otros investigadores mostraron que la dextrana de peso molecular de 40,000 no afecta los niveles de colesterol en ratas ni humanos.

2.5.2 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS

A. Productos Horneados

Bohn (1961) encontró que la incorporación de pequeñas cantidades de dextrana en masa de pan enriquecido con levadura y gluten produjo pan que era más blando y tenía más volumen y vida útil que el pan ordinario hecho de masa sin dextrana (Glicksman, 1969).

La dextrana utilizada fue la derivada de Leuconostoc mesenteroides: con pesos moleculares de 20,000,000-40,000,000. La cantidad incorporada a la masa osciló de 0.01-10% p/p en base al contenido de harina. La adición de dextrana a las masas incrementó las propiedades de absorción de agua y mejoró su extensibilidad por ablandamiento de gluten (Glicksman, 1969).

Toulmin en 1956, preparó conos de dextrana para helados, la dextrana fue mezclada con azúcar, leche y agua o aceite para dar una goma que puede ser moldeada y horneada (Glicksman, 1969).

B. Bebidas

Hamburg en 1934, utilizó dextrana para reemplazar del 10 al 20% de la malta en la producción de cerveza Pilsener, y reportó que las cervezas con dextrana tenían buen sabor, espuma estable y el mismo color de la cerveza de malta pura. Un derivado de la dextrana, la carboximetildextrana es un efectivo estabilizador de la espuma cuando se agrega en una concentración de 0.5% p/p, a la cerveza o a cualquier otra bebida fermentada a partir de la malta (Glicksman, 1969).

La dextrana ha sido utilizada como un estabilizador de bebidas con leche y chocolate, también se ha encontrado que es efectiva como estabilizador de bebidas suaves y extractos de sabores. Glicksman reporta que es utilizable en la producción de jarabes de azúcar no cristalizables en los cuales la estabilidad y la viscosidad son cualidades importantes. Se ha sugerido el empleo de la dextrana como un agente texturizante bajo en calorías en bebidas libres de azúcar.

C) Confiterías

Mahoney (1937), describió a la dextrana como un constituyente deseable para ser utilizado en todos los productos comestibles en los cuales hay un azúcar como componente, fue valorizada por su capacidad para prevenir la cristalización, mejora la retención de humedad, mejora la textura y mantiene el sabor y apariencia. Fue efectivamente utilizada en dulces, jaleas, mermeladas y frutas en conserva.

Corman y colaboradores (1956), utilizaron dextranacarasa purificada para convertir enzimáticamente una solución de sacarosa, a un aditivo para jarabes de frutas con elevada viscosidad, conteniendo D-Fructosa obtenida de hidrólisis de la molécula de sacarosa. El producto tiene una dulzura realzada, sabor y olor superiores a los de los procesos comunes. La viscosidad puede ser controlada por las condiciones de reacción y por la adición de dextranacarasa.

D). Películas Protectoras de Alimentos a Base de Dextrana.

La dextrana ha sido empleada para preservar una gran variedad de alimentos, porque los protege de la pérdida de agua durante el almacenamiento, y de los efectos deteriorantes de la exposición al aire (Glicksman, 1969).

Se han utilizado soluciones acuosas de dextrana nativa o hidrolizada para preservar camarones y otros productos. Similarmente, otros alimentos, tales como carnes, frutas secas y queso pueden ser cubiertos con una película de dextrana que protege al alimento contra la deshidratación durante el almacenamiento, permitiendo la eliminación de gases desde el alimento (Glicksman, 1969).

Glicksman en 1969 reportó que se habían utilizado dispersiones de dextrana conteniendo antibióticos como una cubierta protectora para comida rápida congelada, tal como pescado o espinacas. Las películas de dextrana prolongan la vida útil del alimento durante el almacenaje y retarda la descomposición durante el descongelado.

2.5.3 OTRAS APLICACIONES

En 1950, se sugirió la utilización de la dextrana como un acondicionador en gomas de mascar así como también en helados y empleada en la manufactura de confituras y cremas sintéticas. En general la dextrana podría reemplazar, por completo o en parte, a las gomas como la arábica, karaya, tragacanto o alginatos.

En el cuadro 6 se presenta un resumen de otras aplicaciones de la dextrana (Glicksman, 1969).

2.5.4 DERIVADOS DE LA DEXTRANA

Entre los derivados más importantes de la dextrana se tienen los ésteres inorgánicos, los complejos de ferridextrana y geles de sephadex.

Muchos ésteres, éteres y mezclas de ambos productos de dextranas fueron descritos por Stahly y Carlson en 1941. algunas de esas mezclas se describieron como aptas para ser usadas en producción de lacas. El éster de ácido sulfúrico de dextrana fue descrito por Grönwall en 1945 como poseedor de una potencia anticoagulante comparable a la de la heparina (Undekofler, 1954).

CUADRO 6
AREAS DE APLICACION Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS
DEXTRANAS

AREA	APLICACION	PROPIEDAD FUNCIONAL
Farmacéutica	Crioprotectivos Composición opaca de Rayos X Vitaminas insolubles en agua Fabricación de tabletas Complejo cloro-dextrana	Inhibe daño de células en congelamiento. Agente suspensor Agente estabilizante. Agente enlazante Inhibe sabor y acción irritante estomacal.
Cosméticos	Preparaciones cosméticas	Suavizador de arrugas
Alimentos	Jarabes y dulces Confección de gomas y jaleas. Helados Elaboración de pudines	Mejoran retención de humedad e inhiben la cristalización. Agente gelatinizante Previene el compactado y la formación de hielo. Agente texturizante.
Aceites de perforación.	Fluidos de perforación Lodos de perforación Soluciones para llenado subterráneos.	Inhiben la pérdida de agua y protegen las paredes. Coloide de protección Incrementar la viscosidad del agua.
Misceláneos	Producción de combustible nuclear. Producción de metal en polvo. Purificación de soda cáustica Manufactura de alumina. Resinas de olefinas polimerizables	Agente complejante. Gel de precipitación; suprime el crecimiento de cristales. Precipita hierro en forma de complejos (Ferro-dextrana). Agente de sedimentación. Sellador y modificador

FUENTE: Glicksman, 1969

Otros derivados que han sido descritos incluyen los acetatos y aril carbamatos, además, se describió el uso de un ester ácido como un medio de intercambio catiónico (Underkofler, 1954)

A pesar de las múltiples utilidades de la dextrana y sus derivados (ver cuadro No. 7), actualmente sus principales usos se limitan a dos: como materia prima para la elaboración del complejo hierro-dextrana utilizado en el tratamiento de anemias, principalmente en animales, y como base para la elaboración de mallas moleculares de uso común en cromatografía en gel (filtración molecular) y purificación de productos biológicos, siendo sustituida en el área alimenticia y farmacéutica por otro polisacárido microbiano, la goma xantana, producida por la bacteria Xantomonas campestris (Quintero, 1985).

Las propiedades más importantes de la goma xantana son: alta capacidad como viscosificante; pronunciada pseudoplasticidad; elevada estabilidad de la viscosidad aparente dentro de ciertos rangos de temperatura, pH y concentración de sales; sinergia en cuanto a viscosidad y fuerza del gel al combinarse con otras gomas naturales (Quin-

tero, 1985).

De la información presentada en las secciones 2.5.3 y 2.5.4 sobre las aplicaciones de la dextrana y sus derivados puede observarse que su producción representaría una alternativa tecnológica atractiva para El Salvador.

CUADRO 7
DERIVADOS DE LA DEXTRANA Y SUS APLICACIONES

DERIVADOS	APLICACION
<u>ESTERES</u> Triacetatos de Dextrana Esteratos y palmitatos de dextrana Sulfato-dextrana Fosfato-dextrana Nitrato- dextrana o Nitrato Sulfato-dextrana	Formador de películas Forma un recubrimiento químico insoluble en agua y soluciones jabonosas, pero soluble en solventes no polares. Fabricación de impermeabilizantes. Proporcionan cohesión al polietileno en superficies metálicas. Tratamiento de paperas y de úlceras pépticas. Comas de alta viscosidad, inhibe actividad péptica Geles impulsoras y Explosivas.
<u>ENTERES</u> sulfoalquildextrana Bencildextrana Hidroxialquildextranas Carboximetildextrana (sal y forma ácida)	Emulsiones fotográficas con incremento en el poder de recubrimiento. Amplía al tiempo de acción de medicamentos. Expansores del plasma sanguíneo con mejoramiento en la calidad de almacenamiento. - Aglutinante auxiliar en tabletas. - Estabilizador en helados - Vehículos en antibióticos. - Pesticidas y termicidas. - Estabilizador de látex - Películas solubles en agua para empaques de alimentos, jabón, etc.
<u>MISCELANEOS</u> Dialdehido-dextrana Dicarboxido-dextrana Iodo- dextrana	- Prolonga la acción de medicinas por reacción con novocaína, etc. - Prolonga la acción de medicamentos. Compuesto de Iodo soluble en agua, no irritante y no tóxico.

CAPITULO III

NUTRICION Y EFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES

3.1 GENERALIDADES

Alrededor de 1880, Van Tieghem dió la primera descripción adecuada del microorganismo causante de la fermentación de las soluciones de sacarosa para producir dextranas; él llamó a este microorganismo: Leuconostoc mesenteroides (Aurice, 1982).

Las bacterias del género Leuconostoc, especialmente Leuconostoc mesenteroides y Leuconostoc dextranicum han adquirido gran importancia en la producción de dextrana a partir de 1940, cuando se descubrió que ésta podía ser utilizada como expansor del plasma sanguíneo (Spencer, 1967).

3.2 BACTERIAS DEL GENERO LEUCONOSTOC

El género Leuconostoc puede dividirse en dos grupos: El primer grupo comprende cinco especies estrechamente relacionadas y difíciles de diferenciar entre sí. Se encuentran en soluciones sacarosas viscosas, vegetales fermentados, en leche y productos lácteos.

El segundo grupo lo forman microorganismos encontrados en vino y pertenecen a una especie: Leuconostoc oenos.

Todas las bacterias del género Leuconostoc son ácido-lácticas, de las cuales sólo el L. mesenteroides y el L. dextranicum tiene la habilidad de producir dextrana cuando crecen en presencia de sacarosa.

La dextrana producida por algunas especies o variedades de las bacterias puede ser un polímero soluble en agua, o puede ser una dextrana capsular insoluble en agua. En algunos casos, ambas se producen simultáneamente (Honing, 1969).

3.3 LEUCONOSTOC MESENEROIDES

Este microorganismo fue llamado también Ascococcus mesenteroides por Tesenkovskii en 1879 y Betacoccus arabinosa por Orla-Jensen en 1919 (Bergey's manual, 1974).

Las células de Leuconostoc mesenteroides son cocos de forma esférica o lenticular, su tamaño oscila entre 0.5 y 1.2 micras de diámetro, dispuestas usualmente como diplococos y en cadenas cortas. Suelen ser Gram

positivos. En la figura 7, puede verse un cultivo típico de L. mesenteroides (Bergey's manual, 1974).

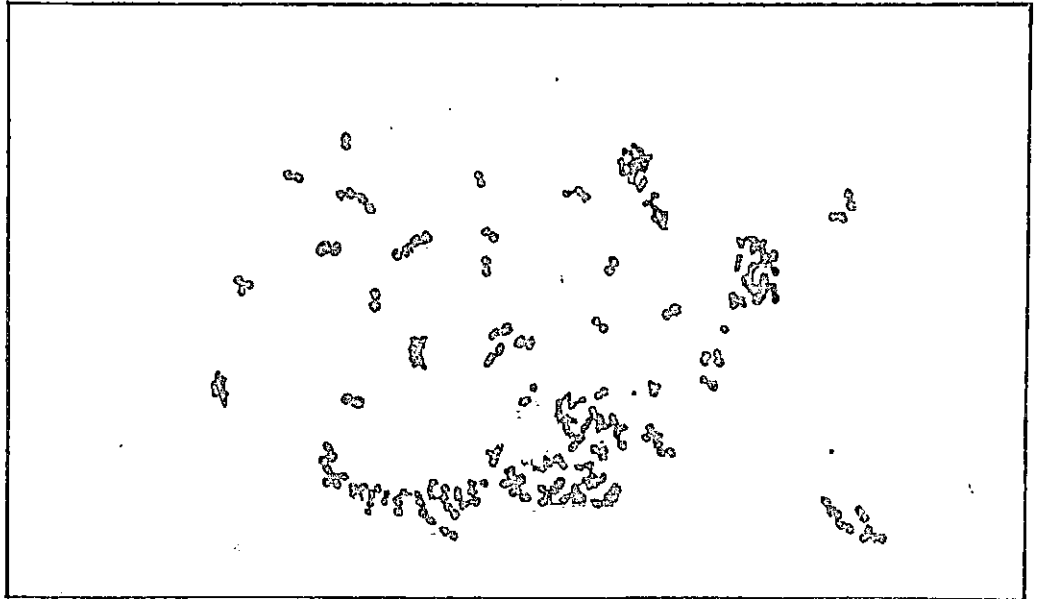


FIGURA 7: Cultivo típico de Leuconostoc mesenteroides
Ampliación x1250.

FUENTE: Casida, 1968.

Las cadenas se rodean de una cubierta gruesa, gelatinosa, conocida como dextrana.

L. mesenteroides, fermenta la glucosa, la maltosa, la lactosa, la sacarosa, el manitol y la arabinosa con formación de ácido y gas. Se encuentra en materiales vegetales en fermentación y en soluciones azucaradas. Están clasificados como microorganismos anaerobios facultativos (Bergey's Manual, 1974).

En medios de cultivo sólido de sacarosa-agar, se forman diferentes tipos de colonias, cuya morfología depende de la concentración de sacarosa, de la edad del cultivo, de la cepa y del tipo de dextrana producida. Algunas variedades, particularmente las que provienen de fuentes lácteas, producen poca dextrana. En la Figura 8 se presentan 3 tipos de colonias de L. mesenteroides.

Otras variedades tienen un metabolismo oxidativo aeróbico utilizando 1 mol de O_2 por mol de glucosa y produciendo cantidades equimolares de CO_2 , lactato y acetato. Estas variedades tienen además, actividad peroxidativa (Bergey's manual, 1974).

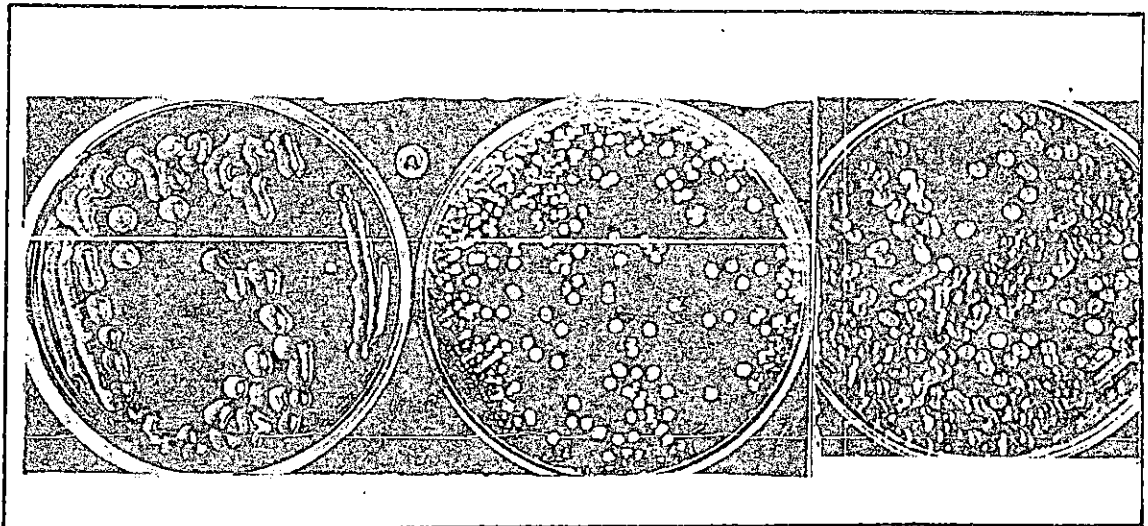


FIGURA 8: Colonias típicas de Leuconostoc mesenteroides aisladas de jugo de caña.

FUENTE: Walter, 1972.

El número de aminoácidos esenciales para el crecimiento es pequeño, únicamente la valina y el ácido glutámico son requeridos por todas las variedades (Bergey's manual, 1974).

En el cuadro 8 se presentan los requerimientos nutricionales de L. mesenteroides.

3.3.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE L. MESENTEROIDES

Ninguna variedad soporta calentamientos de 55°C por 30 minutos, aunque cultivos viscosos en ingenios pueden soportar temperaturas hasta de 80-85°C.

El rango de temperatura para el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides está entre los 10°C y los 37°C, pero el valor óptimo es de 25°C.

La fermentación viscosa de dextrana se ve favorecida a temperaturas que oscilan entre los 20°C y 25°C, a temperaturas mayores el rendimiento es menor (Honing, 1969).

3.3.2 EFECTO DEL PH SOBRE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES

Las bacterias ácidos lácticas son microorganismos capaces de crecer sobre un amplio rango de pH en la

CUADRO 8
REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE L. mesenteroides

COMPUESTO	% p/p	COMPUESTO	% p/p
<u>Fuentes de Energía</u>	(2.5)	<u>Aminoácidos</u>	(0.3144)
Glucosa	2.5	DL - α -alanina	0.0200
<u>Fuente de Nitrógeno</u>	(0.3)	L-Arginina	0.0242
Cloruro de amonio	0.3	L-Asparagina	0.0400
<u>Minerales</u>	(0.144)	L-Acido aspártico	0.0100
Fosfato potásico	0.060	L-Cisteína	0.0050
Fosfato dipotásico	0.060	L-Acido glutámico	0.0300
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.020	Glicina	0.0100
Sulfato de hierro heptahidratado	0.001	L-Histidina HCl	0.0062
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.002	DL-Isoleucina	0.0250
Cloruro de sodio	0.001	DL-Leucina	0.0250
<u>Sales Orgánicas</u>	(2.000)	L-Lisina HCl	0.0250
Acetato de sodio	2.000	DL-Metionina	0.0100
<u>Vitaminas</u>	(0.0004211)	DL-Fenilalanina	0.0100
Tiamina HCl	0.0000500	L-Prolina	0.0100
Piridoxina. HCl	0.0001000	DL-Serina	0.0050
Piridoxamina. HCl	0.0000300	DL-Treonina	0.0200
Piridoxal. HCl	0.0000300	DL-Triptófano	0.0040
Pantotenato de calcio	0.0000500	L-Tirosina	0.0100
Riboflavina	0.0000500	DL-Valina	0.0250
Acido nicotínico	0.0001000	<u>Purinas y Pirimidinas</u>	(0.004)
Acido p-aminobenzoico	0.0000100	Sulfato de adenina hidratado	0.001
Biotina	0.0000001	Guanina HCl dihidratado	0.001
Acido fólico	0.0000010	Uracil	0.001
		Xantina HCl	0.001

FUENTE: Roger and Stanier, 1976.

presencia de ácidos orgánicos. El mecanismo de tolerancia ácida de este grupo de microorganismos no está aún bien comprendida (Mc Donald, 1990).

Mc Donald y colaboradores en 1990, determinaron que el pH en el interior de la célula de Leuconostoc mesenteroides responde a los cambios del pH en el exterior de la célula, creados por el propio microorganismo o por la adición al medio de crecimiento, de ácido láctico o acético o por cualquiera de sus sales. Cuando el pH externo decrece el pH celular interno decrece también hasta un valor mínimo de 4.5, (como se observa en la figura 8a) al que le corresponde un pH externo de 3.5, después del cual ya no se ejerce efecto de disminución del pH interno por el pH externo.

También se ha reportado que el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides se detiene cuando el pH interior de la célula alcanza valores entre 5.4 y 5.7, en la figura 8a se observa que a ese pH interno corresponde un pH externo de 4.3, pH al cual también se detiene el proceso fermentativo de producción de dextrana.

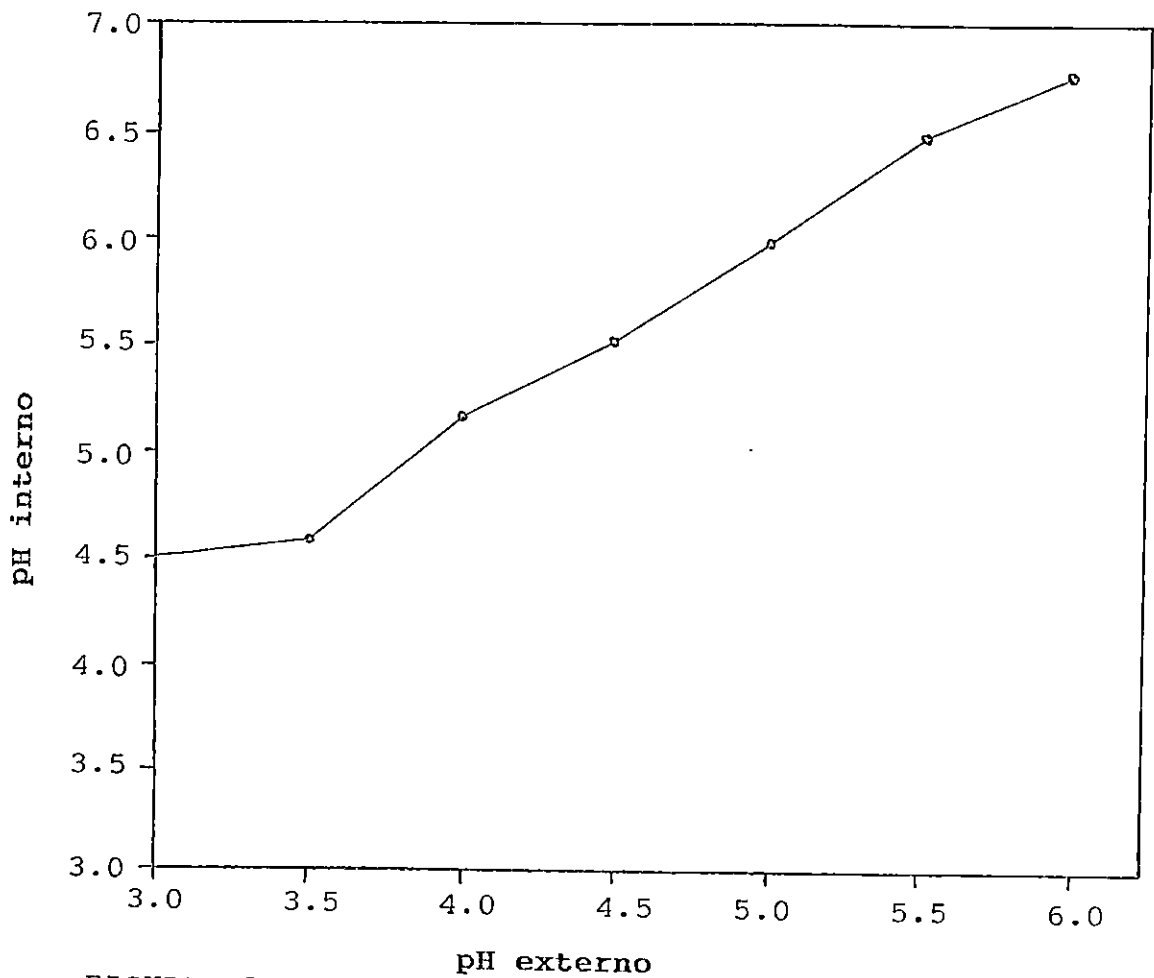


FIGURA 8a: Efecto de la variación del pH externo sobre el pH interno en Leuconostoc mesenteroides
FUENTE : Mc Donald, 1990

3.3.3 CULTIVO DE LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES

Se han formulado varios medios de cultivo y entre éstos, uno de los medios de aislamiento para Leuconostoc mesenteroides es el propuesto por Hasid/Baker (Aurice, 1982) y que puede verse en el Cuadro 9.

CUADRO 9
MEDIO DE AISLAMIENTO HASID/BAKER PARA
Leuconostoc mesenteroides

CONTENIDO	%p/p
Sacarosa	6.00
Extracto de levadura	0.25
Fosfato de potasio	0.50
Sulfato de magnesio	0.02
Sulfato de amonio	0.06
Agar	1.50

FUENTE: Prescott, 1954

Para su desarrollo se muestra en el cuadro 10, la composición de un medio que puede utilizarse sólido o líquido (Prescott, 1953).

CUADRO 10
MEDIO DE DESARROLLO PARA Leuconostoc mesenteroides

CONTENIDO	MEDIO SOLIDO (%p/p)	MEDIO LIQUIDO(%p/p)
Sacarosa	2.00	2.00
Extracto de levadura	0.50	0.50
Fosfato monopotásico	0.25	0.50
Triptona	0.25	0.25
Agar	2.00	0.00
pH inicial (aprox.)	7.4	7.4

FUENTE: Prescott, 1953

La Northern Utilization Research and Development, División del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Illinois, desarrolló un medio conocido como de "Basamin Busch", cuya composición se detalla en el Cuadro 11.

CUADRO 11

MEDIO DE DESARROLLO " BASAMIN / BUSCH " PARA Leuconostoc
mesenteroides

CONTENIDO	% p/p
Sacarosa	3.000
Extracto de levadura	0.500
Fosfato dipotásico	3.000
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.020
Cloruro de sodio	0.001
Sulfato de hierro heptahidratado	0.001
Sulfato de manganeso hidratado	0.001
pH inicial	7.4

FUENTE: Prescott, 1953

Este medio se puede utilizar en fermentaciones llevadas a cabo a nivel de laboratorio o cuando se prepara un inoculante para aplicaciones a nivel de planta piloto (Prescott, 1953).

El precultivo en el cual la bacteria es producida puede ser provisto con una fuente de carbono distinta a la sacarosa, aunque ésta siempre es utilizada para la producción de dextrana. Por ejemplo, se sabe que cua

tro cepas puras de L. mesenteroides fueron cultivadas en un substrato conteniendo 10% de L-arabinosa o D-xilosa; otros cultivos preliminares fueron preparados utilizando 0.01% - 2.0% de acetato de sodio, D-glucosa, D-fructosa o sacarosa en bajas concentraciones, como fuente de carbono. Cepas de L. mesenteroides, también han sido cultivadas en ácidos grasos de bajo peso molecular, ácidos di y tricarbónicos y alcoholes de bajo peso molecular. Sin embargo, concentraciones bajas de sacarosa, que no conducen a la formación de dextrana, son comúnmente más utilizadas. Un precultivo utilizado por Farbwerke Hoescht Akt para multiplicar L. mesenteroides consiste en extracto de levadura, 0.15%; extracto de carne, 0.15%; cloruro de sodio, 0.35%; fosfato monopotásico, 0.13%; fosfato dipotásico, 0.1%; y sacarosa, 1% (Murphy, 1973).

3.3.4 MANTENIMIENTO DE LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES

La cepa del microorganismo es mantenida en tubos conteniendo medio sólido inclinado, cuya composición se detalla en el cuadro 12.

CUADRO 12
MEDIO DE MANTENIMIENTO PARA L. mesenteroides

CONTENIDO	CANTIDAD (g)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Azúcar morena	100
Agar	20
Agua destilada para completar	1000
pH	7-7.2

FUENTE: Prescott, 1953

El medio se esteriliza durante 15 minutos a 121°C. El microorganismo es desarrollado originalmente en el mismo medio pero, sin agar, en donde se deja por espacio de 18 a 24 horas a 25°C; posteriormente, se pasa a tubo inclinado, se coloca en refrigeración y se resiembró cada uno a dos meses para un mantenimiento satisfactorio de la cepa.

CAPITULO IV

METODOS DE PRODUCCION

La dextranas nativas se pueden producir por procedimientos de fermentación, o por un método indirecto que implica la obtención de dextransacarasa en condiciones óptimas para su elaboración, seguida de síntesis enzimática (Prescott, 1955).

El procedimiento enzimático tiene la ventaja de producir directamente un porcentaje razonable de dextrana con un peso molecular promedio del orden del necesario para fines clínicos, resultando por esta razón menos complicado (Prescott, 1955).

Para producir dextrana clínica, es necesario efectuar un fraccionamiento en ambos métodos de obtención. El fraccionamiento puede hacerse a través de una hidrólisis ácida controlada, depolimerización enzimática o por métodos físicos.

En algunos casos se utilizan métodos de producción que involucran el uso de iniciadores patrones de dextrana de pesos moleculares conocidos, a fin de obtener dextranas dentro de un rango de pesos moleculares deseados.

4.1 MATERIAS PRIMAS

La sacarosa es el principal azúcar utilizado como materia prima para formación de dextrana, aunque según Bauer y Owen, puede utilizarse en la forma de melazas o como sacarosa refinada, forma con la cual, se han hecho la mayoría de investigaciones. Además, se han empleado jugos de plantas como materia prima en diferentes estudios, por ejemplo, aguamiel, jugo de remolacha de azúcar, vino y jugo de caña de azúcar (Underkofler, 1954).

La producción de dextrana a partir de azúcar refinada de caña ha mostrado ser estimulada por ciertos productos crudos de plantas, incluyendo azúcar bruto, azúcar de maple y un extracto de higos (Underkofler, 1954).

4.2 MECANISMO DE LA FERMENTACION

El mecanismo de la fermentación en la producción de dextrana a partir de sacarosa no está aún bien comprendido. Kagan y otros establecieron que Leuconostoc mesenteroides era capaz de fijar fósforo inorgánico en la presencia de sacarosa, pero no de glucosa ni fructuosa. Más tarde, concluyeron en sus estudios que el azúcar fosforilada no participaba en la síntesis de dextrana.

En 1950, Hassid estableció que la reacción involucra la ruptura del enlace $\alpha(1,4)$ glucosafructosa en la molécula de sacarosa y la formación de un enlace glucosídico $\alpha(1,6)$, entre las moléculas de glucosa para formar dextrana. Evidentemente, sólo la molécula de glucosa de la sacarosa es utilizada en la formación de la molécula de dextrana. Ni la glucosa sola, ni las mezclas glucosa-fructosa formarán dextrana, la sacarosa es esencial.

La reacción para la formación de dextrana a partir de sacarosa por la acción de la dextransacarasa se muestra en la figura 9.

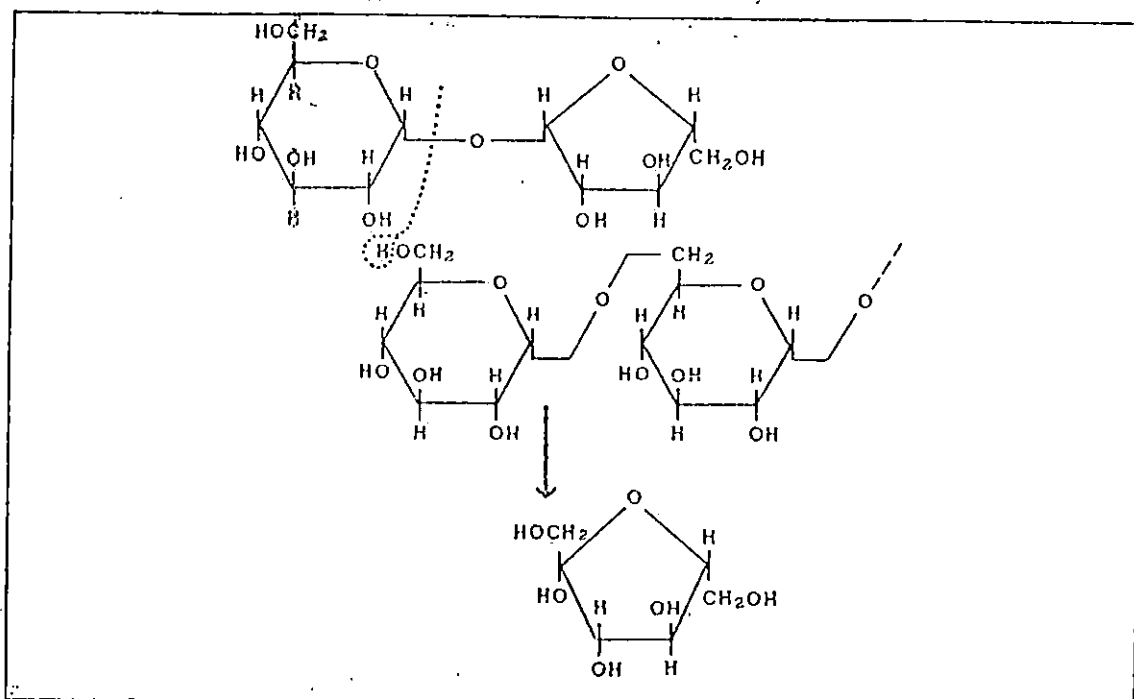


FIGURA 9: Reacción de formación de dextrana a partir de la sacarosa.

FUENTE: Underkofler, 1954

4.3 PROCESO FERMENTATIVO.

La fermentación en sí misma es muy simple. Un medio de sacarosa y extracto de levadura, esterilizado y amortiguado se inocula con Leuconostoc mesenteroides y se deja que crezca sin regulaciones: no se utiliza ni aireación, ni agitación; tampoco se controla la temperatura o el pH. Las células crecen en el medio lo cual es indicado por la caída del valor de pH, produciendo al mismo tiempo, dextran sacarasa, que hidroliza la sacarosa remanente y polimeriza la glucosa, formando la dextrana. Datos típicos de este fenómeno pueden observarse en la Figura 10. Aunque toda la sacarosa es consumida, al final, el rendimiento de dextrana es solamente alrededor del 25%, comparado con el rendimiento estequiométrico de 49%. Los datos de la figura fueron obtenidos utilizando una concentración inicial de sacarosa de 170 g /L.

La dextrana nativa formada se precipita con metanol o etanol y se separa así del líquido de fermentación (Landon y Webb, 1990).

La producción de dextrana consta de tres etapas principales. La primera es la propagación del microorganismo Leuconostoc mesenteroides a partir de una cepa pura, hasta ob

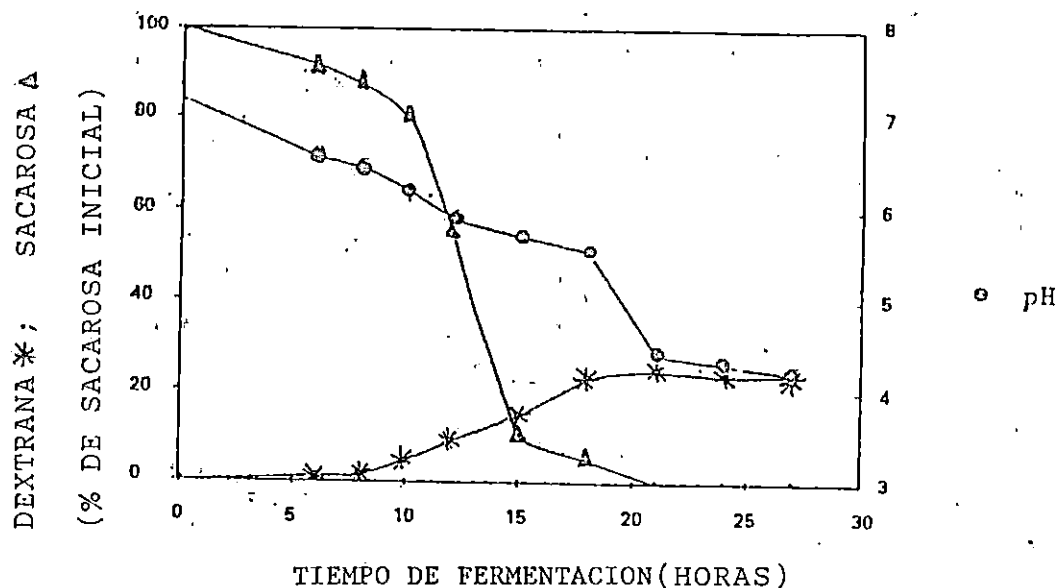


FIGURA 10: Curvas de variación de pH y concentración de sacarosa y dextrana para una fermentación típica de sacarosa utilizando Leuconostoc mesenteroides.

FUENTE: Landon y Webb, 1990.

tener una cantidad suficiente de células para que sintetizen una elevada concentración de enzima dextransacarasa.

En la segunda etapa se realiza la síntesis enzimática de la dextrana en una solución de sacarosa que contiene además, extracto de levadura, fosfato como amortiguador y trazas de sales de algunos metales como magnesio, hierro, manganeso, e hidróxido de sodio para neutralizar el exceso de ácido formado durante la etapa de fermentación anterior; en la tercera etapa se efectúa la recuperación de la dex-

trana por medio de una precipitación con alcohol etílico o metílico, luego se lleva a cabo la purificación que comprende varias etapas de lavado, reprecipitación y disolución, por último la dextrana purificada se seca.

4.3.1 PROPAGACION DE LEUCONOSTOC MESENEROIDES

El microorganismo utilizado generalmente en la industria es Leuconostoc mesenteroides. Este coco produce una dextrana, en la que predominan los enlaces α (1,6) a partir de una solución nutritiva (medio de cultivo) que contiene sacarosa, minerales, vitaminas y agar (Prescott, 1954).

Dicho medio se esteriliza durante 15 minutos a 121°C en autoclave. El organismo es trasladado del medio sólido al medio líquido como el que se muestra en el cuadro 10 (sección 3.3.3), en donde se desarrolla el microorganismo durante 18 a 24 horas a temperatura de 25°C .

La preparación del inoculante se inicia transfiriendo células de cultivo en medio de mantenimiento líquido al medio de desarrollo del inoculante, dejándolo crecer, durante 24 horas.

El volumen del inóculo es el 10% del volumen total del medio después de la inoculación. El traslado se lleva a cabo en etapas hasta alcanzar el volumen final del cultivo.

La composición del medio para el crecimiento del inóculo y para la producción de dextrana soluble en agua, se muestra en el cuadro 13 (Murphy, 1973).

CUADRO 13
COMPOSICION DEL MEDIO LIQUIDO DE DESARROLLO DEL INOCULANTE
PARA PRODUCCION DE DEXTRANA

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Sacarosa	100.0
Extracto de levadura	2.5
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Fosfato dipotásico	5.0
Agua destilada	1000.0
pH inicial	7.0

FUENTE: Muryphy, 1973

4.3.2 SINTESIS DE DEXTRANA NATIVA

El medio de fermentación tiene la misma composición que el medio del inóculo. Este medio se esteriliza a 121°C, por 20 minutos. El cultivo se incuba a 25°C, hasta que el pH alcanza el valor de 4.8 (Prescott, 1954).

Durante la fermentación, el pH decrece debido a la producción de ácidos orgánicos, a la vez que aumenta la viscosidad del medio a causa de la síntesis de dextrana (Prescott, 1954).

Utilizando melaza como substrato se obtiene una dextrana que tiene varios usos técnicos. Jirícek, desarrolló un procedimiento empleando en el medio, 0.5% a 0.7% de carbonato de calcio, que actúa como amortiguador y estimulante de la dextranasa, permitiendo utilizar altas concentraciones de sacarosa y consecuentemente obtener altos rendimientos de dextrana (Murphy, 1973).

4.3.3 PRODUCCION DE DEXTRANA CLINICA

La dextrana nativa normalmente tiene un peso molecular alto, mayor de 2 millones lo que la hace inapropiada.

piada para sustituir el plasma sanguíneo. Hasta 1973 se han preparado dextranas de pesos moleculares apropiados para uso clínico, entre 70,000 y 40,000, por depolimerización controlada de las dextranas nativas. Las investigaciones posteriores fueron dirigidas a la síntesis en un solo paso, es decir, obtener dextrana clínica a partir de sacarosa. En el cuadro 14, se presentan medios de cultivos utilizados para obtener dextranas con pesos moleculares dentro de un rango determinado.

CUADRO 14

MEDIOS DE CULTIVO PARA Leuconostoc mesenteroides
QUE PUEDEN SER UTILIZADOS PARA CONTROLAR EL PESO
MOLECULAR DE LA DEXTRANA PRODUCIDA

PESO MOLECULAR	MEDIO DE CULTIVO
Menor de 60,000	20-80% p/p de sacarosa 0.1 a 10% p/p de D-glucosa D-fructosa Maltosa Isomaltosa
10,000-50,000	20-40% p/p sacarosa 1-6% p/p D-glucosa 0.5-4% p/p dextrana de bajo peso molecular.
40,000-3000,000 con rendimiento de 85 y 90%	10% p/p de sacarosa 2% de dextrana con un peso molecular de 20,000

FUENTE: Murphy, 1973.

Utilizando este procedimiento, el peso molecular del producto puede calcularse con la ecuación 1

$$M1 = M2 (1 + C1/C2) \quad (1)$$

donde:

M1 = Peso molecular del producto

M2 = Peso molecular de la dextrana iniciadora

C1 = Concentración de las unidades glucopiranosiles

C2 = Concentración de la dextrana iniciadora

4.3.4 RECUPERACION DE LA DEXTRANA

Al medio agotado (posterior a la fermentación), que contiene dextrana, azúcares no fermentados, productos de fermentación (como los ácidos acético y láctico, etanol y otras sustancias), se les agrega una cantidad aproximadamente igual de metanol o etanol para precipitar la dextrana (Prescott 1954).

La dextrana nativa precipitada se disuelve en agua exenta de pirógenos (agua bidestilada con un contenido de sólidos totales inferior a 1.5 ppm) que se encuentra a una temperatura entre 60-70°C. Se repite la precipitación con metanol o etanol para eliminar las impurezas ocluidas en el primer precipitado (Prescott, 1954).

Durante el secado la dextrana no debe estar expuesta por más de 5 s a temperaturas mayores de 92°C.

La dextrana es altamente higroscópica, en consecuencia, se debe envasar en recipientes que aseguren una protección adecuada contra la absorción de humedad (Prescott, 1954).

La Figura 11, es el diagrama de bloques del proceso en el cual se presentan las etapas anteriormente descritas.

4.4 PROCESO ENZIMATICO PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANA

La Dextrana puede producirse por un método indirecto que implica la producción de la dextransacarasa en un fermentador discontinuo a pH constante. Después, la enzima es concentrada y purificada para producir el polímero en un fermentador principal libre de células. Los reactores utilizados para este propósito incluyen a los de lecho empacado con dextransacarasa inmovilizada y los de lecho cromatográfico móvil (Landon y Webb, 1990).

El procedimiento para la síntesis enzimática de dextrana lleva implicadas cuatro fases, la primera, consiste en la producción de dextransacarasa por vía fermentativa, utilizando para ello, el microorganismo Leuconostoc mesenteroi-

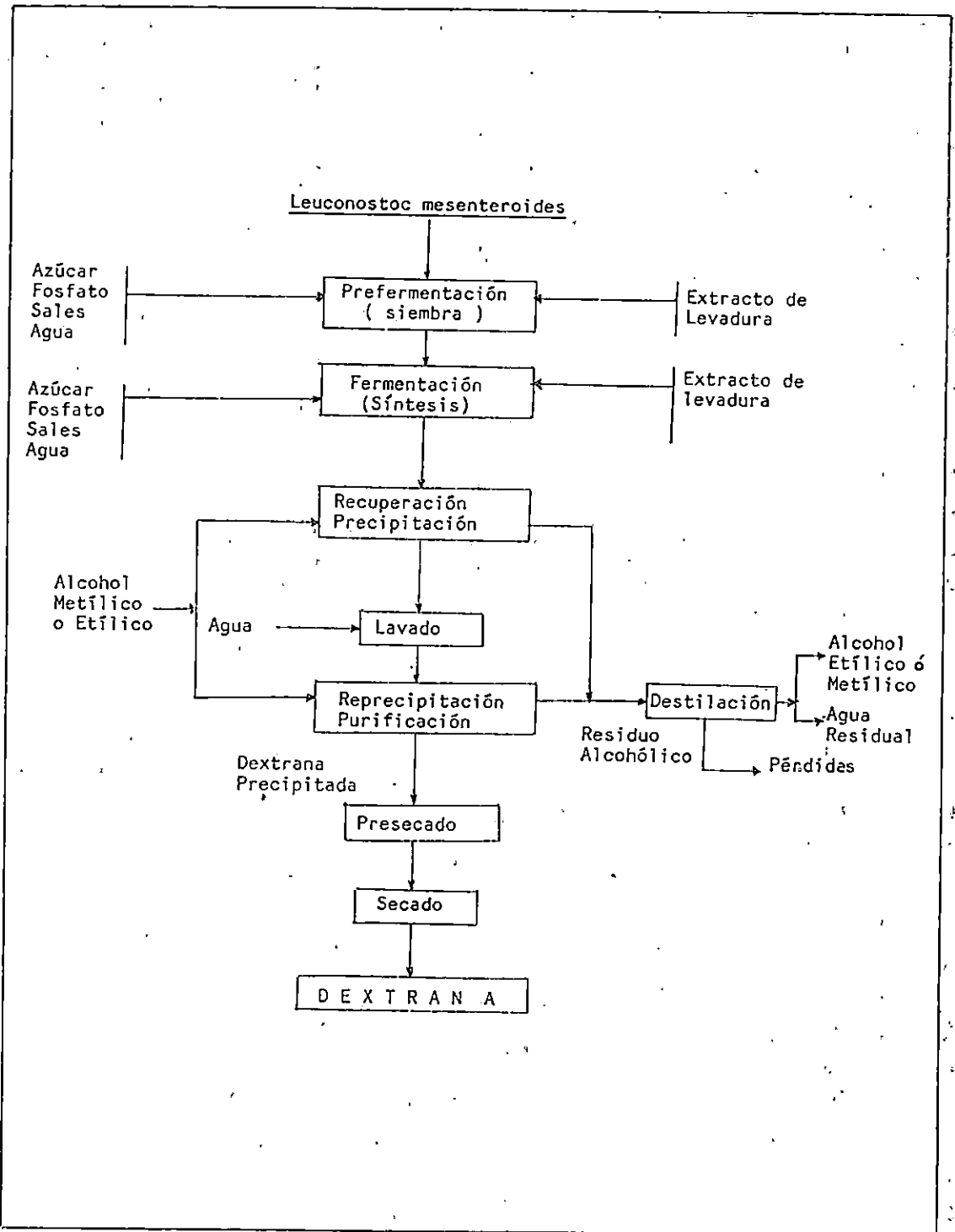


FIGURA 11: Diagrama de bloques del proceso de producción de Dextrana a partir de azúcar cruda aplicando el proceso fermentativo.

des. La segunda etapa es la eliminación de las células bacterianas del medio de producción; la tercera, implica la síntesis de dextrana en una mezcla de reacción que contiene sacarosa, agua y dextransacarasa, en condiciones cuidadosamente reguladas. La cuarta etapa consiste en la precipitación, lavado y secado de la dextrana (Prescott, 1954).

4.4.1 PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA

La dextransacarasa utilizada para la síntesis enzimática de dextrana es producida por el microorganismo Leuconostoc mesenteroides. El medio de cultivo utilizado a escala de laboratorio consiste de: sacarosa como fuente de carbono; extracto de levadura como compuesto nitrogenado y fuente de cofactores, Na_2HPO_4 ó K_2HPO_4 , como amortiguador y trazas de sales inorgánicas como puede verse en el Cuadro 15 (Landon y Webb, 1990).

CUADRO 15
COMPOSICION DEL MEDIO PARA PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA

C O N T E N I D O	C A N T I D A D
Sacarosa	10 g / L
Extracto de levadura	40 g / L
Fosfato dipotásico	20 g / L
Sales para 100 ml de agua destilada	0.5% v/v
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g; NaCl, 0.2 g;	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g	

FUENTE: Barker, 1990.

Después de preparado el medio, el pH se ajusta a valores entre 6.9 y 7.0 y se esteriliza a 121°C por 20 minutos.

La temperatura utilizada para la producción de la enzima es de 25°C, el inóculo generalmente se prepara sembrando un volumen superior al 5%. Los cultivos se desarrollan durante 12 horas en cada una de las fases de preparación del iniciador (Prescott, 1954).

Se ha demostrado que el pH tiene un gran efecto en la producción de dextransacarasa. Tsuchiya y colaboradores llevaron a cabo fermentaciones en reactores discontinuos a valores de pH constante entre 6.1 y 6.9, demostrando que la máxima concentración de enzima se alcanza a pH de 6.7 y la máxima velocidad de producción a pH de 6.1; sin embargo, estos no son los valores de pH óptimos para la retención de la actividad enzimática como puede verse en la figura 12, en donde, se observa que a pH 5.2, la enzima mantiene su actividad (Landon y Webb, 1990), pudiéndose mantener inalterada en filtrados de cultivo, durante 24 horas e incluso más, a una temperatura de 25°C (Lazic y Veljkovic, 1991).

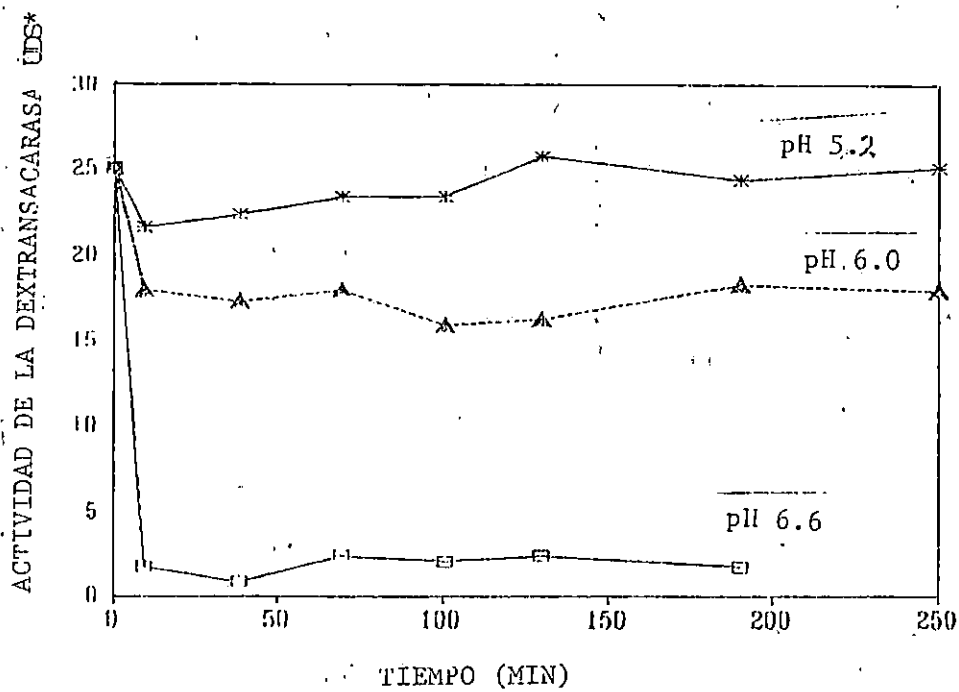


Figura 12: Efecto del pH sobre la estabilidad de la dextranasacarasa a 25°C.

FUENTE: Landon y Webb, 1990.

4.4.2 ELIMINACION DE BACTERIAS

Se puede efectuar una eliminación absoluta de células empleando filtros Seitz, de membrana o moleculares. Sin embargo en la práctica, la eliminación se realiza por centrifugación.

Tras la eliminación de células y materia en suspen-

UDS* Unidades de Dextranasacarasa (ver sección 4.4.3)

sión se ajusta inmediatamente el pH del filtrado a 5-5.2. El líquido que contiene la enzima se puede conservar a este pH a una temperatura de 15°C, durante 30 días o más sin pérdida apreciable de la actividad (Prescott, 1954).

4.4.3 SINTESIS DE DEXTRANA

Para la síntesis del polímero a través de un proceso libre de células, se ha calculado que la actividad de la dextranasa debe ser aproximadamente 5 UDS/ml (una unidad UDS ha sido definida como la cantidad de enzima que convierte un miligramo de sacarosa a dextrana en una hora a pH de 5.2 y a 30°C, en una solución con 10% de sacarosa), en el fermentador principal, para mantener una producción aceptable, dicho valor es alcanzado inoculando un volumen del 4% del volumen total (Landon y Webb, 1990).

4.4.4 PRECIPITACION, LAVADO Y SECADO DE LA DEXTRANA

Generalmente, la polimerización se completa en 4-5 horas, en experimentos a escala de laboratorio. Posteriormente a esto, el polímero formado se precipita con soluciones de etanol cuya concentración depende del

peso molecular de la dextrana que se desea precipitar; se disuelve en agua libre de pirógenos y por último, se somete al proceso de secado que puede ser por Spray o liofilización (CODETEC, 1991).

4.5 METODOS DE DEPOLIMERIZACION DE DEXTRANA NATIVA

4.5.1 METODO QUIMICO DE DEPOLIMERIZACION DE DEXTRANA NATIVA

El método clásico para producir dextrana adecuada para uso clínico es por depolimerización parcial de dextrana nativa, por hidrólisis ácida catalizada. El peso molecular deseado es obtenido limitando el tiempo de reacción, la temperatura y la concentración del ácido. La mezcla de fermentación puede ser hidrolizada directamente. Se han obtenido altos rendimientos limitando la extensión de la hidrólisis y rehidrolizando las fracciones de más alto peso molecular recuperadas. La hidrólisis en presencia de un alcohol soluble en agua o cetona, (que aparentemente inhiben la división) permite productos más uniformes y de más alta viscosidad. Un proceso involucrando hidrólisis y pasos alternos con extracción por solvente incrementa el rendimiento

de dextrana en el rango de peso molecular clínico, donde, la dextrana de bajo peso molecular es extraída del lecho del solvente (Murphy, 1973).

La cinética de la reacción de depolimerización ácida catalizada ha sido estudiada por Wolff, Kobayashi y Jones. La energía de activación para la reacción es de 33 Kcal /mol (Murphy, 1973).

Las soluciones de dextrana son simultáneamente depolimerizadas y depirogenizadas por calentamiento en presencia de peróxido de hidrógeno. Las sales de hierro y carbonato de calcio, mantienen el pH en 7.0 en la mezcla que se depolimeriza, y pueden ser utilizadas junto con el peróxido (Murphy, 1973).

La degradación parcial de la dextrana es afectada por tratamientos con hidróxidos de metales alcalinos. Tratamientos con hidróxido de potasio a 26°C, reducen el peso molecular de la dextrana de 5×10^6 a 1.5×10^5 (Murphy, 1973).

La dextrana es depolimerizada por alcoholólisis con alcoholes polihídricos, los cuales, en caliente se comportan como solventes y reactantes. Pequeñas cantidades de ácido catalizan la reacción. La depolimerización puede también, llevarse a cabo por ca-

lentamiento en presencia de agua y sales neutras a 120°C-160°C, bajo presión (Murphy, 1978).

4.5.2 METODO ENZIMATICO PARA DEPOLIMERIZAR LA DEXTRANA NATIVA.

Las Enzimas de mohos, tales como Penicillium funiculosum y Verticillium coccorum, son capaces de degradar la dextrana. Dextranasas eficaces son elaboradas por cuatro cepas de P. funiculosum, cuatro cepas de P. lilacinum y una cepa de P. verruculosum y una de Spicaria violacea. Dextranasas de una cepa de P. lilacinum y una cepa de P. funiculosum hidrolizan la dextrana producida por L. mesenteroides a mezclas complejas de cadenas principales y oligosacáridos enlazados. En la proximidad de los puntos de ramificación α -D-(1,3), algunos enlaces α -D-(1,6) de la cadena principal son resistentes a la hidrólisis por estas dextranasas (Murphy, 1978).

Dextranasas pueden ser aisladas de especies de Chaetomium, Streptomyces, Humicola, Sporotrichum, Anixella, Macrosporium, Gibberella, Gloesosporium y Glomerella. Una dextranasa de Chaetomium gracile F218-8 baja la viscosidad de una solución de dextra

na a la mitad de su valor inicial en 13 minutos (Murphy, 1978).

El Aspergillus wentii, elabora una endodextranasa que degrada a pesos moleculares relativamente bajos. Dextranas clínicas son producidas por adición de dextranasa a la solución de cultivo, que contiene dextrana, después de ebullición para inactivar cualquier enzima bacteriana y enfriarla. Una refinación de este proceso produce dextrana con una enzima de Leuconostoc mesenteroides y la degrada con dextranasa de Aspergillus wentii concurrentemente. Una glucoamilasa concentrada de Aspergillus niger degrada completamente la dextrana a D-glucosa (Murphy 1973).

Dextrana (1,6)-glucosidasa aislada del hígado de personas y conejos rompe no sólo los enlaces α -D-(1,6) glucosídicos sino también los enlaces α -D-(1,3). Normalmente, la dextranglucosidasa animal hidroliza los enlaces α -D-(1,3) más rápido que los enlaces α -D-(1,2) o α -D-(1,6), pero si la dextrana es preincubada con concanavalina A, este orden es invertido, aparentemente porque la concanavalina A forma un complejo con el terminal no reductor de las unidades de glucosa en las dextranas con

enlaces α -D-(1,3), y retarda la actividad de la enzima (Murphy, 1973).

4.5.3 METODOS FISICOS DE DEPOLIMERIZACION DE DEXTRANAS NATIVAS.

Al utilizar vibraciones ultrasónicas el peso molecular de una solución acuosa de dextrana decreció de 35,000 a un mínimo de aproximadamente 20,000 al ser expuesta 840 Kc/s durante 3 horas. La degradación ultrasónica ocurre lentamente cuando se burbujea dióxido de carbono en lugar de aire a través de la solución. Hawley y Dunn midieron la absorción ultrasónica de la dextrana en soluciones acuosas como una función del peso molecular y frecuencia. Las vibraciones sónicas mostraron una tendencia a romper enlaces α -(1,6), mientras que la irradiación ultravioleta no rompe ningún enlace α -(1,6) en soluciones de dextrana B-512 (Murphy, 1973).

La corriente alterna también puede causar degradación de la dextrana. Dentro de los principales efectos que causa la irradiación gamma se observan la depolimerización, un cambio en la forma de la ramificación y reacciones oxidativas (Murphy, 1973).

CAPITULO V

PRODUCCION EXPERIMENTAL DE DEXTRANAS

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de Ingeniería Química (Planta Piloto) de la Universidad de El Salvador.

Durante el desarrollo del mismo se permitió no sólo familiarizarse con la bacteria Leuconostoc mesenteroides, sino también con el proceso fermentativo para la producción de dextrana, en el que dicha bacteria participa.

Los resultados obtenidos en esta parte serán la base para la etapa de optimización de los parámetros del proceso.

5.1 OBJETIVOS DEL TRABAJO

- a) Aislar y caracterizar un microorganismo productor de dextrana.
- b) Determinar el rango de concentraciones de sacarosa al cual el microorganismo crece y produce dextrana sin ambientación previa; así como también la concentración inicial máxima de sacarosa a la que el microorganismo crece y produce dextrana con acostumbramiento previo.

- c) Efectuar el seguimiento de la fermentación analizando azúcares reductores y consumo de sacarosa conforme al tiempo para distintas concentraciones iniciales de sacarosa, para determinar la concentración inicial de azúcar a la cual se logra rendimiento de dextrana.
- d) Construir las curvas de crecimiento de la bacteria aislada, dentro del rango de concentraciones de sacarosa iniciales que ofrezcan mejores rendimientos.
- e) Determinar las condiciones, mas adecuadas para la producción de dextrana.
- f) Determinar el peso molecular de la dextrana producida.

5.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UN MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANA

El crecimiento de las bacterias del género Leuconostoc, depende de la presencia de un carbohidrato fermentable; y según las especies pueden requerirse uno o más aminoácidos y/o vitaminas. El ácido pantoténico y la biotina son requeridos por todas las especies pero la cobalamin y el ácido p-amino benzoico por ninguna.

Generalmente se utiliza glucosa como fuente de carbono, que es fermentada con la producción de D(-) ácido láctico, etanol y CO₂.

El Leuconostoc es anaeróbico facultativo y se desarrolla mejor a temperatura entre 20 y 30°C; inician su crecimiento a un pH entre 5.5 raramente abajo de 5.0 (Bergey's Manual, 1974).

5.2.1 AISLAMIENTO DE LEUCONOSTOC

El aislamiento de Leuconostoc sp que sea capaz de producir dextrana, se hace desde soluciones azucaradas de frutas y vegetales, aunque también ha sido encontrado en leche y productos lácteos. El medio empleado para el aislamiento está constituido principalmente de extracto de levadura, sacarosa y agar. En este proyecto se partió de jugo de caña, obtenido del primer molino en el Ingenio El Carmen, Departamento de Sonsonate.

El jugo de caña según su origen, edad y de como haya sido almacenado, contiene otros microorganismos, además de Leuconostoc. Utilizando un medio sólido selectivo de acuerdo a la orientación que den las características de la bacteria de interés, se procede a su aislamiento.

El método empleado en este proyecto consistió

en sembrar jugo de caña (cultivo mixto) sobre la superficie del medio sólido selectivo presentado en el Cuadro 9 (Sección 3.3.3), contenido en cajas de petri estériles. El método de siembra utilizado fue el método por estrías, se incubó a 28°C por 24 horas y se hicieron siembras por duplicado.

Después de sembrar y dejar incubar el cultivo mixto se observaron 3 tipos de colonias que cumplían con los requisitos deseados, se trataba de pequeños puntos redondos, transparentes, convexos y lisos.

Las características observadas en las colonias aisladas son las siguientes:

COLONIA : Pequeñas y puntiformes
FORMA : Redondas
COLOR : Al inicio son transparentes, pero con el tiempo se vuelven blanquecinas.
ELEVACION: Convexa
SUPERFICIE: Lisa, brillante y mucoide con la edad.
BORDE :Entero

A continuación con un asa bacteriológica se tomó una pequeña muestra de cada colonia, se prepararon frotis y se colorearon unos con azul de metileno y otros por el método de Gram, a fin de comprobar la presencia de microorganismos, forma en que se agrupan y su tamaño relativo.

La observación al microscopio constató que sólo un tipo de colonia correspondía a cocos con las características deseadas, tratándose las otras colonias de bacilos y estreptobacilos.

Las características microscópicas de las células seleccionadas son las siguientes:

FORMA : Cocos

DISTRIBUCION: Se presentan en pares o cadenas cortas.

TINCION GRAM: Gram-negativas.

5.2.2 IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO AISLADO

La identificación del microorganismo se llevó a cabo a través de pruebas bioquímicas, que constituyen reacciones que ponen de manifiesto las características y propiedades fisiológicas de los diferentes microorganismos.

En el cuadro 16 se presentan algunas características del género Leuconostoc.

A continuación se detallan las pruebas realizadas al microorganismo aislado.

a) Fermentación de azúcares con producción de ácidos.

Con esta prueba se determinó si la bacteria fermentaba glucosa, fructosa y arabinosa con formación de gas y ácido, lo que se manifiesta por el cambio de color del medio.

Se colocaron tubos Durham dentro de tubos de ensayo que contenían caldos peptonados, cada uno de los azúcares y rojo fenol como indicador.

Si hay formación de gas, aparecen burbujas en el tubo Durham, y la prueba es positiva, si no hay cambio de color en el medio la prueba es negativa a la formación de ácido.

b) Prueba de movilidad.

Esta prueba detecta si la bacteria es o no móvil. Se utilizan tubos con Agar Tripticasa Soya (TSA) semisólido agregándole rojo fenol, como indicador. Para detectar la movilidad, se hace una punción con una aguja recta. Si la

CUADRO 16
 DIFERENTES CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES
 DEL GENERO Leuconostoc

	1.L. mesente roides	2.L. dextra nicum	3.L. paramesente roides	4.L. cremoris	5.L. oenos	6.L. lactis
ACIDO DE:						
Arabinosa	+	-	(d)	-	.	-
Celobiosa	d	d	(d)	-	d	-
Fructosa	+	+	+	-	+	+
Galactosa	+	d	+	d	d	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	(d)	+	(d)	+	-	+
Maltosa	+	+	+	d	-	+
Manitol	d	d	(d)	-	-	-
Manosa	+	d	+	-	d	d
Rafinosa	d	d	d	-	-	d
Sacarosa	+	+	+	-	-	+
Xilosa	d	d	d	-	d	-
REQUERIDO PARA CRECIMIENTO:						
Uracilo	-	-	-	+	-	-
Guanina + adenina + xantina + uracilo	-	d	d	+	+	-
Riboflavina	d	d	+	+	+	+
Piridoxal	d	d	+	+	+	-
Acido fólico	d	d	+	+	+	-
FORMACION DE DEXTRANA						
CRECEN EN:	+	+	-	-	-	-
3.0% NaCl	+	+	-	-	-	-
6.5% NaCl	d	-	d	-	.	-
CRECEN A pH:						
4.8 (Inicial)	-	-	d	-	+	-
6.5 (Inicial)	+	+	+	d	+	+
CRECE A 37°C	d	+	d	-	d	+
pH final en caldo glucosado	4.5	4.5	4.4	5.0	-	4.7

+ = > 90% Cepas Positivas; d = 10-90% Cepas Positivas;
 - = > 90% Cepas Negativas; () = Acción Retardada.
 . = Desconocidos

FUENTE: Bergey's Manual, 1974



bacteria es inmóvil se observa crecimiento únicamente en el trayecto de la punción, por el contrario, si es móvil se observa el colorante distribuido en todo el medio.

c) Formación de dextrana.

Si el organismo se siembra en un medio conteniendo 10% de sacarosa (Cuadro 13, sección 4.3.1) y después de 12 horas su viscosidad se incrementa apreciablemente. se acepta la posibilidad de que se produzca dextrana.

Para comprobar la formación del polímero, se toman 10 ml del medio fermentado y se le agregan 15 ml de etanol, el precipitado se disuelve en agua tibia (45-50°C), para luego ser observada su rotación específica en el polarímetro, si la muestra es dextrorrotatoria la prueba es positiva.

d) Crecimiento en altas concentraciones de cloruro de sodio.

El crecimiento en este medio se manifiesta por el enturbiamiento de la solución. El medio utilizado se muestra en el cuadro 17.

CUADRO 17
 MEDIO PARA CRECIMIENTO DE L. mesenteroides CON
 ALTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO

C O M P U E S T O	COMPOSICION % p/v	
	3.0 NaCl	6.5 NaCl
sacarosa	2.00	2.00
extracto de leva dura	0.5	0.5
fosfato monopotá sico	0.25	0.25
triptona	0.25	0.25
pH inicial	7.4	7.4

El resultado de las pruebas bioquímicas efectuadas a la bacteria aislada se muestra en el cuadro 18, donde se observa que el microorganismo fermenta glucosa, fructosa y arabinosa con producción de ácido y gas.

CUADRO 18
 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS EFECTUADAS
 AL MICROORGANISMO AISLADO DEL JUGO DE CAÑA

P R U E B A S	R E S U L T A D O
Fermentación de:	Producción de gas y áci <u>do</u>
glucosa	
fructosa	Producción de gas y áci <u>do</u>
arabinosa	Producción de gas y áci <u>do</u>
Movilidad:	Inmóvil
Formación de dextrana	Positiva
Crecimiento en:	
3.0% p/v NaCl	Positiva en 18 horas
6.5% p/v NaCl	Positiva en 48 horas

Por los resultados de las pruebas bioquímicas, el tipo, color y forma de las colonias y las características al microscopio de la bacteria aislada desde jugo de caña, se puede afirmar que pertenece al género Leuconostoc. La especie se puede diferenciar debido a que forma dextrana y produce ácido a partir de la arabinosa, capacidad que sólo posee L. mesenteroides. En posteriores referencias, al microorga-

nismo aislado se le llamará Leuconostoc mesenteroides nativo, (cepa UES-IQ2).

A fin de cumplir con el objetivo planteado, se compararon las características de las colonias: forma, color y tipo; así como también las características microscópicas de Leuconostoc nativo con las de una cepa certificada de Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris ATCC 19254 (adquirida en American Type Culture Collection, Maryland, USA), obteniéndose colonias más pequeñas para la cepa certificada que para las de Leuconostoc mesenteroides nativo conservando el resto de características similares.

5.3 DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN EL MEDIO DE FERMENTACION, ADECUADAS PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANA.

Una concentración de sacarosa adecuada para la obtención de dextrana, es aquella a la cual la bacteria es capaz de desarrollarse y producir la enzima (dextran-sacarasa), que polimeriza las moléculas de glucosa.

A partir de pruebas preliminares, se determinó que la mayor cantidad de azúcar que el medio puede contener

es de 60 g en 100 ml de solución, una proporción mayor no es posible disolverla totalmente, ésto debido a que las sales y el extracto de levadura disueltos disminuyen la solubilidad del azúcar en agua (120 g sacrosa en 100 ml de agua).

Se prepararon soluciones de azúcar morena (se utilizará indistintamente el término sacarosa y azúcar morena), en un rango de 10% a 60% p/v, a partir de una solución madre al 70% p/v.

Se utilizó un método no tradicional de esterilización de los medios de cultivo, debido a que las soluciones con altas concentraciones de azúcar presentan problemas de empardeamiento Maillard.

La solución madre se preparó disolviendo el azúcar morena en agua estéril, se reguló el pH con NaOH estéril, hasta un valor de 7.4 e inmediatamente se esterilizó en la autoclave por 20 minutos a una temperatura de 100°C. La solución de sales y extracto de levadura se preparó por separado de acuerdo a la composición presentada en el cuadro 19. Se esterilizó a 121°C y 15 lbf/pulg² manométrica por 20 min con el pH regulado a 7.4.

Los volúmenes de solución madre y sales utilizados se muestran en el cuadro 20. Estos se calcularon de tal

manera que cada medio tuviera la composición en sales presentada en el cuadro 11 (sección 3.3.3)

CUADRO 19
COMPOSICION DE LA SOLUCION DE SALES UTILIZADA EN
LOS MEDIOS DE FERMENTACION

COMPONENTE	COMPOSICION % p/v
extracto de levadura	3.500
fosfato dipotásico	21.000
sulfato de magnesio heptahidrato	0.140
cloruro de sodio	0.007
sulfato ferroso heptahidratado	0.007
sulfato de magnesio hidratado	0.007
pH inicial	7.400

CUADRO 20
VOLUMENES UTILIZADOS EN LA PREPARACION DE LOS MEDIOS DE
FERMENTACION

CONCENTRACION INICIAL DESEADA DE SACAROSA	SOLUCION MADRE (ml)	SOLUCION DE SALES (ml)	AGUA (ml)	SOLUCION FINAL (ml)
10% p/v	7.14	7.15	35.70	50
20	14.28	7.15	28.57	50
30	21.43	7.15	21.42	50
40	28.57	7.15	14.28	50
50	35.71	7.15	7.14	50
60	42.85	7.15	0.00	50

Antes de inocular los tubos, las células tomadas del medio sólido se trasladaron a medio líquido de la misma composición. De aquí se sembraron directamente a tubos de ensayo conteniendo 15 ml de cada una de las concentraciones a estudiar y después de 6 horas de incubación fueron resemebradas en tubos de 50 ml del medio, tal como se muestra en la figura 13. Estos tubos se incubaron por 12 horas a una temperatura de aproximadamente 28°C; los tubos se cerraron de tal manera que se permitió la salida del gas producido durante la fermentación; esto constituyó una ambientación gradual a volúmenes crecientes.

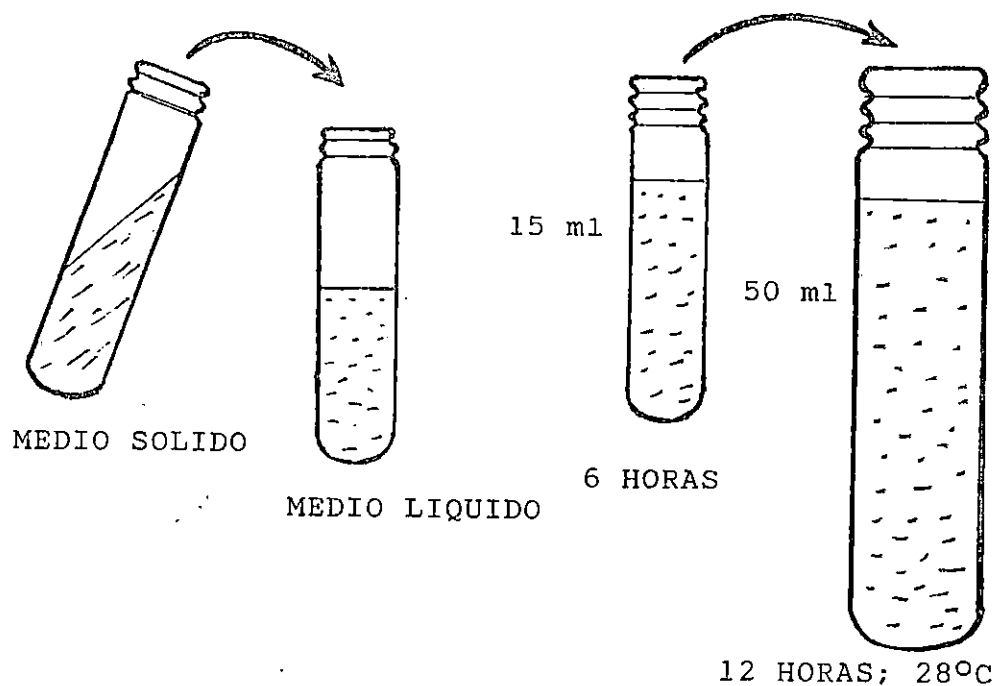


FIGURA 13: Etapas de ambientación de medio de Leuconostoc mesenteroides por escalamiento de volumen.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 21; donde se observa una concentración máxima para el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides nativo cuando no ha sido sometido a un proceso gradual de ambientación a concentraciones crecientes de sacarosa.

Esta concentración máxima corresponde a 30% p/v de sacarosa inicial en el medio, lo que se evidencia por el mantenimiento de la viscosidad y de la transparencia inicial en un medio con una concentración superior.

CUADRO 21

INVESTIGACION DE CONCENTRACIONES A LAS CUALES Leuconostoc mesenteroides NATIVO CRECE SIN AMBIENTACION PREVIA EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA

CONCENTRACION (% p/p)	RESULTADO	VISCOSIDAD FINAL DEL MEDIO
10	Positivo	Muy alta
20	Positivo	Alta
30	Positivo	Alta
40	Negativo	Igual a la inicial

A partir de los resultados obtenidos se hicieron siembras en medios conteniendo 32%, 35% y 38% p/v de sacarosa inicial, utilizando la técnica presentada en la sección 5.3.

Después de 20 horas de incubación a 28°C se observó crecimiento bacterial en los tubos conteniendo 32% y 35% p/v de azúcar morena; pero la viscosidad inicial no fue modificada apreciablemente. El cultivo con 38% de azúcar morena no presentaba crecimiento, manteniéndose transparente.

Los resultados indican que concentraciones entre 30% y 35% de sacarosa no inhiben el crecimiento del microorganismo aislado, pero si se afecta la producción de dextrana.

Siendo la producción del polímero el objetivo de la investigación, se concluye que la concentración máxima a la cual el microorganismo crece y produce dextrana sin ambientación previa a concentraciones crecientes de sacarosa, es de 30% p/v.

Tratando de adaptar la bacteria a concentraciones mayores de azúcar, se llevaron a cabo ambientaciones a partir del medio conteniendo 30% p/v de azúcar morena donde crece sin problemas.

Cuando se logró crecimiento en una concentración determinada se resembró 1 ml de la solución a otro tubo de la misma concentración a fin de aumentar su capacidad de adaptación y de formación de dextrana, lo que se evidencia por el aumento de la viscosidad en el medio

en tiempos cada vez más pequeños.

Las bacterias ambientadas se mantuvieron en refrigeración en tubos inclinados conteniendo medio con 30% de azúcar morena.

Se sembraron tubos conteniendo medios de 40%, 50% y 60% p/v de sacarosa inicial, obteniéndose los resultados que se presentan en el cuadro 22.

CUADRO 22

INVESTIGACION DE CONCENTRACIONES A LOS CUALES Leuconostoc mesenteroides NATIVO PRODUCE DEXTRANA CON AMBIENTACION PREVIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA

CONCENTRACION DE AZUCAR %	CRECIMIENTO	TIEMPO DE CRECIMIENTO	NUMERO DE TRASLADOS	VISCOSIDAD FINAL DE LA SOLUCION
40	Positivo	20 horas	2	Ligeramente mayor a la inicial
50	Positivo	48 horas	4	Ligeramente mayor a la inicial
60	Positivo	72 horas	4	Ligeramente mayor a la inicial

A partir de los datos obtenidos se concluye que en concentraciones mayores de 30% Leuconostoc nativo crece con dificultad y se inhibe la producción de dextrana.

5.4 EFFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE SACAROSA SOBRE LA PRODUCCION DE DEXTRANA.

Con el objetivo de generar información respecto al efecto de la concentración inicial de sacarosa sobre la producción de dextrana y el tiempo de proceso, se efectuó el seguimiento de la fermentación, analizando azúcares reductores y consumo de sacarosa conforme al tiempo para distintas concentraciones iniciales de azúcar morena en un rango del 10% al 60% p/v.

La dextrana producida a esas concentraciones se lavó, secó y cuantificó para determinar el rendimiento del proceso.

El consumo de sacarosa se determinó por diferencia de azúcares reductores totales y azúcares reductores, los que se determinaron con el método de Eynon y Lane (Apéndice A), que consiste en reducir la solución de Fehling, titulándola en punto de ebullición con la solución de azúcares reductores de la muestra obtenida del fermentador, antes y después de ser hidrolizada con ácido clorhídrico 1N.

5.4.1 PREPARACION DEL MEDIO PARA PRODUCCION DE DEXTRANA.

El volumen de fermentación fue de 1 litro, preparándose cada muestra por duplicado de la siguiente manera:

- a) El azúcar se disolvió en 500 ml de agua estéril, se ajustó el pH en 7.4 con hidróxido de sodio estéril, inmediatamente se colocó en el autoclave por 20 min a 100°C.
- b) Las sales (ver composición en cuadro 11; sección 3.3.3) se disolvieron por separado en 100 ml de agua y se esterilizaron por 20 min a 121°C y 15 lbf/plg² manométrica.
- c) Las soluciones frías se mezclaron y aforaron a un litro con agua estéril.

5.4.2 PREPARACION DEL FERMENTADOR

- a) Los inóculos se prepararon a partir de la cepa de Leuconostoc mesenteroides aislada desde jugo de caña, suspendiendo una pequeña muestra en medio líquido de la misma composi-

- ción del medio de mantenimiento sólido y se incubó por 6 horas.
- b) Con un asa bacteriológica se tomó una pequeña cantidad del cultivo en medio líquido y se inoculó en un tubo de ensayo conteniendo 8 ml del medio con la concentración de azúcar morena a ensayar.
- c) Se incubó a 28°C durante 6 horas, al cabo de las cuales el cultivo se trasladó a otro tubo de ensayo conteniendo 42 ml del medio a fin de completar 50 ml aproximadamente. Después de 10 horas de incubación, el contenido de ese tubo se vertió en el fermentador final de un litro cuyo esquema se muestra en la figura 14.
- d) En estos experimentos al medio no se le controló el pH, solamente se mantuvo constante la temperatura a 28°C.
- e) Para las concentraciones mayores de 30% p/v de azúcar morena se utilizó la bacteria previamente acostumbrada a la concentración de 30% p/v.

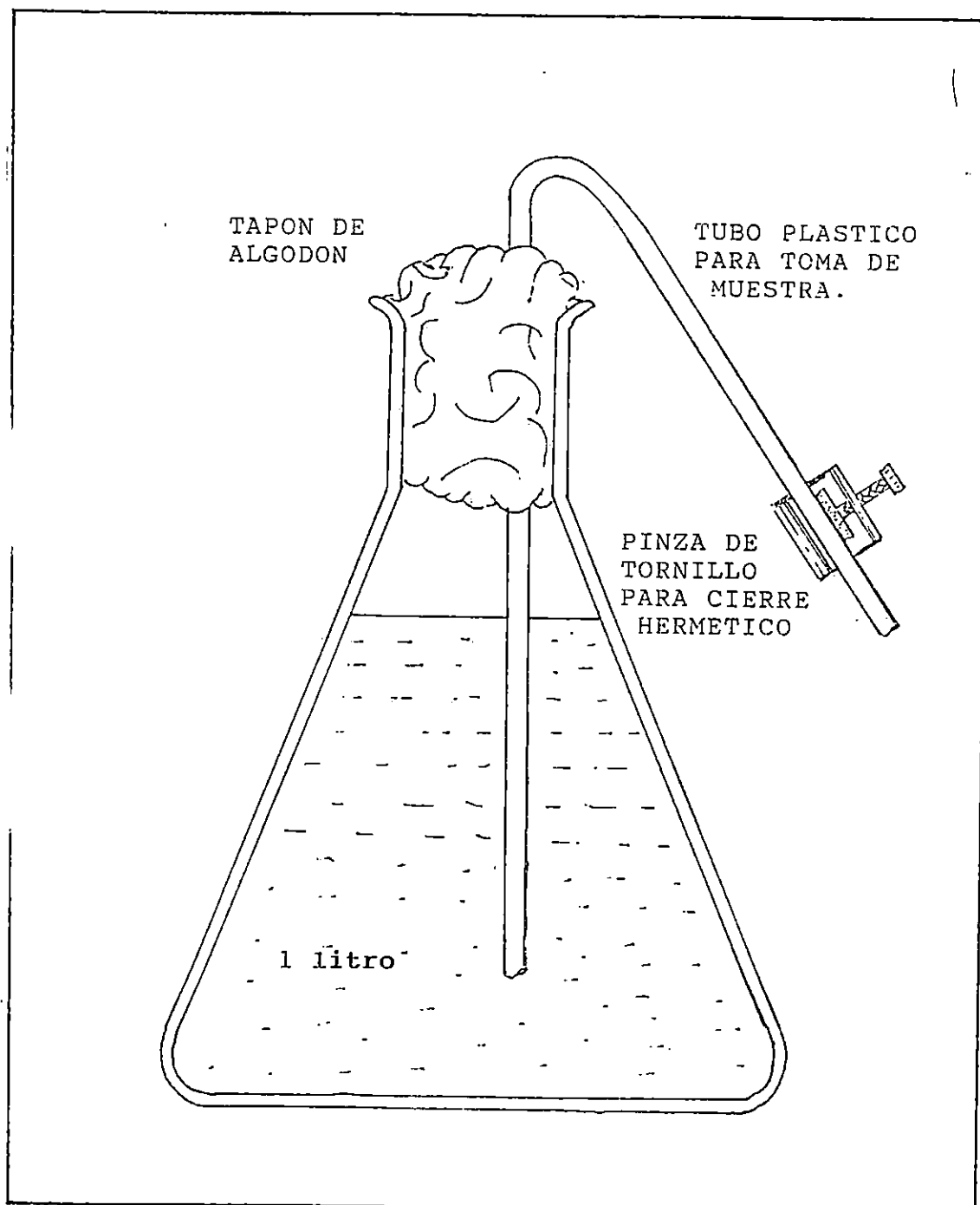


FIGURA 14: Fermentador utilizado a escala de laboratorio para la producción de dextranas.

5.4.3 RESULTADOS DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE SACAROSA SOBRE LA PRODUCCION DE DEXTRANAS

El tamaño de las muestras fermentadas fue de 20 ml durante las primeras 4 horas y de 10 ml las siguientes. Se agregó 15 ml de etanol absoluto a cada 10 ml de muestra para precipitar la dextrana producida separarla y cuantificarla.

A) CUANTIFICACION DE AZUCARES REDUCTORES Y AZUCARES REDUCTORES TOTALES

Las muestras se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y se colocaron a temperatura de congelación, hasta el momento de prepararlas para el análisis de azúcares reductores (AR1) a los diferentes tiempos de fermentación.

A otro volumen de la muestra se le ajustó el pH aproximadamente a 4 con ácido clorhídrico y se colocó en baño de agua por 1 hora a 50°C, con el objetivo de hidrolizar completamente la sacarosa remanente (SR) para el análisis de azúcares reductores totales (AR2).

Los resultados de los análisis se muestran en

las figuras 15 a 19 donde, para calcular los valores graficados se utilizaron las ecuaciones (2) a (4).

$$\% \text{ Azúcares Reductores} = \frac{\text{AR1}}{(\text{Sacarosa Inicial})} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Sacarosa Remante (SR)} = \text{AR2} - \text{AR1} \quad (3)$$

$$\% \text{ SR} = \frac{\text{SR} \times 0.95}{(\text{Sacarosa Inicial})} \times 100 \quad (4)$$

Durante el tiempo que duró la fermentación se realizó un seguimiento de la variación de pH hasta llegar a un valor de 4.2 (punto final de la fermentación), utilizando un medidor de pH marca Orion Research Modelo 501.

Así se observa en las figuras 15 y 17 que la sacarosa remanente fue de 9.45% y 10.5%p/p para concentraciones iniciales de sacarosa del 10 y 30% respectivamente, con tiempos de fermentación de 22.8 h y 23.0 h mientras que de las figuras 16, 18 y 19 presentan valores de 22.40 %, 19.40 % y 43.1% p/p para concentraciones iniciales de sacarosa del 20, 40 y 50% p/v respectivamente con tiempos de 22.0, 30.21 y 112.25 h.

Los datos mostrados en esas figuras confirman que al llegar a un pH de 4.2 no se da más consumo de sacarosa indicándose de esta forma el final de la fermentación.

Como era de esperarse el contenido de azúcares reductores incrementó a medida que progresaba la fermentación, observándose un valor máximo a la concentración de 50% p/v de sacarosa inicial en el medio.

B) CUANTIFICACION DE LA DEXTRANA PRODUCIDA.

Para determinar el efecto que causa la concentración inicial de sacarosa en el medio, sobre la producción de dextrana, ésta se precipitó a partir de muestras de medios con concentraciones iniciales de sacarosa de 10% a 50% p/v con alcohol etílico 95% p/v. Estas dextranas se lavaron disolviéndolas con agua tibia (45-50°C) y reprecipitando nuevamente; este proceso se efectuó por lo menos unas cuatro veces a fin de obtener una dextrana de color blanco, la que se puso a secar en estufa hasta peso constante. Posteriormente se pesaron, y se determinó su contenido final de humedad por el método de arrastre con tolueno (ver apéndice B), obteniéndose los rendimientos mostrados en el cuadro 23.

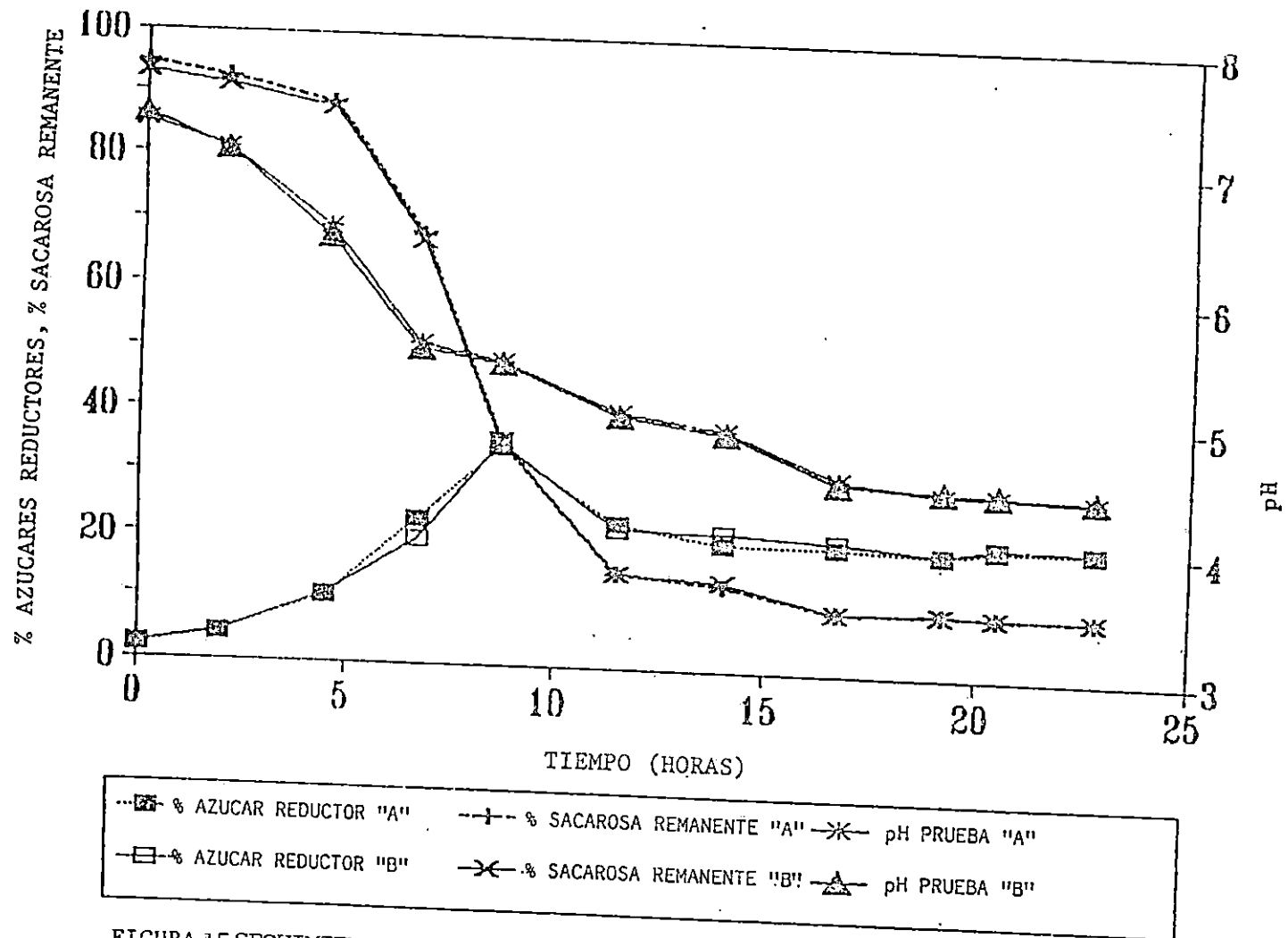


FIGURA 15: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 10% p/v INICIAL DE SACAROSA A 28°C.

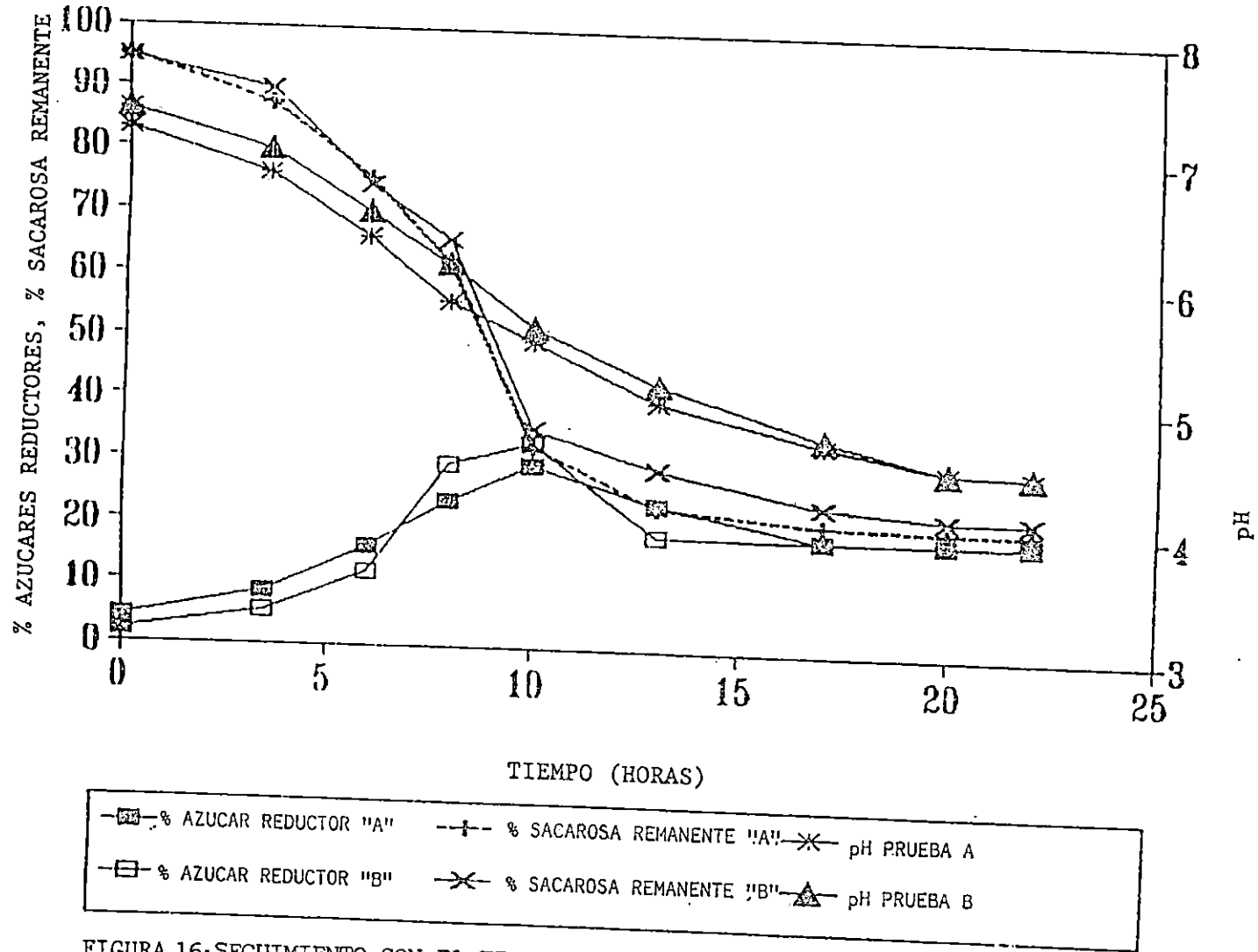


FIGURA 16: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 20% p/v INICIAL DE SACAROSA A 28°C

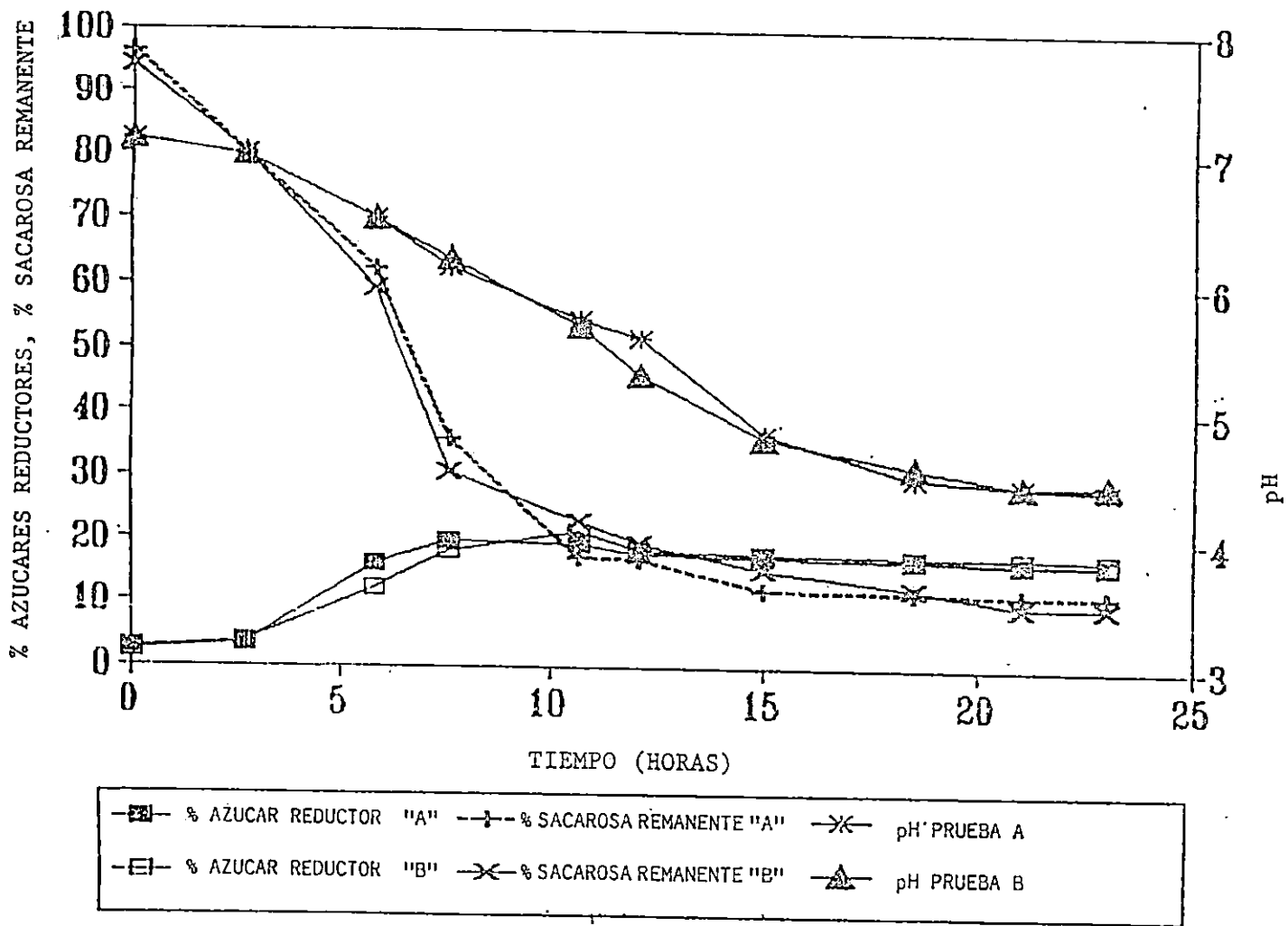


FIGURA 17 SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 30% p/v INICIAL DE SACAROSA A 28°C.

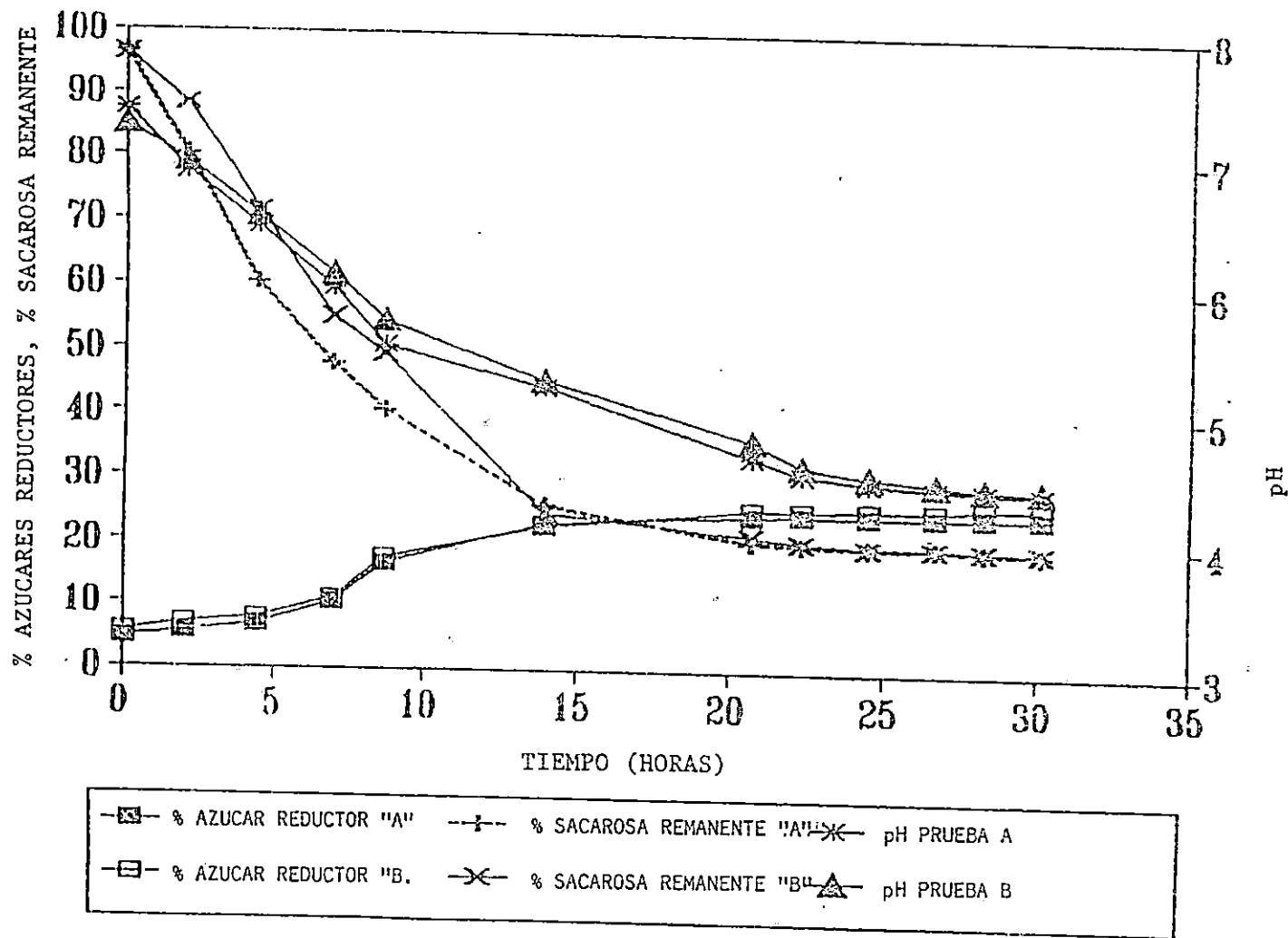


FIGURA 18. SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZÚCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACIÓN CON 40% p/v INICIAL DE SACAROSA A 28°C.

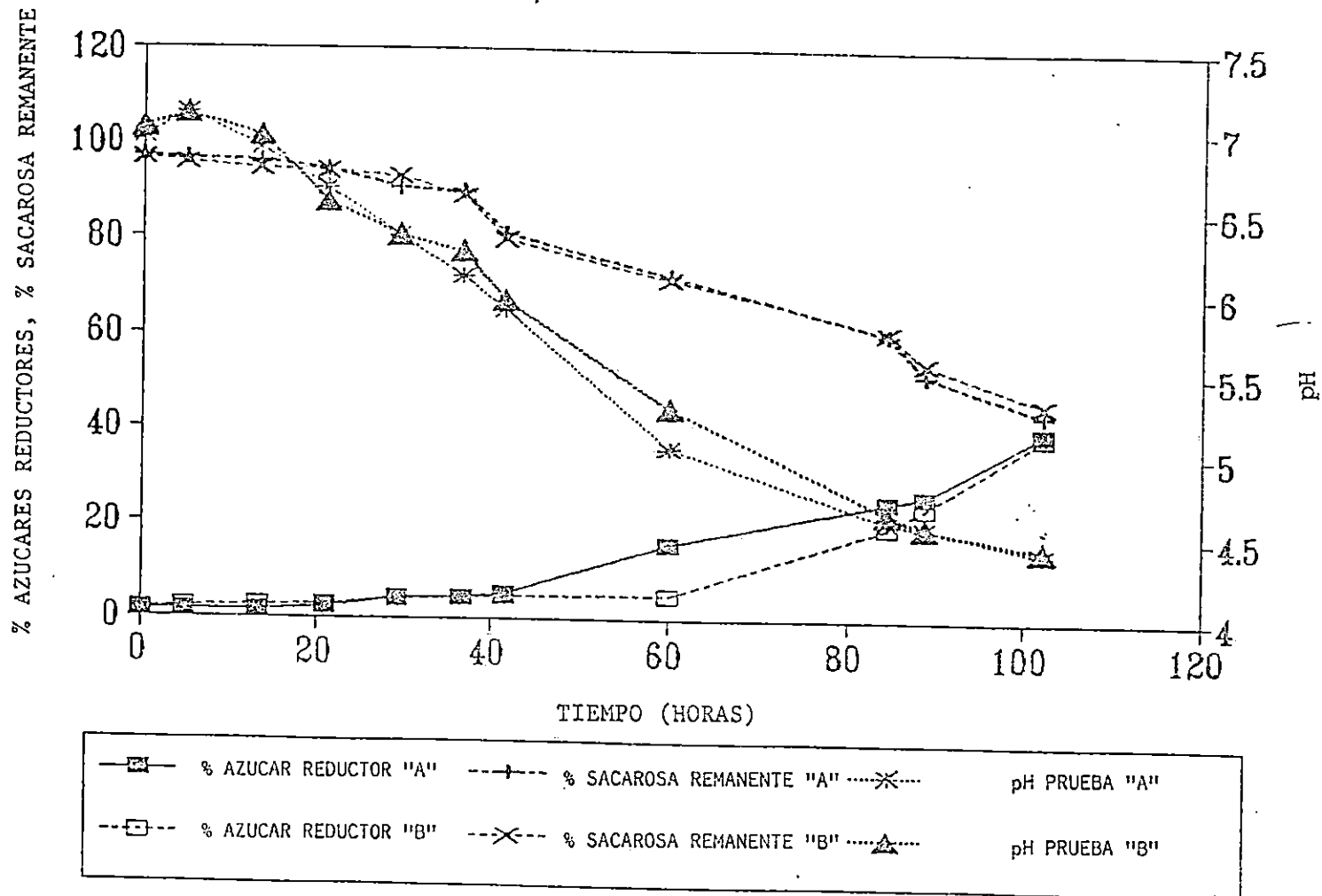


FIGURA 19. SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA , AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 50% p/v DE SACAROSA INICIAL A 28°C.

CUADRO 23
 RENDIMIENTO DE DEXTRANA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
 DE SACAROSA EN EL MEDIO DE FERMENTACION

PRUEBA	CONCENTRACION INICIAL DE SACAROSA UTILIZADA	$\frac{g}{100 g}$ DE DEXTRANA SACAROSA	SACAROSA REMANENTE
A	10	56.0	9.6
B	10	56.17	9.5
A	20	14.43	20.40
B	20	16.93	22.40
A	30	22.31	11.40
B	30	22.82	9.70
A	40	7.786	19.20
B	40	7.48	19.40
A	50	1.49	43.10
B	50	1.47	42.9

El cuadro 23 muestra que la producción de dextrana fue muy baja a concentraciones de 50% p/v indicando que las concentraciones altas de sacarosa inhiben el crecimiento celular y con ello, la producción de dextransacarasa. Sin embargo, en el medio de fermentación conteniendo 30% p/v de sacarosa inicial se produjo un rendimiento de 22.56% p/p que comparándolo con el obtenido en el fermentador de 20% p/v de sacarosa inicial que fue aproximadamente 15.68% p/p, sugiere que el crecimiento celular y con ello la producción de la enzima están afectadas por otro factor y por lo tanto la concen

tración de sacarosa no es el único factor incidente en la producción de dextrana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el seguimiento del consumo de sacarosa.

Es de hacer notar que los rendimientos reportados no son para dextranas puras debido a que no se contaba con medios de purificación adecuados para separar completamente la masa celular. Esto se confirmó al hacer observaciones al microscopio aplicando tinción simple a las muestras de dextrana seca. El resultado más evidente de un alto porcentaje de masa celular en la dextrana seca precipitada se da al 10% de concentración inicial de sacarosa, donde los valores de rendimiento obtenidos (56.85% y 56.17%) sobrepasan inclusive el rendimiento estequiométrico del 49%. Este dato no es extraño dado que al determinar las curvas de crecimiento de Leuconostoc mesenteroides se tiene una mayor reproducción de la bacteria al 10% de sacarosa (ver sección 5.5)

5.5 CURVAS DE CRECIMIENTO DE L. MESENTEROIDES NATIVO EN SOLUCIONES CON 10% Y 30% P/V DE SACAROSA INICIAL

Crecimiento es el incremento ordenado en todos los com

ponentes de un organismo. Por lo tanto, el aumento de tamaño que resulta cuando una célula capta agua o deposita líquidos no es un crecimiento verdadero. La multiplicación celular es una consecuencia del crecimiento; en organismos unicelulares, la multiplicación conduce a un aumento en el número de células dando lugar a una población o a un cultivo (Lawetz, 1981).

Se construyeron las curvas de crecimiento de Leuconostoc nativo utilizando concentraciones de 10% y 30% p/v de sacarosa inicial, con la finalidad de determinar si la concentración de sacarosa afectaba el crecimiento celular, así como también definir el período de máxima producción celular a una temperatura de 28°C, sin control de pH, en un volumen de un litro y sin agitación.

5.5.1 DETERMINACION DE LA POBLACION CELULAR POR EL METODO DE CONTEO EN PLACA EXTENDIDA

El método consiste en determinar la cantidad de células de una población que son capaces de dividirse y formar colonias, es decir sólo se cuentan las células vivas.

El procedimiento utilizado consistió en que cada hora se tomaron muestras del cultivo del fermentador durante 10 horas, para el reactor con 10% p/v de sacarosa y 12 horas para el de 30%

p/v. Las muestras fueron diluídas en agua peptonada (agua destilada con 0.1% p/v de peptona) y se sembraron por duplicado 0.1 ml de las diluciones sobre medio de cultivo sólido contenido en cajas petri. Después de incubar las cajas a 28°C durante 8 horas, se contaron las colonias formadas.

La figura 20 es un esquema del procedimiento empleado para el conteo de bacterias en caja petri.

La concentración celular se calculó utilizando la ecuación (5).

$$\text{Número de células/ml} = \text{No. de colonias} * \text{Factor de dilución.} \quad (5)$$

Los resultados obtenidos de máxima concentración celular se muestran en el cuadro 24.

CUADRO 24

CRECIMIENTO CELULAR MAXIMO DE Leuconostoc NATIVO EN MEDIO CON 10% y 30% p/v DE SACAROSA INICIAL

PRUEBA	CONCENTRACION INICIAL DE AZUCAR	TIEMPO (HORAS)	CONCENTRACION CELULAR MAXIMA (CELULAS/ml)
A	10%	6	8.6×10^{13}
B	10%	6	8.2×10^{13}
A	30%	9	5.8×10^{11}
B	30%	9	5.3×10^{11}

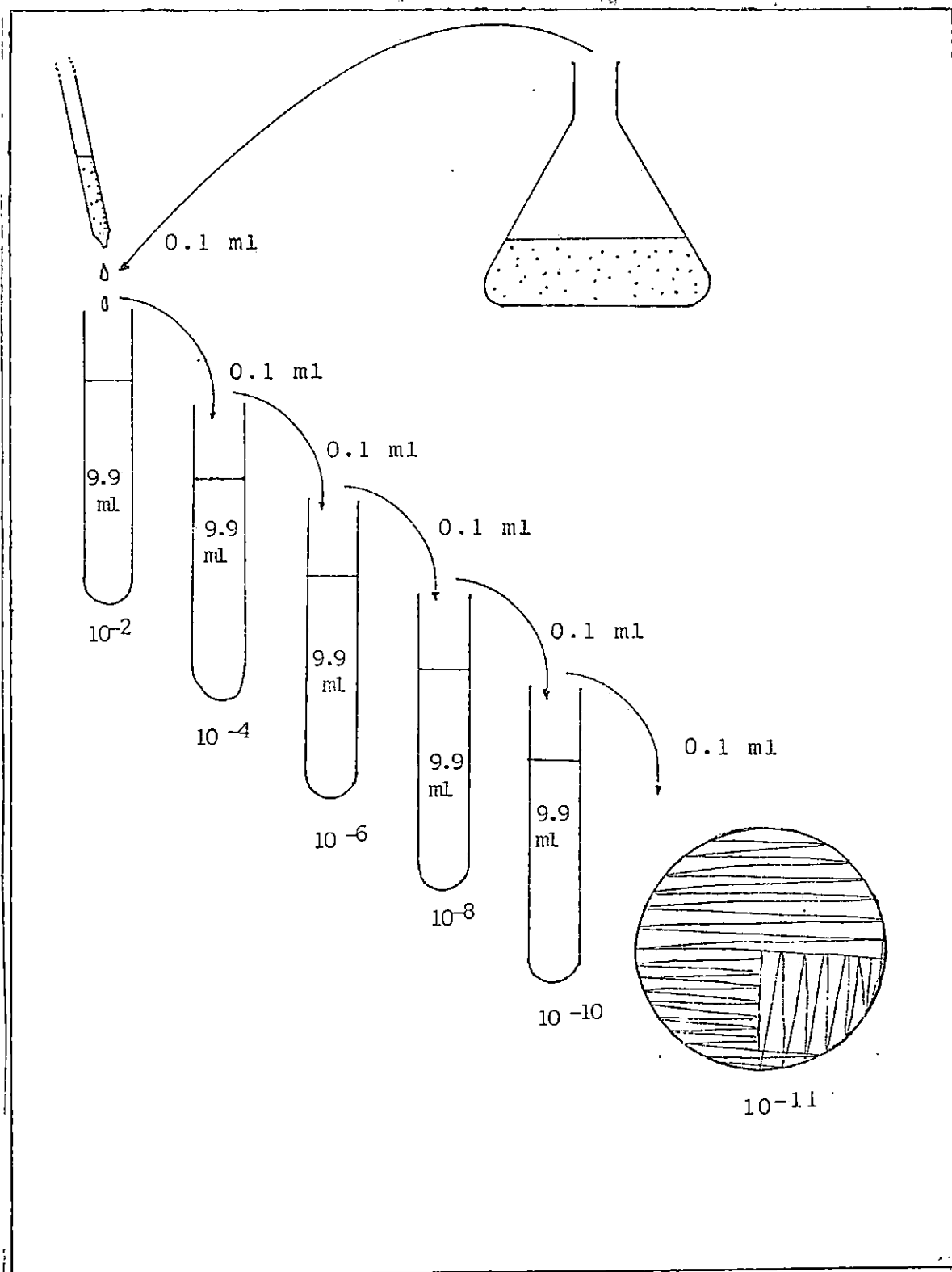


FIGURA 20: Método de dilución en tubo para recuento de bacterias en caja petri.

Observando los datos del cuadro 24 se comprobó que las altas concentraciones de sacarosa inhiben el crecimiento celular, manifestándose éste por el aumento en el tiempo de fermentación y por el descenso en la eficiencia de producción de dextrana.

En el fermentador conteniendo 30% de sacarosa, se dispone de una mayor cantidad de azúcar como sustrato, que puede ser utilizada para la formación de dextrana, desviándose una menor cantidad de azúcar para la producción de biomasa.

Las figuras 21 y 22 muestran las curvas de crecimiento obtenidas, en las que se observa que las velocidades específicas de crecimiento fueron de 4.39 y 2.47; con tiempos de duplicación de 0.24 h y 0.4 h para las concentraciones de 10 y 30% respectivamente.

También puede observarse que el crecimiento celular se estabilizó alrededor de un valor de pH de 5.5 indicando que la fase de muerte iniciaba para la concentración de 10% de sacarosa, en cambio para la concentración de 30% la fase de estabilización se inicia a un pH de 6 indicando que a esta concentración alguno de los productos inhibe el crecimiento celular.

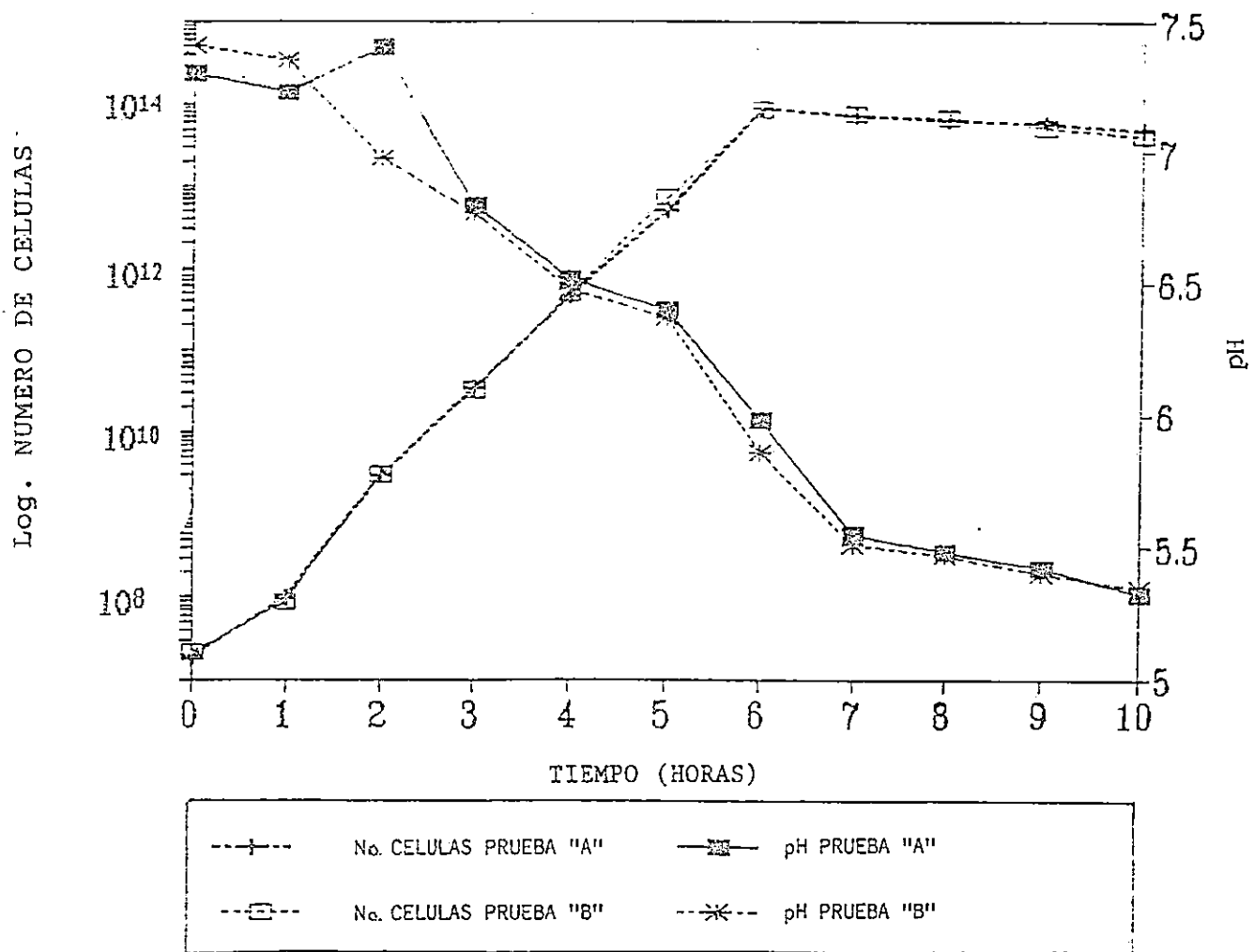


FIGURA 21: CURVA DE CRECIMIENTO DE Leuconostoc mesenteroides EN MEDIO DE CULTIVO CON 10% p/v DE SACAROSA INICIAL Y 28°C.

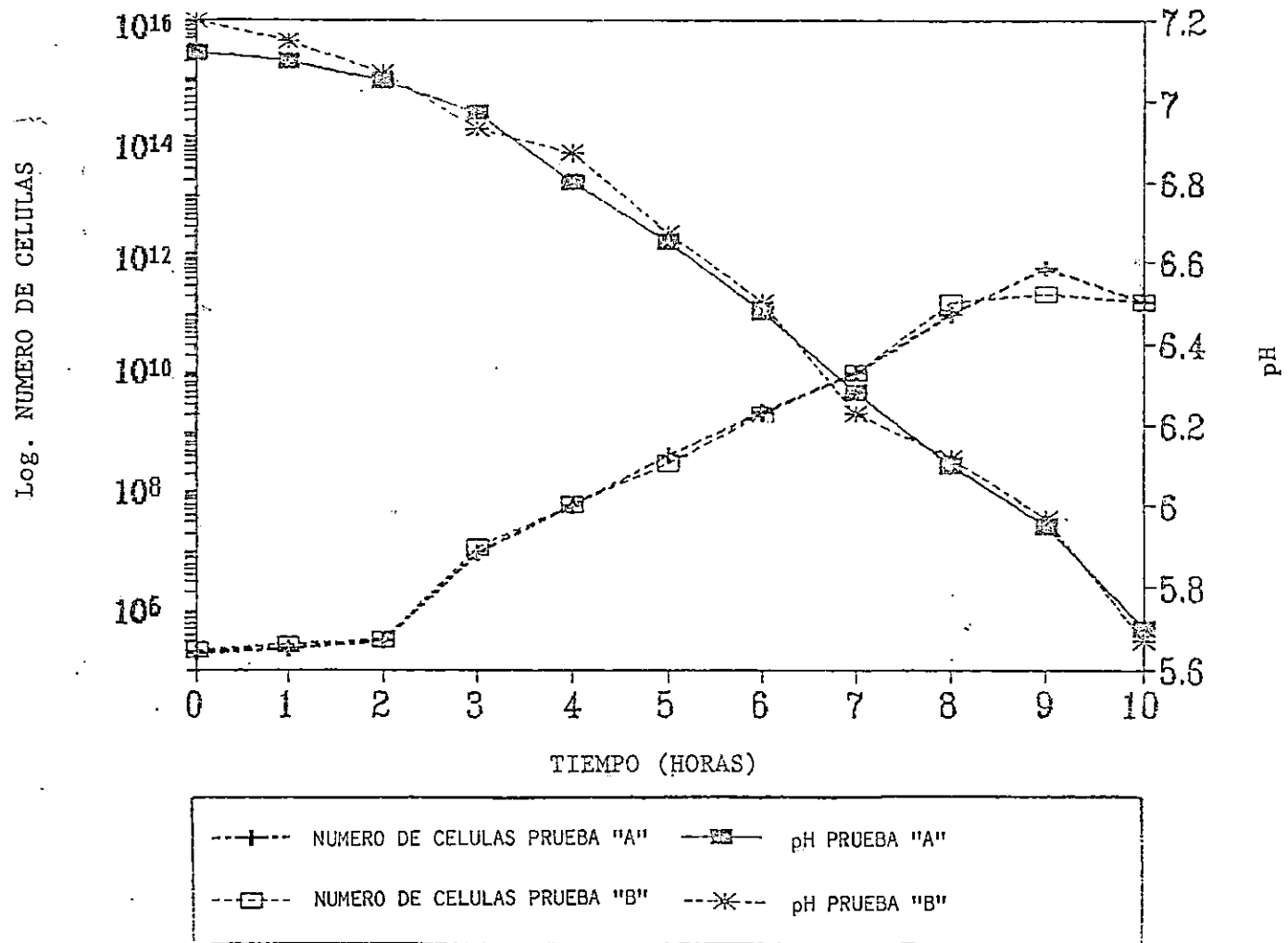


FIGURA 22 CURVA DE CRECIMIENTO DE Leuconostoc mesenteroides NATIVO EN MEDIO DE CULTIVO CON 30% p/v DE SACAROSA INICIAL Y 28°C.

5.6 PRODUCCION DE DEXTRANA EN UN MEDIO CON PH CONTROLADO

Para definir el efecto del pH del medio sobre la producción de dextrana y del tiempo del proceso, se llevaron a cabo fermentaciones manteniendo un pH constante de 5.2, mediante la adición de hidróxido de sodio 2N estéril.

Se trabajó experimentalmente con las concentraciones de 10% y 30% p/v de sacarosa inicial; en volúmenes de 1 litro y por duplicado.

El proceso se inició de manera similar a las fermentaciones anteriores, con un pH de 7.4 a 28°C y sin agitación, excepto en el momento que se le agregó la solución de hidróxido de sodio.

Se seleccionó el pH de 5.2 dado que estudios anteriores (Prescott, 1954), reportan que la enzima retiene su actividad por más tiempo en este valor, a una temperatura de 25°C; sin embargo las características de la enzima dependen del microorganismo que la produce y de la temperatura, y podría ser que la producida por Leuconostoc nativo retenga su actividad a 28°C en otro valor distinto de 5.2; se sugiere, determinar este valor de pH en trabajos posteriores.

5.6.1 RESULTADOS DEL EFECTO DE MANTENER EL pH DEL MEDIO CONSTANTE EN 5.2

Los resultados del efecto de mantener el pH del medio de fermentación, constante en un valor de 5.2 se reportan en las figuras 23 y 24 y en el cuadro 25, donde se observa que al mantener el pH en ese valor, se aumenta el rendimiento en producción de dextrana tanto a una concentración inicial de sacarosa del 10% como a una de 30%. También se observa que al igual que en la fermentación natural, el rendimiento de producción de dextrana fue mayor a una concentración inicial de azúcar del 10% que a la de 30% p/v. Nuevamente se hace la aclaración de no contar con el contenido de impurezas de origen celular en el producto final, obteniéndose esta vez resultados mayores que con la fermentación natural.

CUADRO 25
RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS FERMENTACIONES CON Y SIN CONTROL DEL pH

PRUEBA	CONCENTRACION INICIAL DE AZUCAR. p/v	g DEXTRANA/100 g AZUCAR		SACAROSA REMANENTE % p/p	
		Fermentación a pH=5.2	FERMENTACION NATURAL	Fermentación a pH= 5.2	FERMENTACION NATURAL
A	10%	67.33	56.0	3.45	9.6
B	10	68.12	56.77	3.72	9.5
A	30	27.31	22.31	5.98	11.4
B	30	28.12	22.82	8.87	9.7

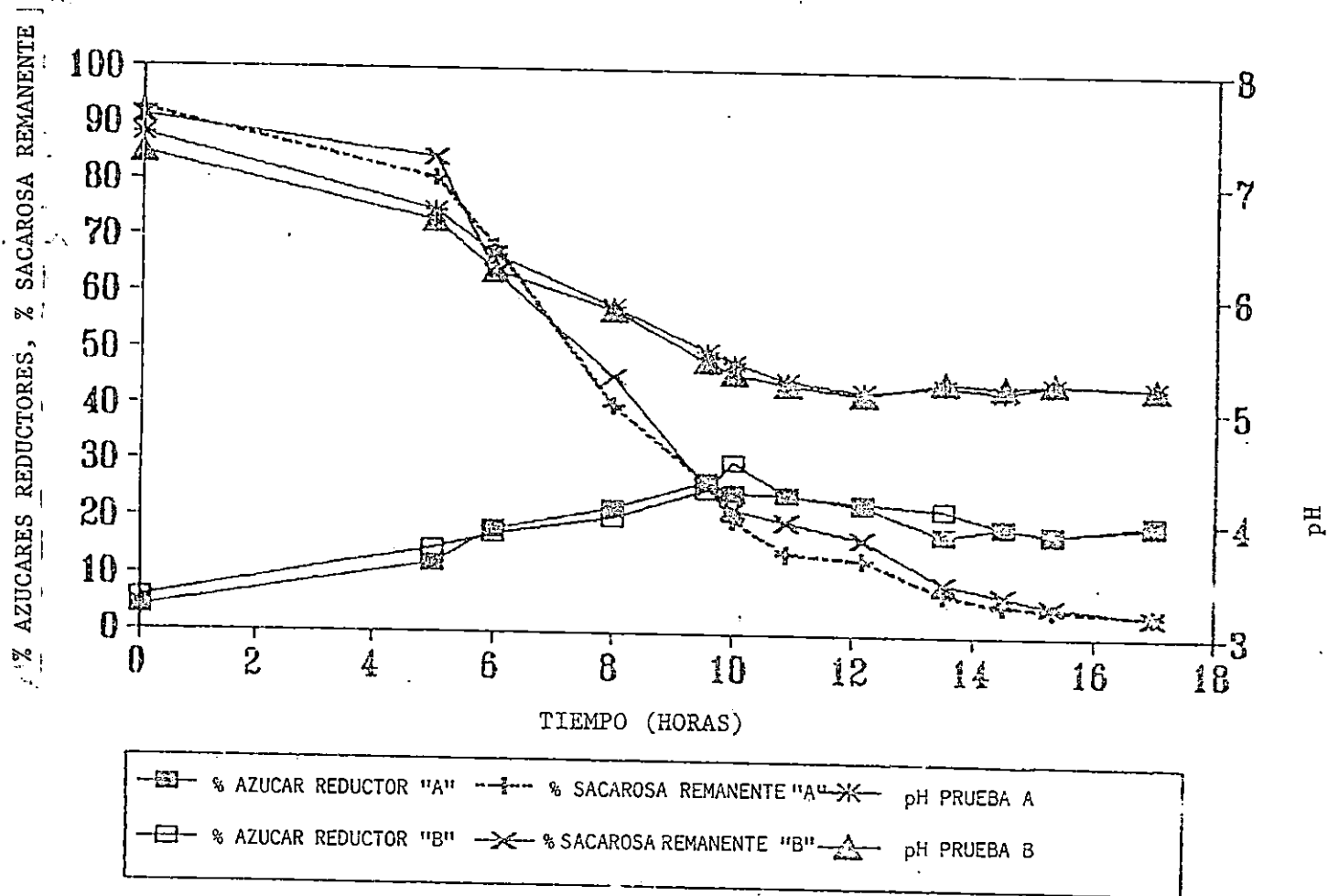


FIGURA 23:SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DE CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 10% p/v INICIAL DE SACAROSA A pH 5.2

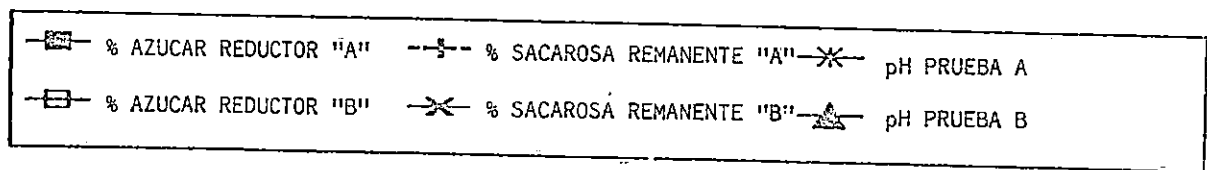
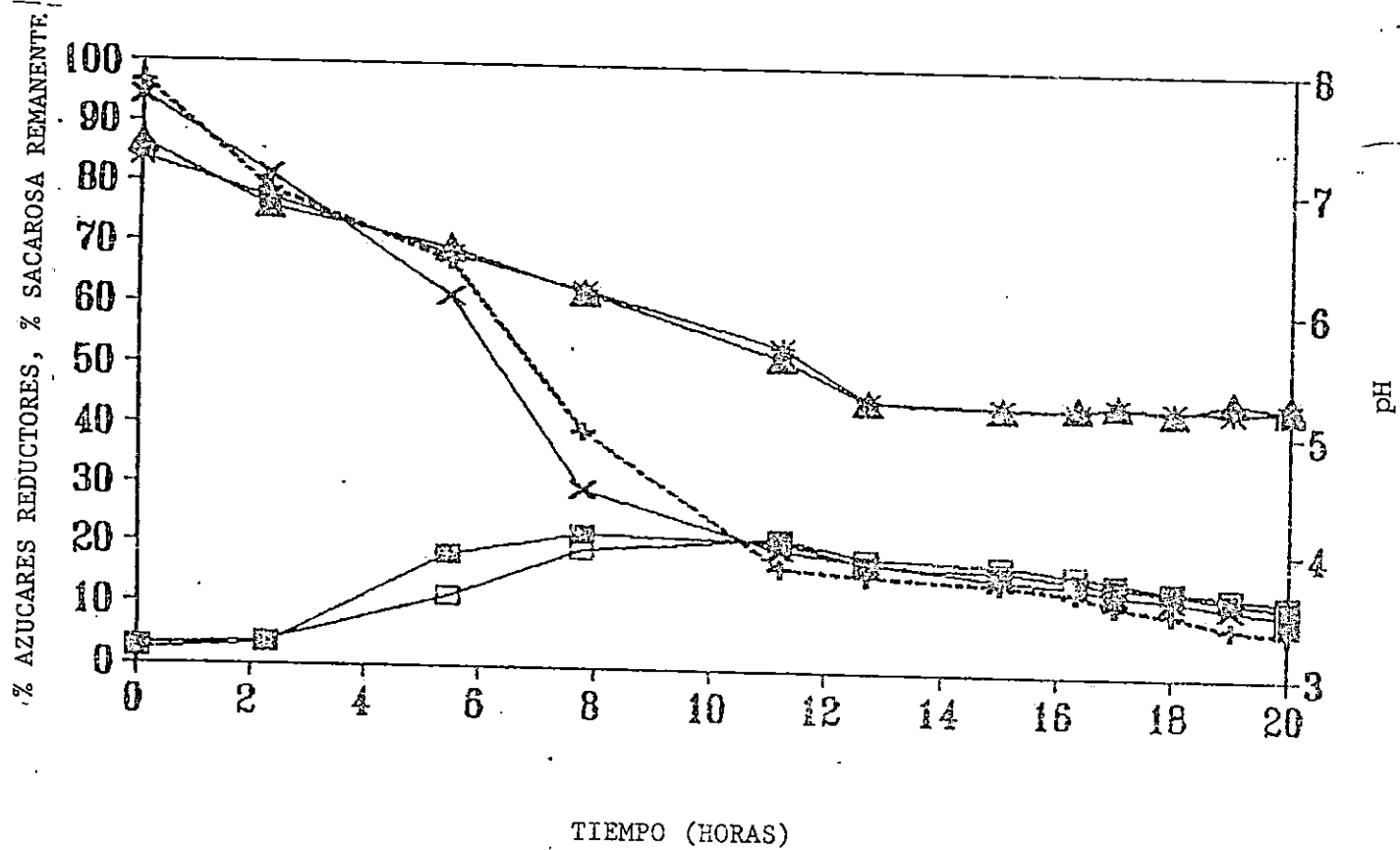


FIGURA 24: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 30% p/v INICIAL DE SACAROSA A pH 5.2.

5.7 PRODUCCION DE DEXTRANA EN UN MEDIO CON AGITACION MECANICA

Para estudiar el efecto de la agitación mecánica sobre el tiempo requerido para el proceso de producción de dextrana a nivel de laboratorio (siendo el fermentador de 1 litro) se utilizó el aparato mostrado en la figura 25.

El cultivo se agitó a 70 rpm con el objetivo de comparar resultados con los obtenidos por otros investigadores (Landon y Webb, 1990), respecto a la producción de la enzima dextranasa. La temperatura se mantuvo constante en 28°C y no se controló el pH en un valor constante. Las concentraciones iniciales de azúcar experimentada fueron 10% p/v.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 26 y 27. Dado que estas pruebas se hicieron a la misma temperatura que las pruebas de fermentaciones naturales, se realizaron comparaciones entre ambas fermentaciones. De esto, se observa que en las fermentaciones agitadas, ocurre una caída del pH más rápida; esto sugiere que el crecimiento celular en el medio con agitación se ve favorecido. Sin embargo, a pesar de un mayor crecimiento celular en el medio agitado, los rendi

mientos obtenidos fueron menores, como lo muestran los datos del cuadro 26, lo que sugiere que la producción de la enzima dextransacarasa fue lenta o se produjo en tan baja cantidad que la producción de dextrana fue deficiente. Estas especulaciones están de acuerdo con los estudios realizados por Landon y Webb quienes obtuvieron una baja velocidad de crecimiento en un medio sin agitar, ésto sugiere que la concentración de substrato limitante (sacarosa) alrededor de las células es insuficiente para satisfacer su demanda, por lo que el substrato se agota rápidamente alrededor de ellas.

Por otro lado, la célula produce enzima y ácido, los cuales se acumulan en "bolsones" o "paquetes" alrededor de la célula; luego, si se agita el medio, estos cúmulos se rompen y la producción de la enzima se reduce, pudiendo considerarse que altas concentraciones de substrato y/o niveles de pH inhiben la producción de la enzima o que el pH afecta la estabilidad de la misma.

En el cuadro 26 puede verse que los rendimientos de dextrana producida bajan para la fermentación con agitación y además los porcentajes de sacarosa remanente como los porcentajes de azúcares reductores son mayores; indicando que hubo menos aprovechamiento del azúcar en el medio y menos polimerización, respectivamente.

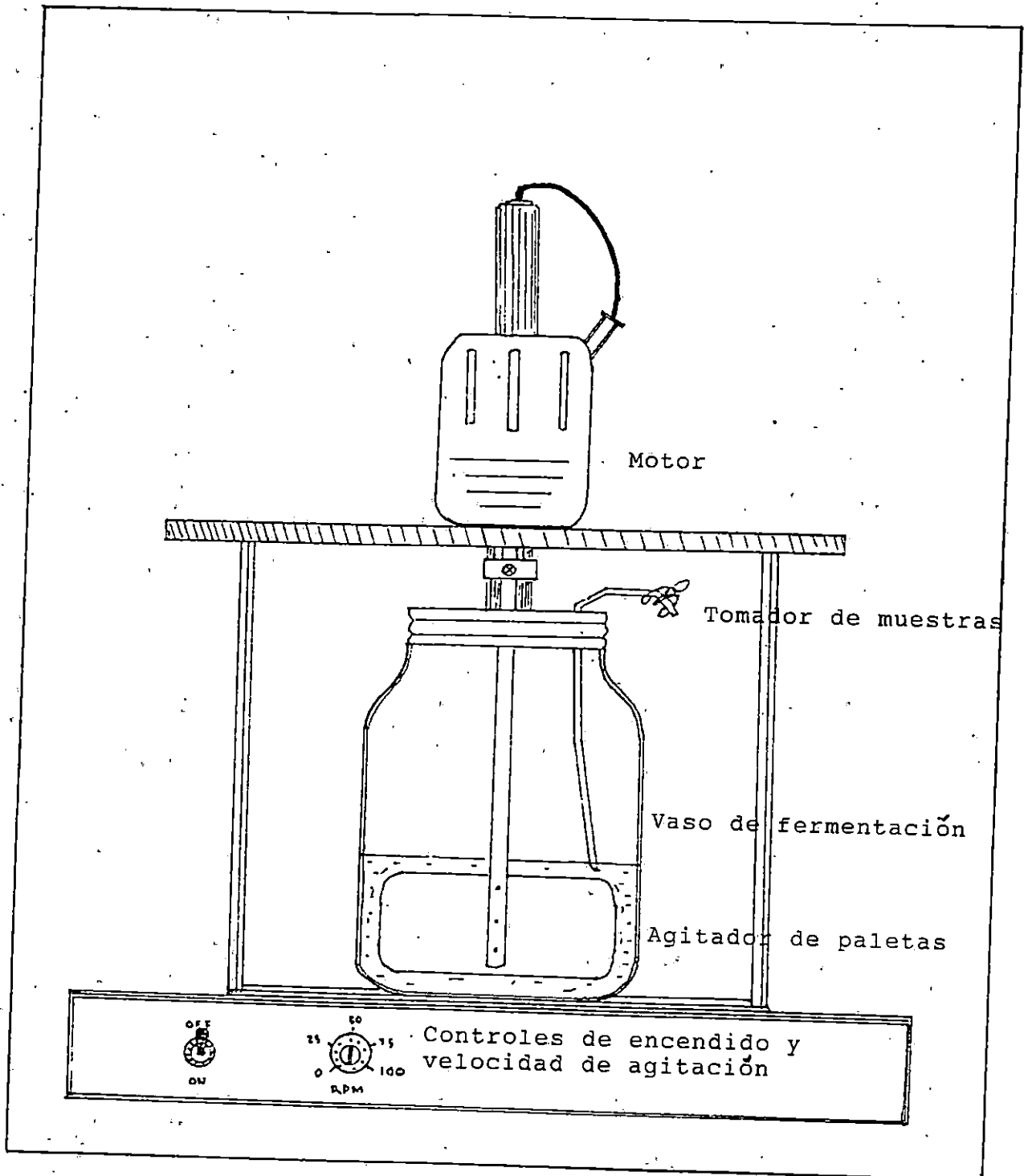


FIGURA 25.: Fermentador con agitador mecánico utilizado en las pruebas de laboratorio, para producción de dextranas.

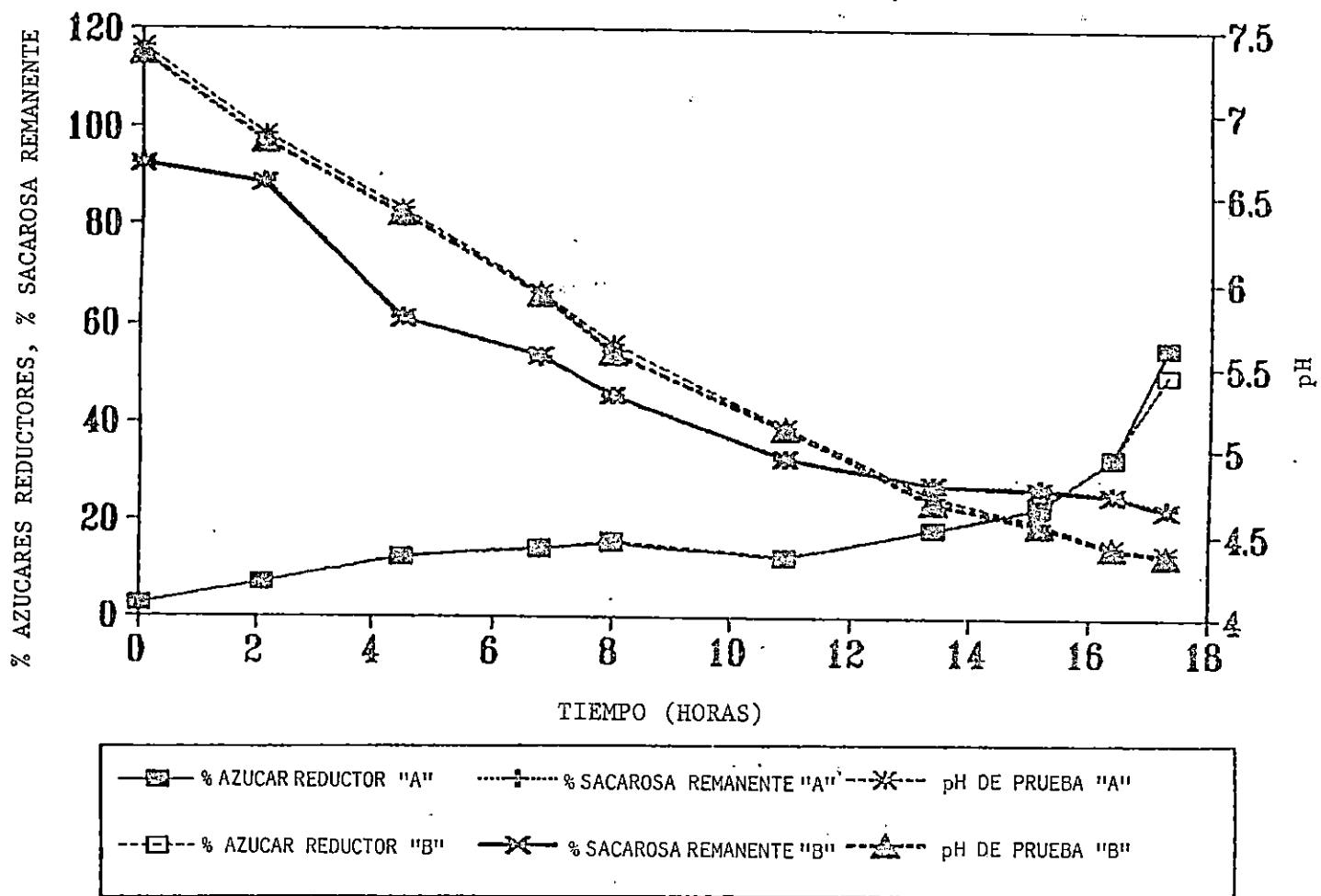


FIGURA 26: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 10% p/v DE SACAROSA INICIAL Y AGITACION A 70 rpm A 28°C.

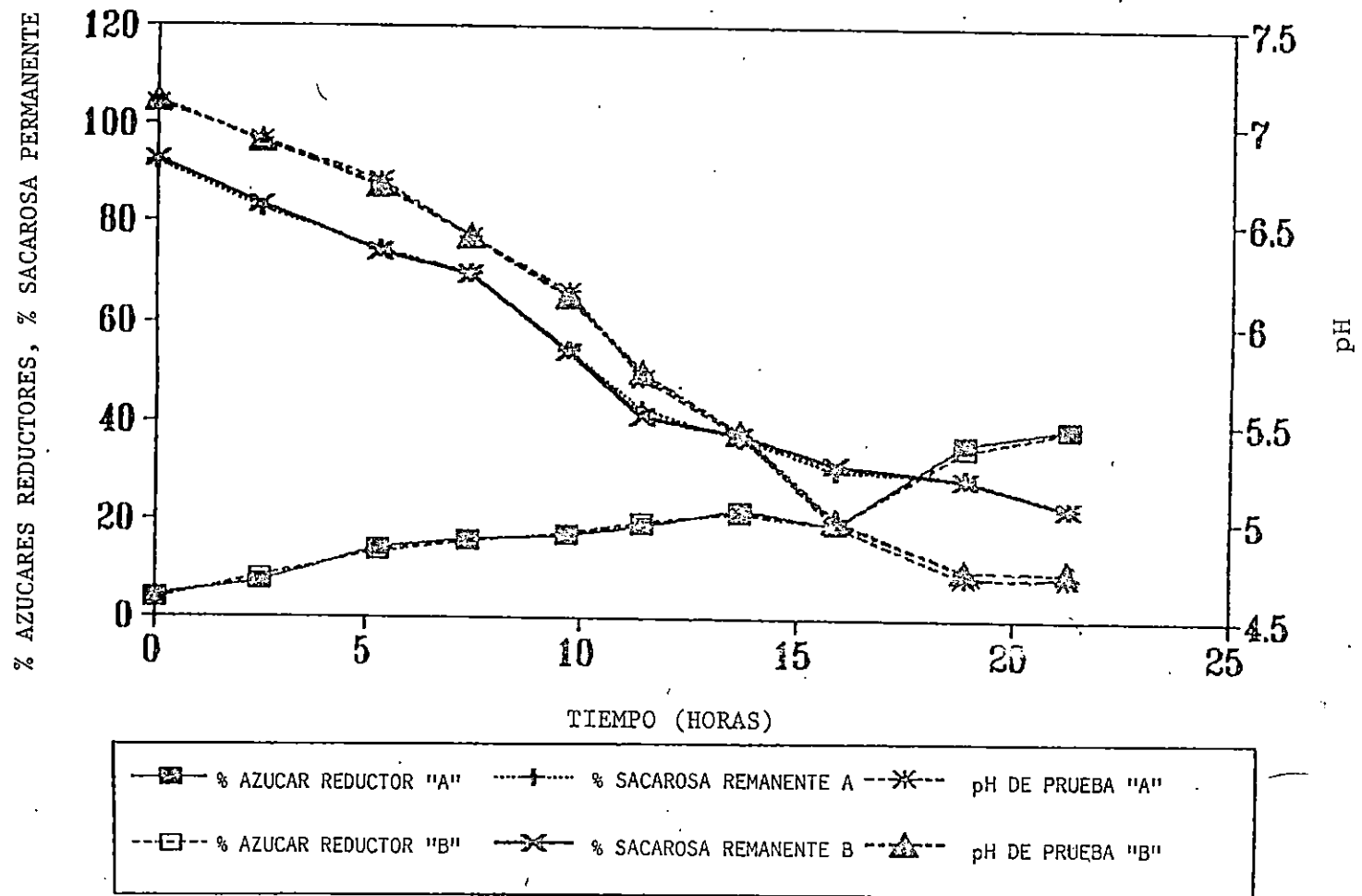


FIGURA 27. SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA Y pH DE UNA FERMENTACION CON 30% p/v DE SACAROSA INICIAL Y CON AGITACION A 70 rpm a 28°C.

CUADRO 26

COMPARACION DE RENDIMIENTOS DE PRODUCCION DE DEXTRANA Y PORCENTAJES DE SACAROSA REMANENTE EN MEDIO CON Y SIN AGITACION

CONCENTRACION INICIAL DE - AZUCAR % p/v	PRUEBA	TIEMPO DE FERMENTACION HORAS	RENDIMIENTO g DEXTRANA/100g AZUCAR		SACAROSA REMANENTE % P/P		AZUCARES REDUCTORES % P/P	
			CON AGITACION	SIN AGITACION	CON AGITACION	SIN AGITACION	CON AGITACION	SIN AGITACION
10	A	16	18.93	56.00	22.4	9.6	55.00	20.00
	B	16	21.96	56.77	25.7	9.5	49.28	20.00
30	A	20	10.30	22.31	20.2	11.4	38.57	16.10
	B	20	9.77	22.82	20.8	9.7	38.57	16.60

AGITACION: 70 rpm.

5.8 PRODUCCION DE DEXTRANA POR FERMENTACION NATURAL A DIFERENTES TEMPERATURAS.

El objetivo de este experimento consiste en determinar el efecto de la temperatura sobre el tiempo de fermentación y la producción de dextrana. Para ello, se trabajó con las concentraciones iniciales de sacarosa de 10% y 30% p/v a tres diferentes temperaturas, 25°C, 28°C y 32°C. Es de hacer notar que los resultados de 28°C ya se tenían, pues son los que corresponden a la fermentación natural a temperatura ambiente.

Los resultados indican que el aumento de temperatura disminuye tanto el rendimiento de dextrana producida como el tiempo de fermentación en ambas concentraciones iniciales de sacarosa como puede verse en el cuadro 27. Sin embargo la velocidad del crecimiento de la bacteria, indicada por la caída del pH aumenta a 32°C como se presenta en las figuras 28 a 31, de las cuales, se puede decir que a pesar de ser la fermentación más rápida, puede ser que la enzima pierda su actividad con mayor rapidez a una temperatura alta que a una baja; esta consideración resulta valedera si se toma en cuenta que la temperatura óptima de la mayor actividad de la enzima es de 25°C. Por lo que se puede sugerir que con el aumento de la temperatura podría es

CUADRO 27
 RESULTADOS DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA
 PRODUCCION DE DEXTRANA

Concentración inicial de - sacarosa % p/p	Temperatura Experimentada (°C)	Rendimiento g dextrana / 100g azúcar	Sacarosa Remanente % p/p	Azúcares Reductores % p/p	Tiempos de Fermentación (h)
10 A	25	78.03	24.36	6.67	16.5
	28	56.00	0.60	20.00	16
	32	30.34	28.9	46.10	12
10 B	25	79.48	23.2	6.67	16.5
	28	56.77	9.5	20.00	16
	32	27.46	22.5	46.10	12
30 A	25	43.35	18.0	6.43	21
	28	22.31	11.4	16.10	20
	32	11.05	25.7	52.14	11
30 B	25	41.90	29.0	6.43	21
	28	26.82	8.7	16.60	20
	32	13.01	25.0	55.91	11

tar ocurriendo una inhibición enzimática.

Por otro lado, del cuadro 27 y de las gráficas 28 a 31 puede observarse que a medida que se incrementa la temperatura, el porcentaje de azúcares reductores al final de la fermentación va siendo mayor. Esto podría deberse a dos factores principalmente, que esté ocurriendo una hidrólisis ácida favorecida por la temperatura y valores de pH bajos ó a una pérdida de actividad enzimática para poder polimerizar la glucosa, ya que como puede verse en la columna de sacarosa remanente del cuadro 27 existe sacarosa disponible para que la enzima pudiera polimerizar y formar dextrana.

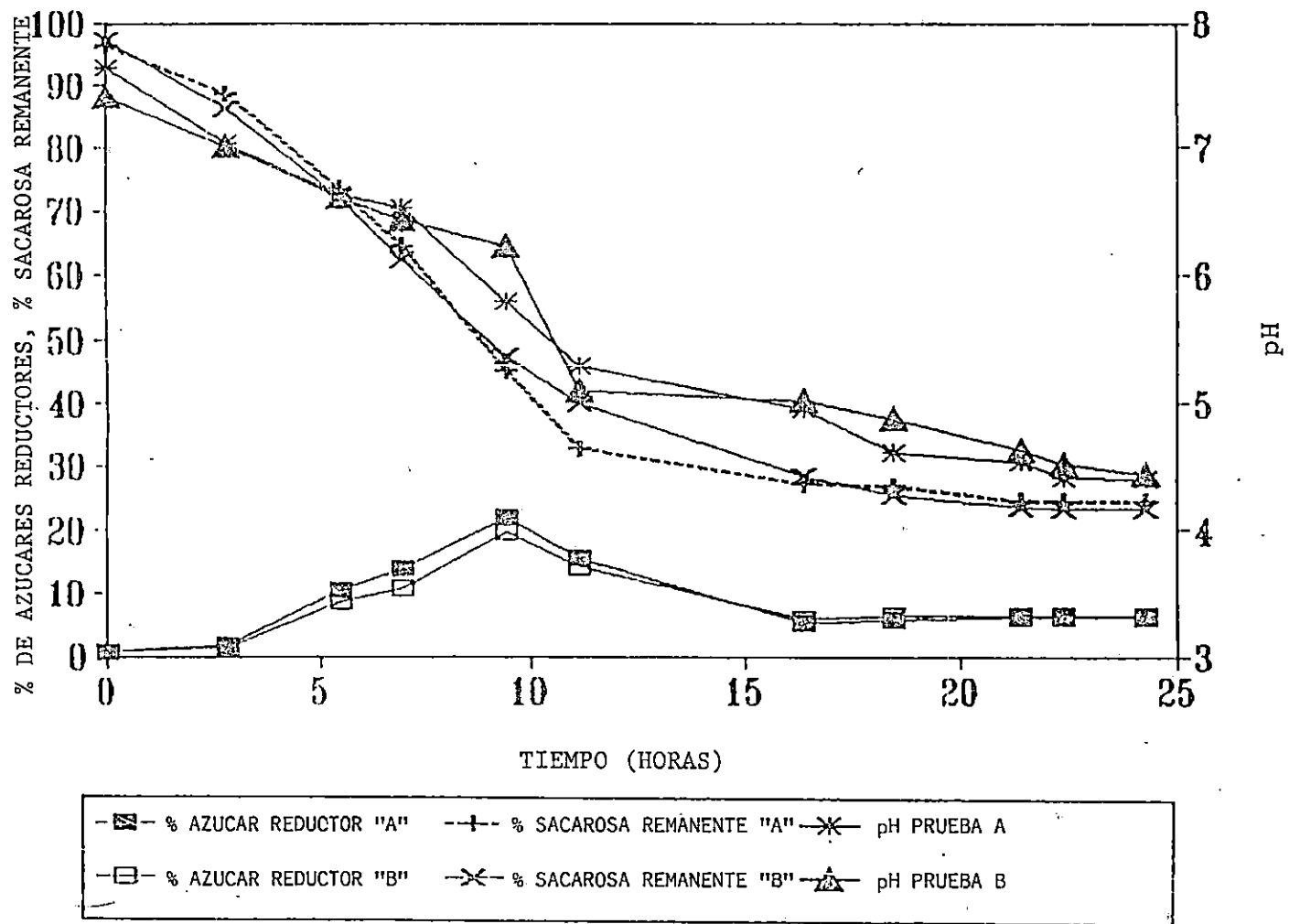


FIGURA 28: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 10% p/v INICIAL DE SACAROSA A 25°C.

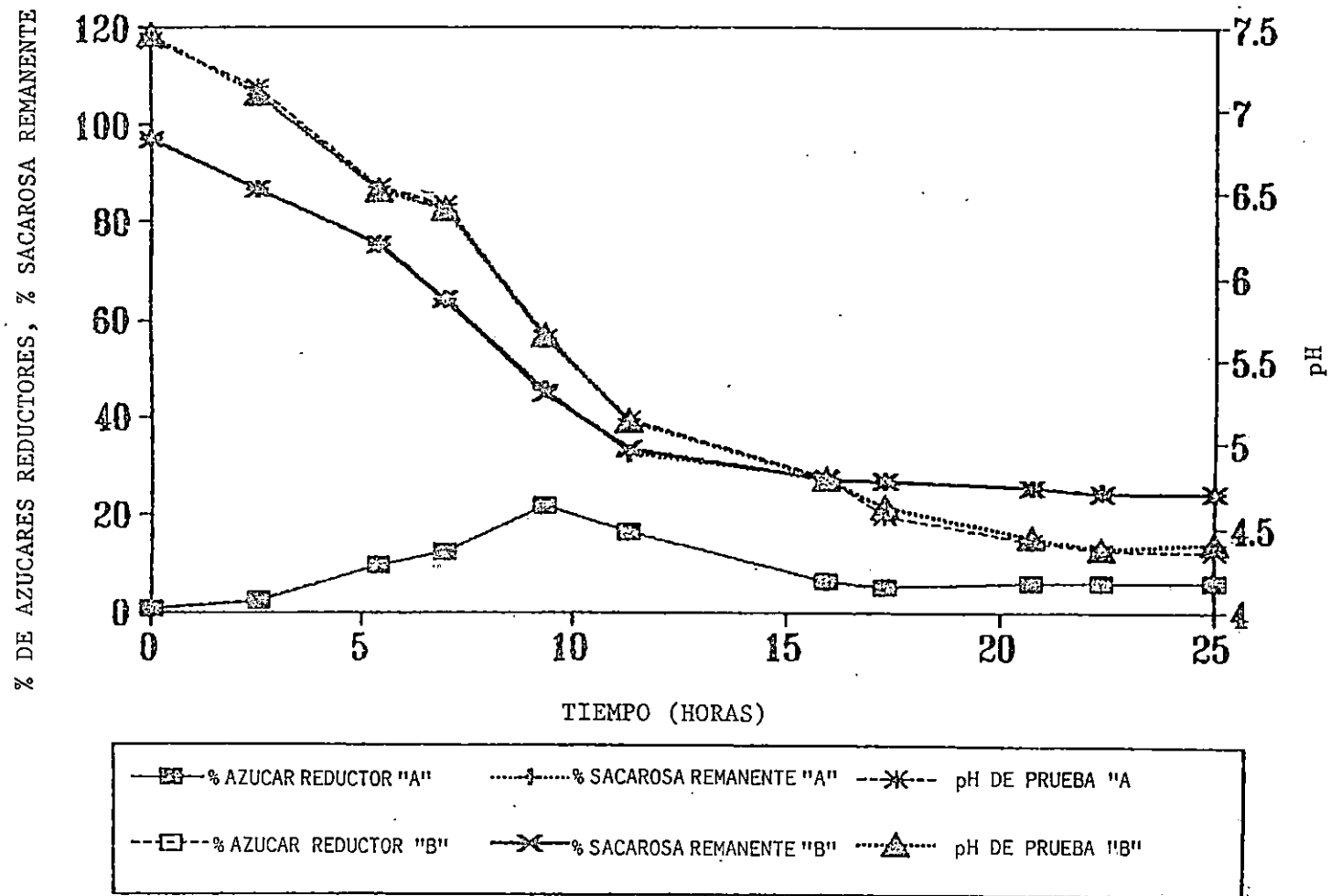


FIGURA 29: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 30% p/v INICIAL DE SACAROSA A 25°C.

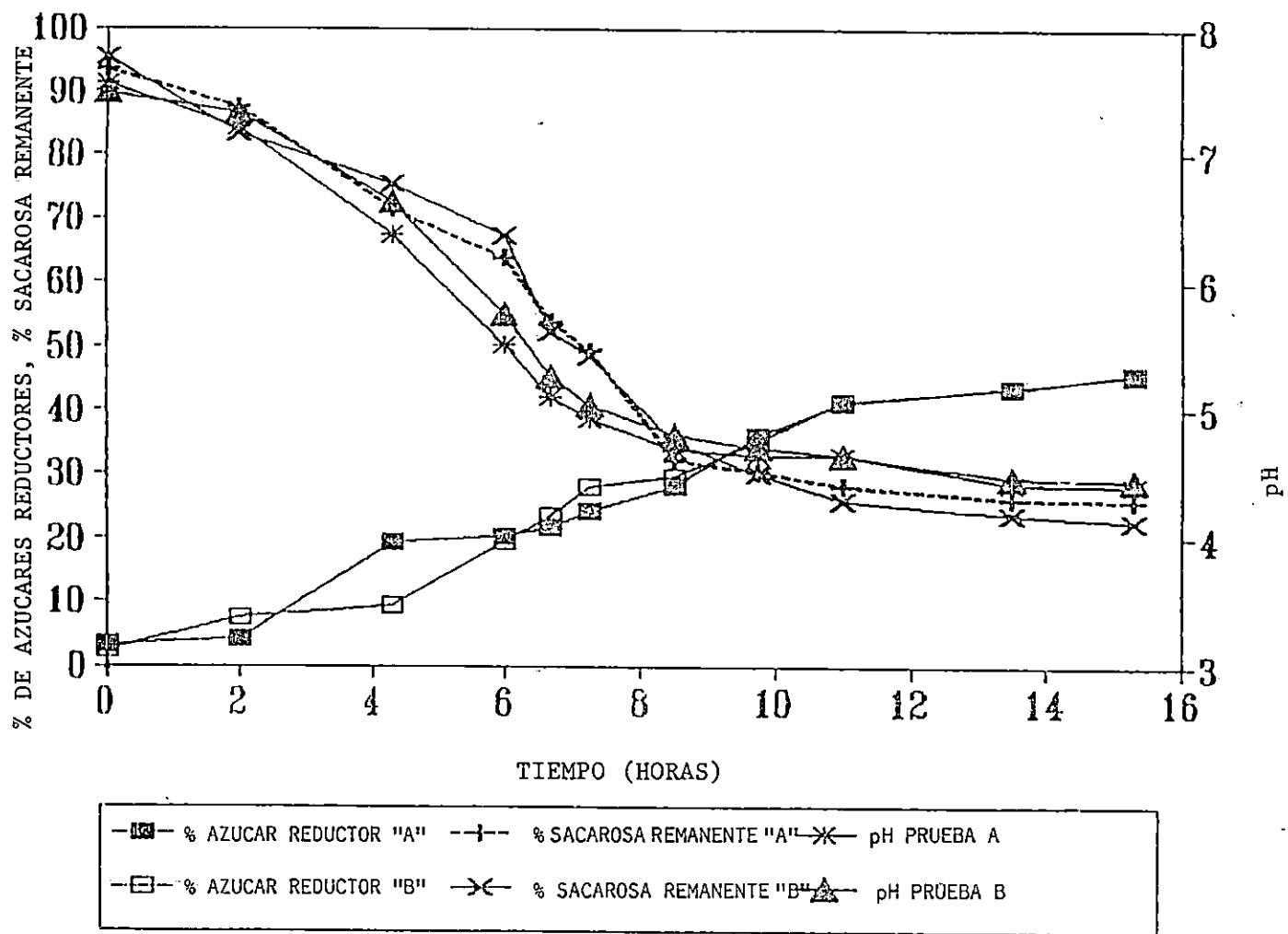


FIGURA 30: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 10% p/v INICIAL DE SACAROSA A 32°C.

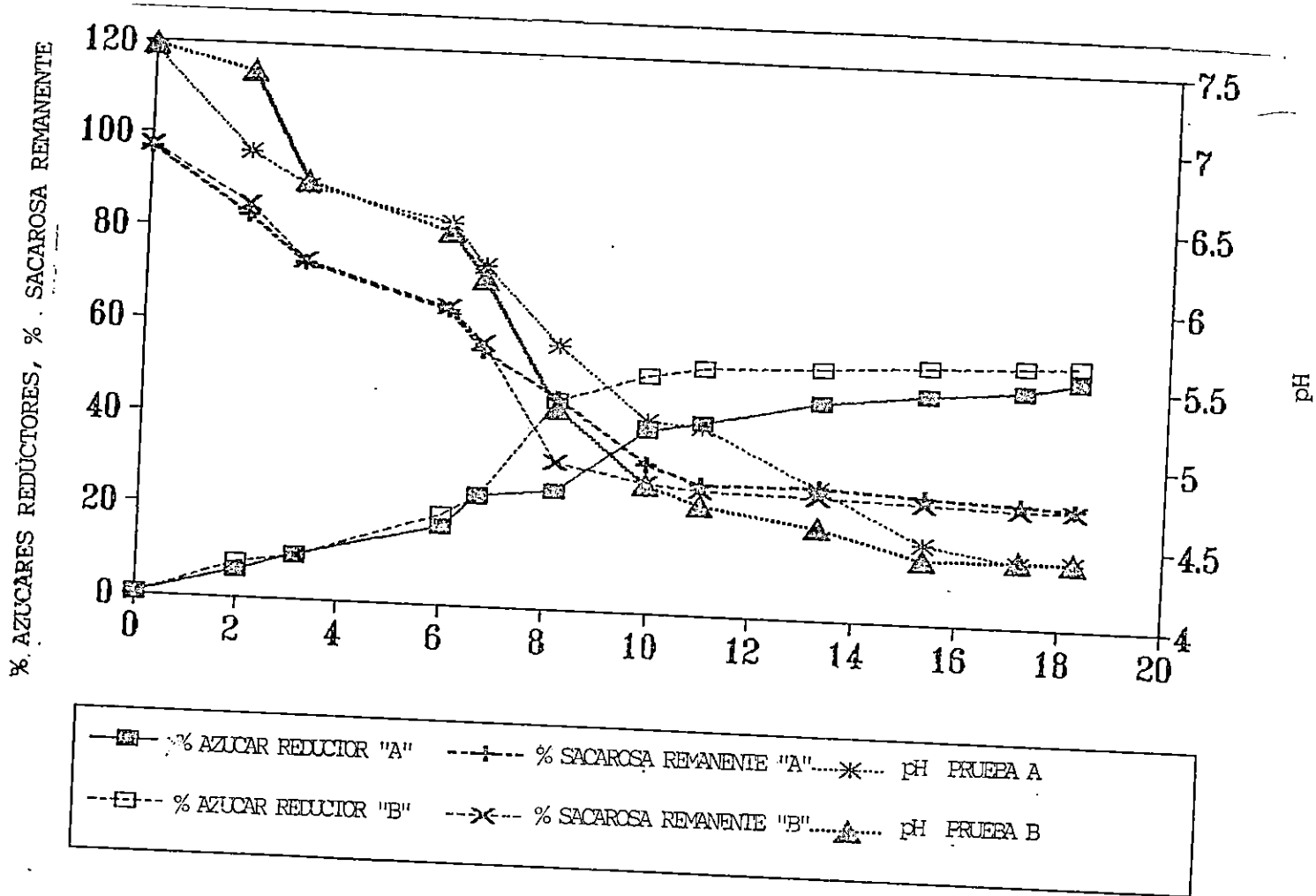


FIGURA 31: SEGUIMIENTO CON EL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA, AZUCARES REDUCTORES Y pH DE UNA FERMENTACION CON 30% p/v INICIAL DE SACAROSA A 32 °C.

5.9 EVALUACION DE LA CALIDAD Y CONCENTRACION DE K_2HPO_4 EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANA NATIVA.

Estas pruebas se efectuaron con la finalidad de determinar que efecto causa sobre el rendimiento de dextrana el cambiar tanto la concentración como la calidad de reactivo amortiguador (fosfato dipotásico K_2HPO_4) del medio, ya que éste es el que va en mayor proporción en el medio de Basamin-Busch (ver cuadro 11, sección 3.3.3), utilizado para la producción de dextrana, por lo que una optimización de la concentración de este reactivo, redundaría en menores costos de operación, como puede verse en el cuadro 28, el costo para dicho reactivo es relativamente elevado en comparación a los otros.

CUADRO 28

COSTO DEL MEDIO BASAMIN-BUSCH PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANA.

COMPONENTE	REQUERIMIENTO (% p/v)	COSTO ₡/ LITRO
Extracto de levadura	0.500	1.648
Cloruro de sodio	0.001	0.002
Sulfato de magnesio	0.020	0.074
Sulfato de manganeso	0.001	0.003
Sulfato ferroso	0.001	0.003
Fosfato dipotásico	3.000	17.280
Azúcar morena	30.000	1.056
COSTO TOTAL		₡ 20.060 / LITRO

Del cuadro 28, se observa que al reducir la concentración del 3% de fosfato dipotásico, se reduciría considerablemente el costo del medio.

Desafortunadamente, no fue posible realizar estas pruebas con el reactivo calidad analítica, pero sí con el reactivo calidad industrial, por ser su costo relativamente bajo como se ve en el cuadro 28.

Los medios se prepararon por duplicado utilizando el medio Basamin-Busch con la variante de que la concentración de fosfato dipotásico del 3% p/v, fue sustituida por concentraciones de 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% y 5% p/v de calidad industrial, obteniéndose los resultados mostrados en el cuadro 29.

CUADRO 29

RESULTADO DE LA EVALUACION DE LA CALIDAD Y CONCENTRACION DEL REACTIVO AMORTIGUADOR DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE DEXTRANA NATIVA

CONCENTRACION DE FOSFATO DIPOTASICO.	RENDIMIENTO g. DEXTRANA/100 g AZUCAR		COSTO DEL MEDIO DE CULTIVO €/Litro.	
	CONCENTRACION AZUCAR (% p/v)		CALIDAD REACTIVO	CALIDAD USP
% p/v	10	30		
0.5	60.3	8.4	5.66	3.14
1.0	54.8	8.1	8.54	3.50
2.0	50.9	7.7	14.30	4.22
3.0	50.9	7.3	20.06	4.94
4.0	49.8	6.6	25.82	5.66
5.0	44.7	6.4	31.58	6.38

En el cuadro 29, se ve que la utilización de fosfato dipotásico calidad industrial trae como consecuencia la disminución de los rendimientos a medida que aumenta la concentración del reactivo, tanto para una concentración inicial de sacarosa del 10% p/v como para 30% p/v. Esto posiblemente se deba a la presencia de inhibidores del crecimiento celular o de la producción de enzima.

Aún así, para una concentración del reactivo calidad industrial del 3%, el rendimiento de 50.9 es ligeramente menor que el 56.0 de la fermentación de las mismas concentraciones de reactivo y de sacarosa inicial y además, el costo del medio es menor. A pesar de esto, es necesario efectuar muchas pruebas y efectuar análisis estadístico antes de hacer una sustitución de la calidad del reactivo y comparar resultados de costo del medio contra rendimientos de dextrana.

5.10 DETERMINACION DEL TIEMPO DE SECADO Y DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA DEXTRANA PRODUCIDA

El proceso de purificación de la dextrana requiere de precipitación y diluciones continuas, por lo que después de este proceso se obtiene una masa húmeda. Para efectos de calcular el rendimiento en peso, se necesitó que la dextrana estuviera en forma pulverizada, con un contenido final de humedad constante. Para esto,

fue necesario efectuar una operación de secado igual para todas las muestras.

Se construyeron curvas de secado a temperaturas de 50°C a 78°C con la finalidad de determinar el tiempo necesario para eliminar la mayor cantidad de agua de la muestra y de seleccionar una temperatura de secado adecuada. La operación de secado se efectuó utilizando una estufa convencional, controlando la pérdida de peso de la muestra en función del tiempo, hasta obtener un peso constante.

Los resultados obtenidos, se muestran en la figura 32, donde el % peso se calculó aplicando la ecuación (6).

$$\% \text{ peso} = \frac{(W_C - W_A)}{(W_C - W_B)} \times 100 \quad (6)$$

Donde:

W_A = Peso del recipiente más la muestra al tiempo t .

W_B = Peso del recipiente más la muestra cuando se alcanza el peso constante.

W_C = Peso del recipiente más la muestra al tiempo $t=0$.

Del análisis de la figura 32, se optó por efectuar a todas las muestras una operación de secado a 60°C y 2.5 horas. A pesar de que a 68°C y 2.5 horas se remueve mayor cantidad de agua, en las muestras empieza a aparecer una

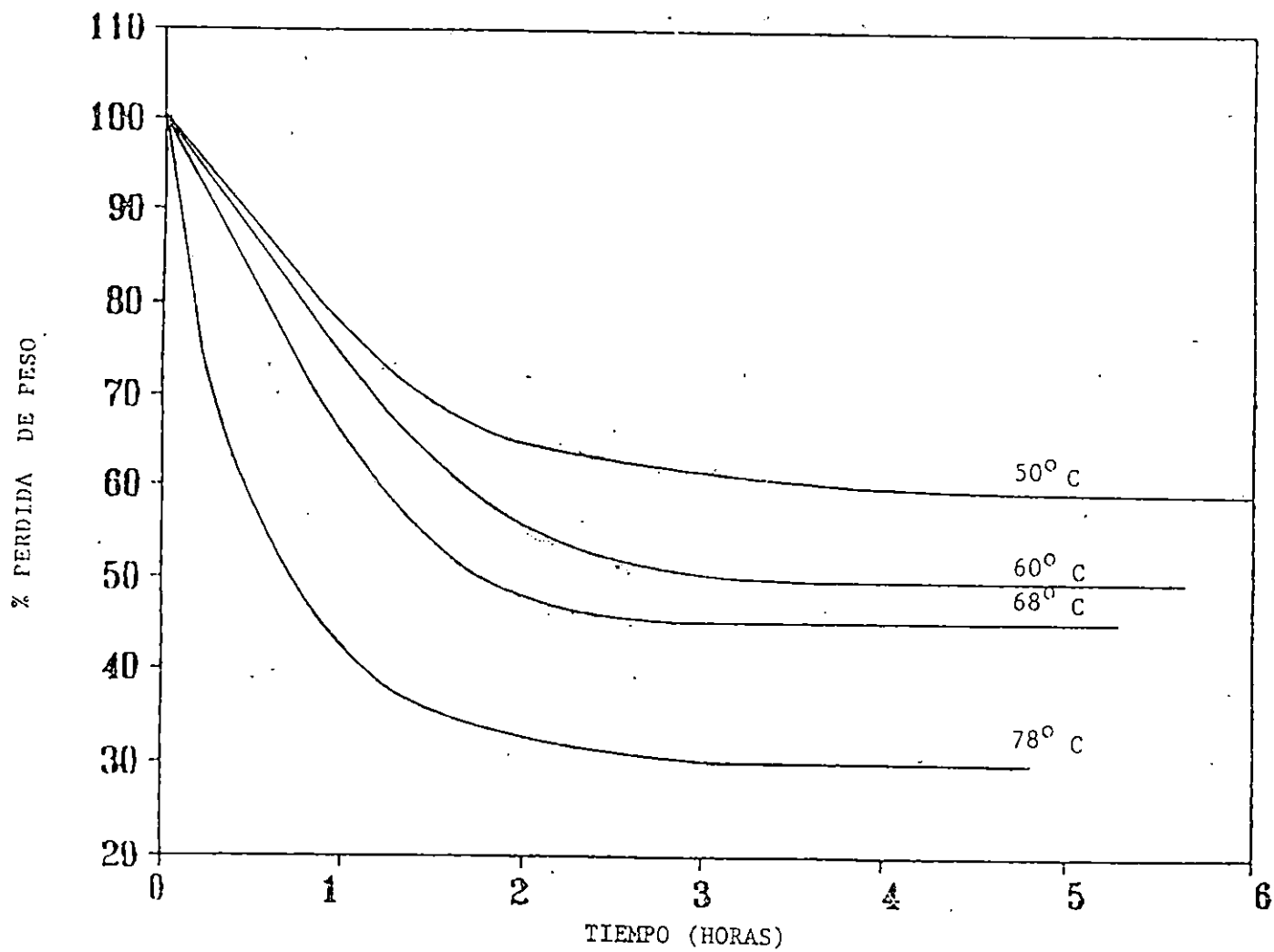


Figura 32: Curvas de secado para muestras de dextrana a diferentes temperaturas

coloración oscura y se pegan en el recipiente, lo que indica que empiezan a quemarse.

Para determinar la humedad final de la muestra se utilizó el método por arrastre con tolueno, cuyo procedimiento se muestra en el apéndice B.

Se utilizaron muestras provenientes de la precipitación de 50 ml del medio fermentado de cada una de las concentraciones iniciales de sacarosa estudiadas. Todas las muestras de dextrana fueron secadas bajo las mismas condiciones, 60°C y por 2.5 horas, dispuestas en el recipiente de tal forma que el espesor sea el mínimo posible hasta alcanzar un peso constante.

Bajo las condiciones de secado ya mencionadas, se tomó una muestra correspondiente al 30% de sacarosa inicial y se le determinó la humedad aplicando la ecuación (7).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso del agua obtenida}}{\text{peso de la muestra}} \times 100 \quad (7)$$

La muestra tenía un peso de 2 g y luego de aplicarle el método por arrastre con tolueno, se obtuvieron 0.3 ml de agua, por lo que la humedad calculada fue:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{0.3 \text{ g. de agua}}{2 \text{ g de dextrana}} \times 100 = 15\%$$

Así, todos los rendimientos calculados en este estudio, están afectados por este factor ya que se consideró que luego, de someter la muestra a igual operación de secado, su contenido final de humedad, fue del 15%.

5.11 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR MEDIO DE LAS DEXTRANAS NATIVAS PRODUCIDAS.

Al igual que otros polímeros, la distribución de los pesos moleculares en las dextranas nativas no es homogénea, es decir, cada muestra del polímero es caracterizada en base a un peso molecular promedio.

El método utilizado en este estudio, se describe en el Apendice C y consiste en construir una curva de calibración de pesos moleculares de dextranas patrones contra viscosidades intrínsecas $[\eta]$.

De las dextranas producidas se preparan soluciones de concentraciones adecuadas, se determinan sus viscosidades intrínsecas y con estos valores se lee en la curva de calibración el correspondiente peso molecular promedio.

5.11.1 CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES.

Para la construcción de la curva se obtuvieron

dextranas patrones de peso molecular medio conocidos, los que se indican en el cuadro 30.

CUADRO 30
DEXTRANAS PATRONES UTILIZADAS PARA CONSTRUIR LA
CURVA DE CALIBRACION DE PESOS MOLECULARES

DEXTRANA DE PESO MOLECULAR MEDIO	CATALOGO SIGMA
10,000	D-9260
40,000	D-4133
70,000	D-1537
500,000	D-5251
2,000,000	D-5376

FUENTE: Sigma Chemical Co., 1991.

Se prepararon soluciones de cada uno de los patrones a diferentes concentraciones y se les determinó su viscosidad relativa (n_r) utilizando un viscosímetro de Ostwald como el que se muestra en la figura C.1 del apéndice.

La viscosidad relativa, viene definida por la relación de los tiempos de cada una de las concentraciones de la sustancia respecto al tiempo que tarda la sustancia de referencia en pasar el menisco de las marcas A a B.

En este estudio se utilizó agua destilada como sustancia referencia con un tiempo promedio

de flujo de 16.29 segundos a 20°C

Los tiempos promedios para cada concentración de cada uno de los pesos moleculares de las dextranas patrones, así como sus respectivas viscosidades relativas, se muestran en el cuadro 31.

Según la teoría expuesta en el apéndice C, se utilizan las concentraciones cuyas viscosidades relativas estén comprendidas entre 1.1 y 1.5, valores que garantizan la linealidad de las curvas construidas.

Como se observa en el cuadro 31, para la dextrana de 2,000,000 las concentraciones comprendidas entre 0.2% y 0.8% dan valores de n_r dentro de los límites establecidos. Asimismo, para la dextrana de peso molecular de 500,000 se toman las concentraciones desde 0.4% hasta 1%. Para la de peso molecular de 70,000 se toman desde 0.6% hasta 2.1%. De la de peso molecular de 40,000 se toman desde 0.9% hasta 2.4% y por último, para la de peso molecular de 10,000 se toman las concentraciones desde 2% hasta 5%.

Las líneas de $(\ln n_r)/c$ versus concentración para los diferentes pesos moleculares se muestran

CUADRO 31

DETERMINACION DE VISCOSIDADES RELATIVAS PARA DEXTRANAS PATRONES EN EL VISCOSIMETRO DE OSTWALD (VOLUMEN DE MUESTRA 8 ml A 20°C)

PESOS MOLECULARES PROMEDIOS DE DEXTRANAS PATRONES														
21000,000			500,000			70,000			40,000			10,000		
% p/v	t	η_r	% p/v	t	η_r	% p/v	t	η_r	% p/v	t	η_r	% p/v	t	η_r
1.0	26.885	1.650	1.0	23.950	1.470	2.1	22.79	1.399	2.4	21.68	1.331	5.0	21.00	1.289
0.8	24.753	1.591	0.9	23.060	1.415	1.8	21.04	1.292	1.8	20.51	1.259	4.5	20.85	1.279
0.6	22.600	1.387	0.8	22.192	1.362	1.5	21.04	1.292	1.8	20.51	1.259	4.0	20.62	1.266
0.4	20.430	1.254	0.7	21.366	1.312	1.2	20.12	1.235	1.5	19.84	1.218	3.5	20.36	1.246
0.2	18.296	1.123	0.6	20.568	1.263	0.9	19.18	1.177	1.2	19.17	1.178	3.0	19.92	1.223
			0.4	19.050	1.169	0.6	18.22	1.118	0.9	18.47	1.134	2.0	18.93	1.162
			0.2	17.630	1.081				0.6	17.74	1.089	1.0	17.75	1.086

% p/v = concentración de las soluciones de dextranas patrones evaluada a cada peso molecular
 t = tiempo promedio de flujo en el viscosímetro en segundos.
 η_r = viscosidad relativa de las soluciones

en la figura 33, donde los puntos de intersección representan las viscosidades intrínsecas para cada peso molecular (ver cuadro 32). Estos valores se utilizaron para construir la gráfica de la figura 34 al relacionarlos con los respectivos pesos moleculares de dextranas patrones, dando origen a la curva de calibración requerida para determinar los pesos moleculares de las muestras de dextranas producidas en esta investigación.

CUADRO 32

VISCOSIDADES INTRINSECAS DE LAS DEXTRANAS PATRONES DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES PROMEDIO GRAFICADOS EN LA CURVA DE CALIBRACION DE LA FIGURA 34

PESO MOLECULAR, PM	VISCOSIDAD INTRINSECA [η]
2,000,000	0.6016
500,000	0.3945
70,000	0.1973
40,000	0.1518
10,000	0.0914

5.11.2 DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LA DEX- TRANA NATIVA PRODUCIDA

Para determinar el peso molecular a cada una de las dextranas producidas, las muestras de soluciones de concentración conocidas se prepararon a partir de dextrana en polvo, secada hasta peso constante.

Para las concentraciones de 10% y 30% p/v de azúcar morena, se determinaron los pesos moleculares de las dextranas producidas en diferentes condiciones de fermentación.

En las figuras 35 a 37 se pueden leer las viscosidades intrínsecas obtenidas para cada condición de operación. Estas se utilizaron para leer los pesos moleculares respectivos en la curva de calibración (figura 34).

Los resultados obtenidos se resumen en los cuadros 33 a 35 donde se observa que con una fermentación natural, a medida que aumenta el porcentaje inicial de azúcar en el medio de fermentación, disminuye el peso molecular de la dextrana producida.

En base a los altos pesos moleculares obtenidos se puede concluir, que las dextranas producidas no podrían utilizarse con fines clínicos como sustituto de plasma sanguíneo; a menos, que se les sometiera a un proceso de hidrólisis ácida o enzimática, hasta alcanzar los valores de pesos moleculares entre 40,000 y 70,000; por supuesto, no sin antes efectuar, un riguroso análisis toxicológico de las soluciones de dextrana, como el presentado en el apéndice D.

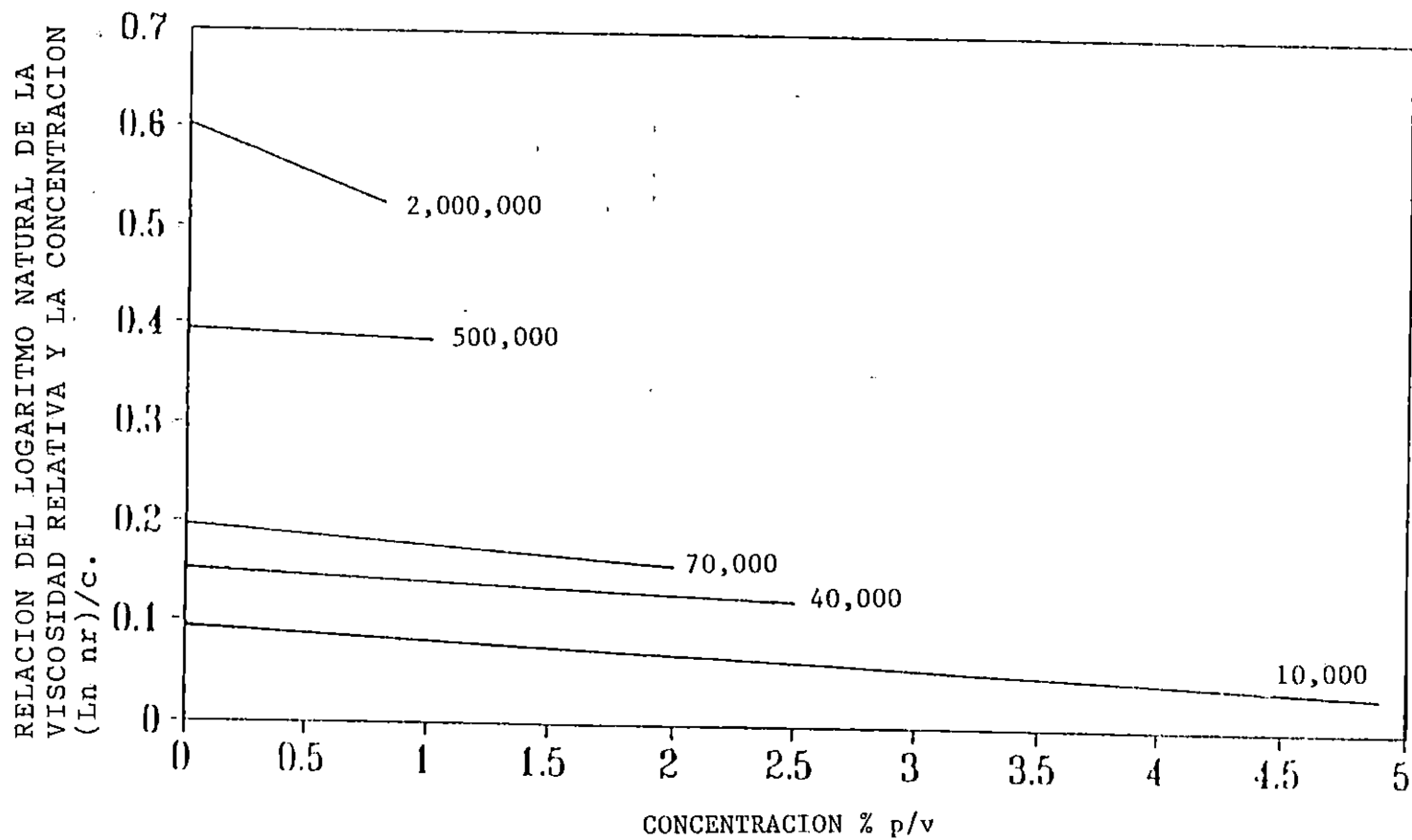


FIGURA 33. GRÁFICA DE LA RELACION DEL LOGARITMO NATURAL DE LA VISCOSIDAD RELATIVA Y LA CONCENTRACION vs. CONCENTRACION DE LAS DEXTRANAS COMERCIALES DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES.

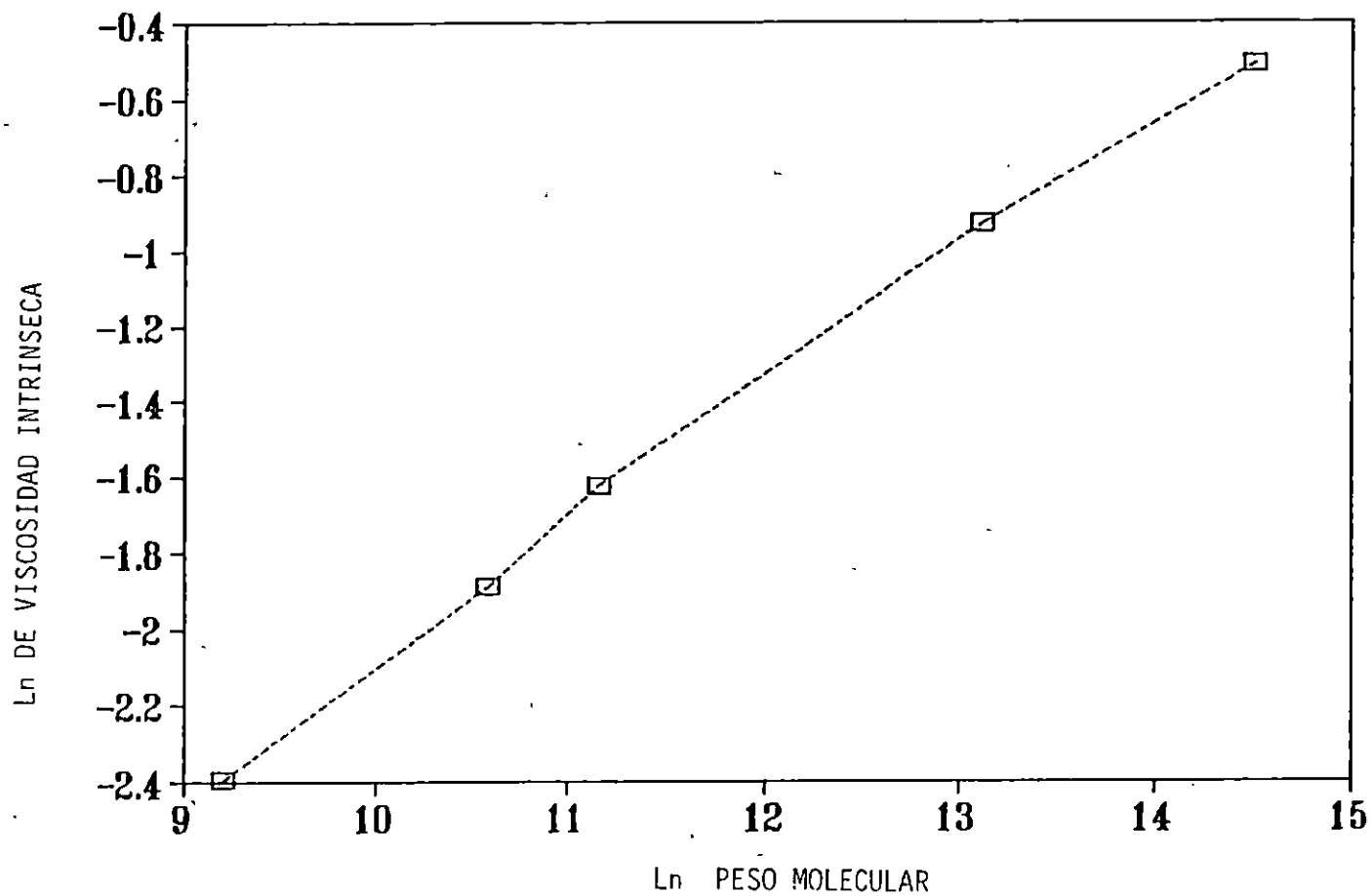


FIGURA 34: CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES PROMEDIOS DE LAS DEXTRANAS NATIVAS PRODUCIDAS. A 20°C

RELACION DEL LOGARITMO NATURAL DE LA VISCOSIDAD
 RELATIVA Y LA CONCENTRACION ($\ln \eta_r$)/c.

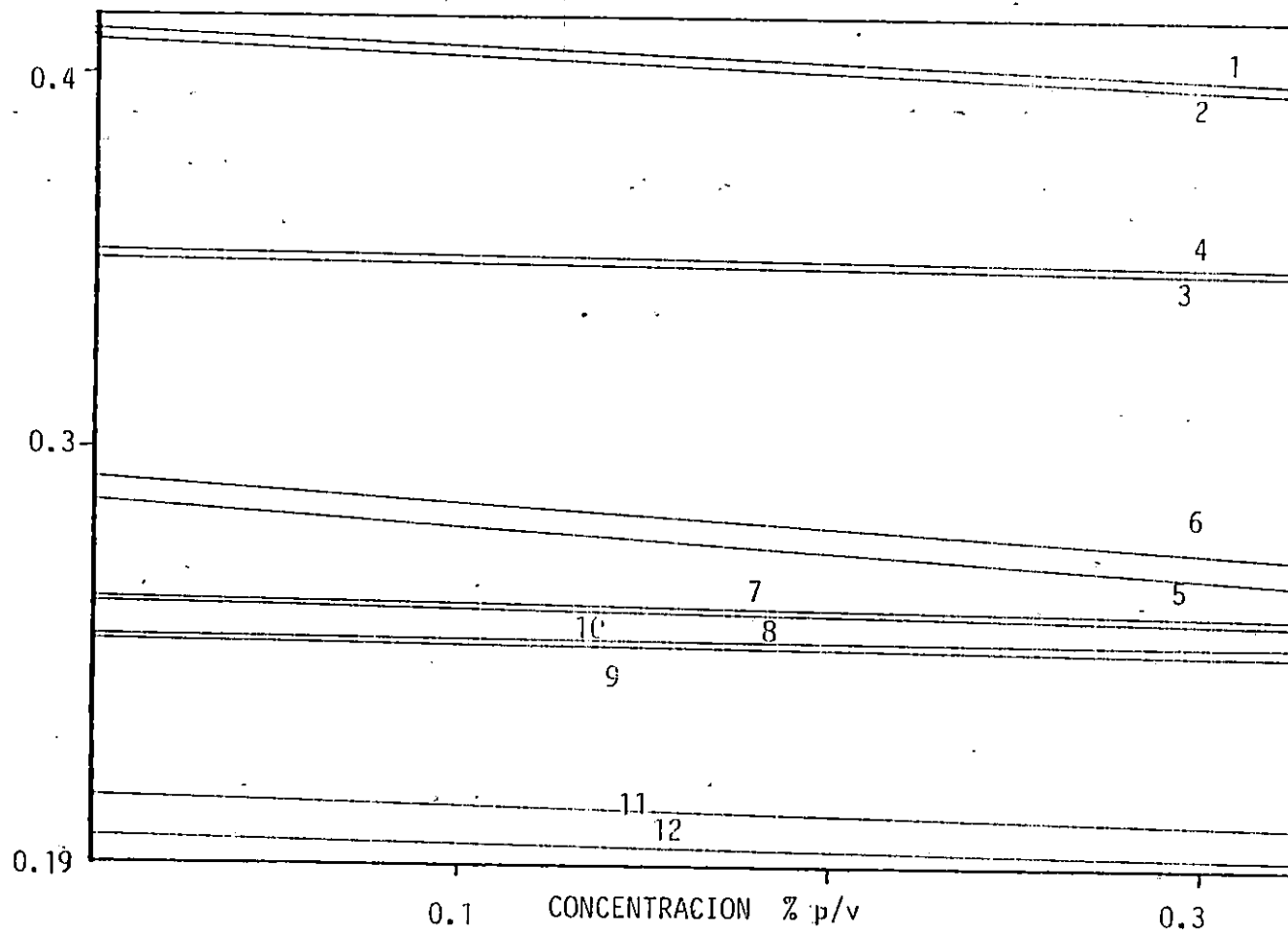


FIGURA 35: DETERMINACION DE LOS VALORES DE LAS VISCOSIDADES INTRINSECAS DE SOLUCIONES DE DEXTRANAS PRODUCIDAS POR FERMENTACION NATURAL, REPORTADOS EN EL CUADRO 33.

RELACION DEL LOGARITMO NATURAL DE LA
 VISCOSIDAD RELATIVA Y LA CONCENTRACION
 (Ln nr)/c.

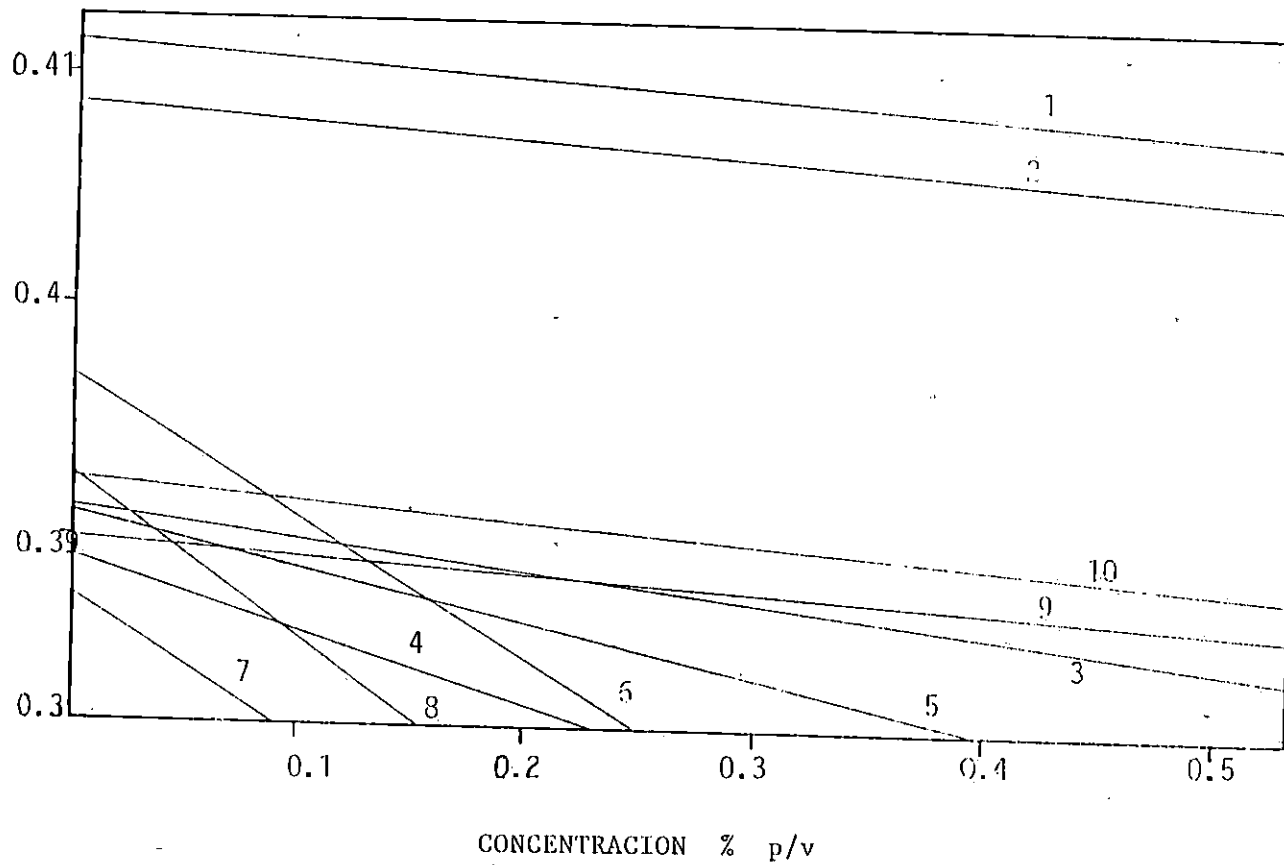


FIGURA 36: DETERMINACION DE LAS VISCOSIDADES INTRINSECAS DE SOLUCIONES DE DEXTRANAS PRODUCIDAS EN MEDIO CON 10% p/v DE SACAROSA INICIAL REPORTADOS EN EL CUADRO 34.

RELACION DEL LOGARITMO NATURAL DE LA
 VISCOSIDAD RELATIVA Y LA CONCENTRACION
 ($\ln \eta_r / c$).

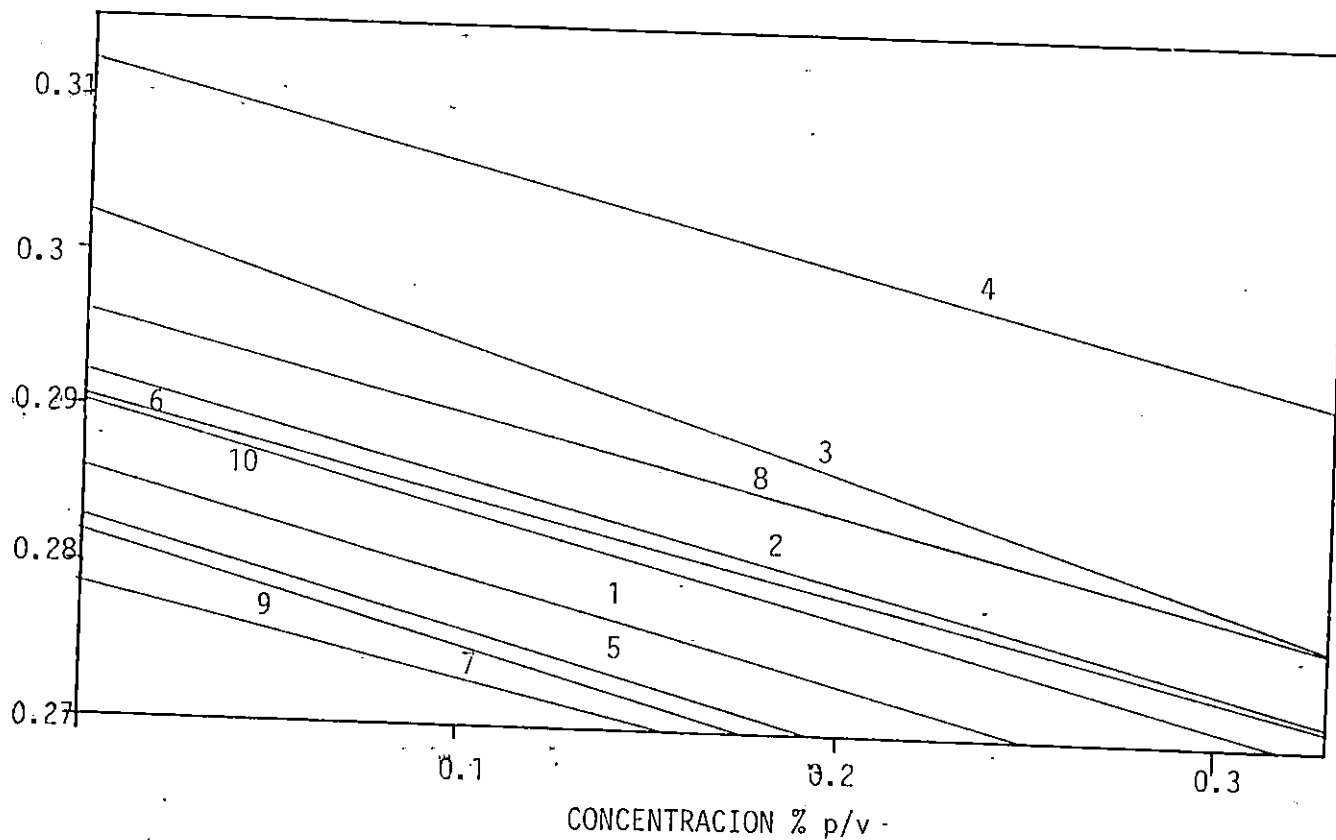


FIGURA 37: DETERMINACION DE LOS VALORES DE LAS VISCOSIDADES INTRINSECAS DE SOLUCIONES DE DEXTRANAS PRODUCIDAS EN MEDIO CON 30% p/v DE SACAROSA INICIAL REPORTADOS EN EL CUADRO 35.

CUÁDRO 33

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE VISCOSIDADES INTRINSECAS Y PESOS MOLECULARES
 PROMEDIOS OBTENIDOS EN UNA FERMENTACION NATURAL A 28°C Y UTILIZANDO
 DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE AZUCAR

No. LINEA DE GRAFICA 35	CONCENTRACION INICIAL DE AZUCAR % p/v	VISCOSIDAD INTRINSECA DETERMINADA EN LA FIGURA 35	PESO MOLECULAR PROMEDIO LEIDO EN LA FIGURA 34	UTILIDADES DE LA DEXTRANA AL PESO MOLECULAR EVALUADO
1	10	0.41117	619.552	Tamices moleculares anticoagulante como sulfato dextrana.
2	10	0.40858	608.627	
3	20	0.35004	395.142	Purificación de soda cáustica por precipitación como ferro dextrana.
4	20	0.35157	400.000	
5	30	0.38609	224.875	Tamices moleculares.
6	30	0.20206	228.256	Formador de películas.
7	40	0.26010	172.353	Previene formación de hielo en helados.
8	40	0.25896	170.263	
9	50	0.24943	153.322	Suavizadores de arrugas.
10	50	0.25068	165.488	
11	60	0.20796	92.253	Dextrana clínica como recuperadora de volumen sanguíneo.
12	60	0.19780	80.209	

CUADRO 34.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE VISCOSIDADES INTRINSECAS Y PESOS MOLECULARES

PROMEDIOS OBTENIDOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE FERMENTACION

UTILIZANDO 10% p/v DE AZUCAR INICIAL EN EL MEDIO

No. LINEA DE GRAFICA 36	CONDICIONES DE FERMENTACION	VISCOSIDAD INTRINSECA DETERMINADA EN LA FIGURA 36.	PESO MOLECULAR PROMEDIO LEIDO EN LA FIGURA 34	UTILIDADES
1	Natural	0.41117	619,552	Tratamientos de anemias si se <u>acom</u> plejan con hierro.
2	a 28°C	0.40858	608,627	
3	A tempera- tura de 25°C	0.39112	528.716	Estabilizador de la espuma de la cerve- za.
4		0.38910	530.979	
5	A tempera- tura de 32°C	0.39086	537.746	Producción de jarabes de azúcar no cris- talizables.
6		0.39687	561.136	
7	A pH cons- tante en 5.2	0.38741	524.561	Producción de jarabes de azúcar no cris- talizables.
8		0.39250	544.044	
9	Con agita- ción a 70 rpm.	0.38980	533.652	Agente texturizante en bebidas dietéti- cas.
10		0.39230	543.271	

CUADRO 35.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE VISCOSIDADES INTRINSECAS Y PESOS MOLECULARES

PROMEDIOS OBTENIDOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE FERMENTACION

UTILIZANDO 30% p/v DE AZUCAR INICIAL EN EL MEDIO

No. LINEA DE GRAFICA 37.	CONDICIONES DE FERMENTACION	VISCOSIDAD INTRINSECA DETERMINADA EN LA FIGURA 37	PESO MOLECULAR PROMEDIO LEIDO EN LA FIGURA 34.	UTILIDADES
1	Natural a	0.28609	224.875	Películas protectoras contra la descomposición de alimentos. Confección de gomas y jaleas. Agente aglutinante en tabletas farmacéuticas y prolonga su acción estabilizador de helados.
2	28°C	0.29206	238.256	
3	A temperatura de	0.30240	262.548	
4	25°C.	0.31153	285.295	
5	A temperatura de	0.28288	217.905	
6	32°C	0.29067	235.075	
7	A pH constante en	0.28184	215.667	
8	5.2	0.29605	247.448	
9	Con agitación a 70	0.27862	208.848	
10	rpm	0.29014	233.876	

OBSERVACIONES

1. La fermentación de sacarosa con producción de dextrana por Leuconostoc mesenteroides, provee su propio medio anaeróbico debido a la abundante producción de gas (CO_2), que se acumula en la superficie durante el proceso.
2. Las fermentaciones correspondientes a medios con 10% de sacarosa inicial presentan la característica de formar una gran cantidad de gas, cuando el pH ha alcanzado un valor de 6; el gas empuja hacia arriba los pequeños grumos de dextrana, formando una capa superficial gelatinosa.
3. Las fermentaciones con 30% de sacarosa inicial en el medio son las que presentaron mayor viscosidad a todas las temperaturas experimentadas, especialmente a 25°C .
4. Si el fermentador permanece a temperatura ambiente después de finalizada la fermentación, la solución pierde viscosidad, lo que sugiere que se inicia otro proceso, una hidrólisis ácida de la dextrana producida por efecto del pH final de fermentación (4.2). Esta observación se basa en que el Leuconostoc mesenteroides no produce dextranasa, por lo que se descarta que se trate de una hidrólisis enzimática. La pérdida de viscosidad se disminuye colocando los fermentadores a temperatura de refrigeración, o separando la dextrana inmediatamente después de terminada la fermentación.

5. Cuando la dextrana es precipitada, es necesario dejar en reposo la solución por 15 a 20 minutos o centrifugarla, para separar la mayor cantidad de ésta.
6. El lavado de dextrana debe llevarse a cabo con la menor cantidad de agua posible; por ejemplo, para un precipitado que proviene de 25 ml de solución fermentada, se utilizará 5 ml de agua a 50°C, de lo contrario en cuanto más agua se utilice mayor será el consumo de alcohol para reprecipitarla.
7. Al hacer observaciones al microscopio, aplicando tinción simple a las muestras de dextrana seca, se comprueba que contienen un alto porcentaje de masa celular, principalmente la que corresponde a 10% de sacarosa. Las células ocluidas no se pudieron separar debido a que no se contaba con los medios de purificación adecuados.
8. Al disminuir la temperatura a 25°C el rendimiento de dextrana aumentó, indicando que las temperaturas bajas favorecen su producción, tal vez porque la multiplicación celular es lenta con menor consumo de sacarosa, mientras que la enzima se encontraba a una temperatura adecuada para retener su actividad.

CONCLUSIONES

1. El desarrollo de productos derivados de la caña de azúcar utilizando como materias primas jugo de caña, melaza o azúcar morena, sería una forma de diversificar la tecnología azucarera con obtención de beneficios económicos para El Salvador. Esta alternativa disminuiría los efectos de la fluctuación de precios del azúcar en el mercado internacional.
2. El desarrollo de la química del azúcar permitiría obtener productos para consumo interno y/o productos exportables captadores de divisas.
3. Durante el desarrollo de las fermentaciones se contó con una cepa de Leuconostoc mesenteroides aislada desde jugo de caña propio de El Salvador, lo que constituye una ventaja en el sentido de que se trata de un microorganismo acostumbrado a la temperatura ambiente del país (28 a 30°C), las sales y minerales propios del suelo, que muchas veces son contaminantes del azúcar morena.
4. Utilizando una fermentación natural, es decir sin agitación, ni control a un valor de pH establecido y temperatura ambiente (28°C), los mayores rendimientos de dextrana se lograron a concentraciones de 10% y 30% de sacarosa inicial en el medio, siendo estos de 56 y 56.77

para 10% de sacarosa y de 22.31 y 26.82 para 30% de sacarosa. Estos rendimientos se ven influenciados por la masa celular contenida en la dextrana producida, obteniéndose valores arriba del rendimiento estequiométrico (49%).

5. Las curvas de crecimiento de Leuconostoc mesenteroides muestran que bajo las condiciones estudiadas, la fase de retardo ha sido eliminada para la concentración de 10% de sacarosa y se ha reducido a solo 2 horas para la concentración de 30% de sacarosa. El período de máximo crecimiento se da entre los rangos de pH 7.2 a 5.9 para ambas concentraciones. Con 30% de sacarosa en el medio, el período de muerte es más acelerado.
6. Las concentraciones celulares máximas, indican que la producción de enzima no está directamente relacionada con la multiplicación celular, pero sí con la concentración de sacarosa inicial en el medio.
7. Los resultados obtenidos a pH constante (5.2) indican que el consumo de sacarosa aumenta para la producción de dextrana, debido a que la célula en este valor se en cuenta en período de muerte.
8. Los rendimientos obtenidos a pH constante (5.2) y 28°C y los obtenidos a 25°C son muy cercanos, sugiriendo que

a nivel industrial sería mas conveniente trabajar a temperatura baja (siendo la mínima 25°C), sin que ésta sea de refrigeración, y no controlando el pH.

9. La agitación favorece la multiplicación celular porque pone al alcance de la célula mayor cantidad de alimento, pero disminuye la producción de la enzima y con ello la de dextrana.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario desarrollar investigaciones sobre nuevas aplicaciones industriales del azúcar a fin de dominar los conocimientos científicos y tecnológicos para llevarlos a la práctica en El Salvador.
2. Se recomienda la utilización de un método directo para la determinación del peso molecular de la dextrana producida, como por ejemplo las columnas de sephadex, que tienen la ventaja de poder determinar la distribución de pesos moleculares de la muestra y no solo el peso molecular promedio, además de aumentar la exactitud de las mediciones.
3. Es importante que se desarrollen las investigaciones sobre producción de dextrana a escala de laboratorio, utilizando otros métodos como el enzimático o a través de enzima inmovilizada, esto permitiría seleccionar el proceso más adecuado para la producción del polímero en El Salvador.
4. Uno de los factores que influyen en la rentabilidad del proceso de producción de dextrana es la utilización del etanol durante la etapa de purificación. Se recomienda la optimización del consumo de etanol, así como también la optimización de su recuperación.
5. Durante el desarrollo del presente estudio no fue po-

sible determinar la calidad del producto terminado, dejándose para posteriores investigaciones la utilización de técnicas analíticas, tales como, espectrofotometría infrarroja, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta presión, etc., para establecer la pureza del producto terminado.

6. Una de las principales desventajas del método fermentativo es la de producir dextrana con una alta cantidad de células ocluidas, esto puede solventarse mediante el empleo de filtros seitz o de ultrafiltración del caldo fermentado antes de separar la dextrana o después del primer lavado con etanol.
7. Es indispensable optimizar los parámetros evaluados durante el proceso de producción del polímero, aplicando análisis estadístico a los resultados.

REFERENCIAS

1. Aurice, J.M., "By Products of the Cane Sugar Industry and Introduction to their Industrial Utilization". Elsevier Scientific Publishing Co. Second Edition, Chapter 13, USA, (1982).
2. Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology", The Williams and Wilkins Company, 8th Edition, USA, (1974).
3. Barker, P.E. and N.J. Ajongwen., "The Production of the Enzyme Dextranase Using Non-aerated Fermentation Techniques", Biotechnology and Bioengineering, Vol 37, page 703-707, April, USA, (1991).
4. Bourne, E.J. and D.H. Hutson., "Studies on Dextranases: Structures of Oligosaccharides from Leuconostoc mesenteroides (Birmicham Dextran)", The Biochemical Journal, Vol. 86, page 555-562, No 3, USA, (1963).
5. Berkeley, R.G. and D.C. Gooday., "Microbial Polysaccharides and Polysaccharides". Academic Press, First Edition, Chapter 5, USA, (1970).
6. Booker, B.E., "Electron Microscopy of the Dextran Produced by Acid Lactic Bacteria", National Institute for Research in Dulrying, Reading. USA, (1979).

7. Bourne, E.J. and D.H. Hutson., "Studies on Dextran Dextranases: The Action of Mould Dextranases on Modified Isomaltodextrins and the Effect of Anomalous Linkages on Dextran Hidrolysis", The Biochemical Journal, Vol. 85, page 158-162, No 1, October, USA,(1962).
8. Casida, L.E., "Production of Dextran", Industrial Microbiology, John Wiley and Son, Second Edition, USA,(1968).
9. Companhia de Desenvolvimento Tecnológico (CODETEC), Estudio de casos: "Fermentações", Brasil,(1991a).
10. Companhia de Desenvolvimento Tecnológico (CODETEC), "Sucroquímica e Alcoolquímica no Brasil", Brasil, (1991b).
11. Clarke, M.A., "Panel Discussion on Dextran", Technical Session of the Cane Sugar Refining Research, USA,(1980).
12. Chag, J. and T. Wong., "Synthesis of Soluble Dextran-Hemoglobin Complexes of Different Molecular Sizes", The Biochemical Journal, Vol. 55, page 398-403, No 4, USA,(1977).
13. Fonoll, A.M., "Determinación de los Pesos Moleculares Medios de las Macromoléculas en Disolución: Osmometría y Viscosimetría", National Science Foundation, III Curso Centroamericano de Química, Costa Rica,(1967).

14. FUSADES. "Informe Trimestral de Coyuntura No 2/90",
Sección: Sector Agropecuario, pag. 64, El Sal
vador, (1991).
15. Forticini, D. and C.K. Hall. "Interfacial Tension
of Polyethyleneglycol-Dextran-Water Systems:
Influence of Temperature and Polymer Molecular
Weight", Journal of Biotechnology, Vol. 16,
page 279-296, USA, (1990).
16. Glicksman, M. "Gum Technology in the Food Industry"
Academic Press, USA, (1969).
17. Honing, P. Principios de Tecnología Azucarera .
Compañía Editorial, S.A. Cuarta Impresión, To
mo III. Cuba, (sin fecha de publicación).
18. Instituto Cubano de Investigaciones de los Deriva
dos de la Caña de Azúcar (ICIDCA). "Manual de
Derivados de la Caña de Azúcar", Serie: Diver
sificación, Geplacea/PNUD, Cuba, (1988).
19. International Sugar Journal. "Sugar Consumption in
Latin America", Vol. 92, page 180-182, Septem
ber, USA, (1990).
20. Jacobs, M.B. "The Chemical Analysis of Food and
Food Products", Robert E. Kreyer Publishing,
Third Edition, USA, (1958).
21. Jawetz, Ernest. "Manual de Microbiología Médica"
Editorial Moderna. 9a. Edición México (1981)

22. Kaboli, H. and P. Reilly, "Immobilization and Properties of Leuconostoc mesenteroides Dextranase", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 22, page 1055-1069, No 5, May, USA, (1980).
23. Landon, R.S. and G. Webb, "Separating Enzyme (Dextranase), Production and Product (Dextran) Synthesis within a Traditional Fermentation Process", *Process Biochemistry*, Vol. 25, page 19-23, No. 1, February, USA, (1990).
24. Lazic, M.L. and J. Veljkovic, "pH Control and the Production of Extracellular Dextranase by Leuconostoc mesenteroides", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 7, page 25-28, USA, (1989).
25. Mc Donald, L.D. and H.M. Hassan, "Acid Tolerance of Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus Plantarum", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, page 2120-2124, July, USA, (1990).
26. Murphy P.T. and R.L. Whistler, "Industrial Gums, Polysaccharides and their Derivatives", Academic Press, Second Edition, Chapter 23, USA, (1973).
27. Nester. R. and P. Mc Charthy, "Microbiology: Molecules, Microbes and Man", Holt, Rinehart and Winston Inc., Second Edition, USA, (1978).
28. Ogston, A.G., "The Thermodynamics of Interaction Between Sephadex and Penetrating Solutes", *The Biochemi-*

- cal Journal, Vol. 116, No. 2, USA, (1970).
29. Paul, F., "Production and Purification of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, NRRL B-512 "F", Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 454, page 267-270, USA, (1984).
 30. Prescott, S.C., "Microbiología Industrial". Editorial Aguilar, Tercera Edición, España, (1954).
 31. Quintero, R., "Perspectivas de la Biotecnología en México", Fundación Javier Barrios Sierra A.C., pág. 68, México, (1985).
 32. Rose, A.H., "Industrial Microbiology", Lectures in Bacteriological Biochemistry in the University of Durham, USA, (1961).
 33. Serrano, J.E., "Alternativas de Procesamiento en el Desarrollo de Agro-Industrias en El Salvador", Trabajo de Graduación para optar al título de Ingeniero Químico, Universidad de El Salvador, El Salvador, (1983).
 34. SIGMA, "Biochemical Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents", Sigma Chemical Co., USA, (1991).
 35. Spencer, G.L. and G. McCabe, "Cane Sugar Handbook", John Wiley and Sons, Eight Edition, USA, (1967).
 36. Tam, S. and T. Wong, "Blood Replacement in Dog by Dextran-Hemoglobin", Canadian Journal of Biochemistry, Vol. 56, page 981-984, No. 10, October, Canada, (1978).

- da, (1978).
37. Tan, S. and T. Wong; "Modification of Hemoglobin Upon Covalent Coupling to Dextran: Enhanced Stability Against Acid Denaturation and Reduced Affinity for Haptoglobin", Canadian Journal of Biochemistry, Vol. 58, page 732-736, No. 9, September, Canada, (1980).
 38. Underkofler, L.A., "Industrial Fermentations", Chemical Publishing Co., Chapter 10, Vol. II, USA, (1954).
 39. Walter, W.G. y R.L. Mac Bee. "Microbiología General". Compañía Editorial Continental S.A., Traducción de la Segunda Edición en Inglés, México, (1972).

A P E N D I C E S

APENDICE A
DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES Y SACAROSA REMANENTE
POR EL METODO DE LANE Y EYNON

El método es una modificación del método de Lane y Eynon, que consiste en reducir la modificación de Soxhlet de la solución de Fehling titulándola, en punto de ebullición, con una solución de los azúcares reductores, utilizando azul de metileno como indicador.

REACTIVOS

Modificación de Soxhlet de la Solución de Fehling

SOLUCION A

Disolver 34.64 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada hasta obtener un litro de solución. Conservar durante un día antes de proceder a la titulación.

SOLUCION B

Disolver 173 gramos de tartrato sódico-potásico y 50 gramos de NaOH en agua destilada hasta obtener un litro. Filtrar con un filtro preparado de asbesto.

Solución de Azul de Metileno

Disolver 2 gramos en agua destilada y diluir hasta obtener un litro.

Solución patrón de azúcar invertido

Pesar exactamente 4.75 gramos de sacarosa pura, añadir 5 ml de ácido clorhídrico (HCl puro al 36.5% p/p) y disolver en agua hasta obtener unos 100 ml; la solución acidificada se coloca en un baño de agua a 70°C, se agita por 3 minutos, luego se mantiene en reposo durante 4 minutos procurando que su temperatura no descienda de los 70°C.

Enfriar la solución acidificada con agua helada hasta la temperatura ambiente.

Añadir unas 3 gotas de solución al 1% de Fenolftaleína y neutralizar con hidróxido de sodio; enfriar la solución y diluir hasta 1 litro.

La solución de azúcar invertido así preparada, tendrá una concentración tal que 10 ml de la misma contendrán 0.05 gramos de azúcar invertido.

Valoración de la solución de Fehling "A"

Transferir a un erlenmeyer de 250 ml, 5 ml de solución Fehling "A" y 5 ml de solución Fehling "B".

Añadir 30 ml de agua destilada.

Llenar la bureta con la solución de azúcar invertido, y descargar de una sola vez 6 ml en el erlenmeyer que contiene la solución Fehling.

Poner el erlenmeyer de tal forma que comience a hervir a los 4 minutos aproximadamente. Tan pronto comience a hervir, mantener la ebullición durante 2 minutos, procurando que la ebullición sea suave. Agregar 3 gotas de azul de metileno.

Comenzar a titular con la solución de azúcar invertido contenida en la bureta, gota a gota dentro del erlenmeyer, manteniendo siempre la solución en el erlenmeyer hirviendo suavemente, hasta que el color azul cambie a rojo ladrillo, lo cual marca el fin de la titulación.

Nota: Nunca agite el erlenmeyer cuando esté realizando la titulación.

Anotar los mililitros consumidos de la solución de azúcar invertido, incluyendo los que se añadieron al recipiente de una sola vez.

Valor de la solución Fehling A:

Valor = ml solución de azúcar invertido X 0.005.

Este valor debe fijarse en la etiqueta del frasco de solución Fehling "A" y será el que se utilizará para los cálculos del % de azúcares reductores y % de azúcar remanente.

ANALISIS DE AZUCARES EN LA SOLUCION FERMENTADA

A) Determinación del % de azúcares reductores

Tomar 30 ml de muestra del fermentador, precipitar la dextrana con 45 ml de etanol absoluto, transferir esta solución a una bureta y seguir el procedimiento utilizado en la valoración de la solución Fehling "A". Anotar los mililitros consumidos de la muestra.

$$\% \text{ Azúcares Reductores (R1)} = \frac{\text{Valor de Fehling X 100}}{\text{ml consumidos de la muestra.}}$$

B) Determinación de sacarosa remanente

La muestra tomada anteriormente se lleva a un pH de 3 con HCl concentrado calentándose por 1 hora a 50°C, para asegurar una inversión completa de la sacarosa contenida en la muestra, transferir esta solución a una bureta y anotar los mililitros consumidos por el método de Lane y Eynon; este valor será el % total de azúcar invertido.

$$\% \text{ de azúcar total invertido (R2)} = \frac{\text{Valor de Fehling X 100}}{\text{ml consumidos de la muestra}}$$

El % de sacarosa remanente se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Sacarosa remanente} = (R2 - R1) \times 0.95$$

APENDICE B
DETERMINACION DE HUMEDAD POR EL METODO DE
ARRASTRE CON TOLUENO

Cuando las muestras se secan hasta peso constante, no se tiene seguridad de que toda el agua haya sido removida, sino solamente de que la muestra ha llegado a un equilibrio con la humedad del ambiente donde ha sido secada.

Para determinar la humedad final de las muestras de dextrana se utilizó un método de destilación con solvente inmiscible. Se trata de una marcha de laboratorio rápida y útil para determinar cantidades pequeñas de humedad. Este método es de especial importancia cuando se desea distinguir entre agua y materia volátil, como por ejemplo, en especias, las cuales contienen aceites volátiles.

PROCEDIMIENTO

Pesar la muestra y colocarla en un frasco erlenmeyer boca esmerilada de 250 ml, agregar suficiente muestra como para producir de 2 a 5 ml de agua. Cubrir el material con aproximadamente 75 ml de tolueno.

Armar un aparato como el representado en la figura B-1, llenar el tubo recolector con tolueno. Destilar suavemente hasta una velocidad aproximadamente de 2 gotas por segundo y luego más rápidamente cuando practicamente se ha recolectado toda

el agua. Agregar dentro de las paredes del condensador tolueno para arrastrar gotas de agua que hallan quedado adheridas a él. Continuar destilando y si no se ha recolectado más agua, la determinación finaliza.

Leer el volumen del agua en el tubo de destilación y calcular el % de humedad, asumiendo que el volumen de agua es equivalente a su peso en gramos, luego dividir entre el peso de la muestra original y multiplicar por cien.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W \text{ agua}}{W \text{ muestra}} \times 100$$

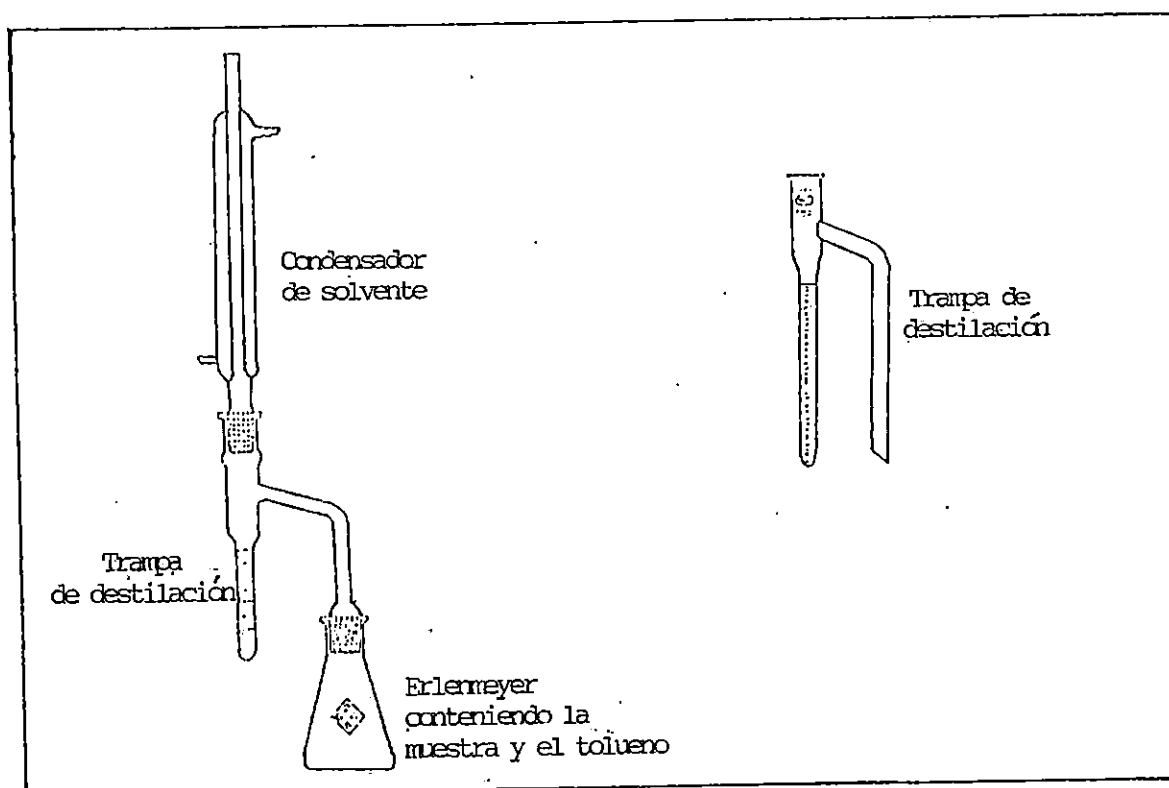


Figura B.1: Aparato utilizado para determinar la humedad de la muestra por el método de arrastre con tolueno.

APENDICE C
DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES DE POLIMEROS
Y SU RELACION CON LA VISCOSIDAD

La información presentada en este apéndice ha sido tomada en su totalidad de la referencia Fonoll (1969), en la cual se definen diferentes tipos de viscosidad y la metodología para determinar peso molecular de polímeros solubles.

Viscosidad es la resistencia presentada por el fluido a fluir. La viscosidad varía grandemente dependiendo de la naturaleza de la sustancia, siendo alta para materiales tales como los aceites pesados de lubricación y ciertos polímeros, y baja para otros tales como el benceno.

La unidad común de la viscosidad absoluta es el poise, llamado así en honor de Poiseville, quien estudió la viscosidad y propuso la ecuación C.1 conocida con su nombre.

$$n = \frac{(-\Delta P) \cdot \eta \cdot r^4 \cdot t}{8VL} \quad (C.1)$$

Donde:

- n : Viscosidad absoluta
(-ΔP) : Caída de presión total entre dos puntos de referencia en el viscosímetro.
η : Constante con valor de 3.14159

- r : Radio del conducto
 L : Longitud del conducto.
 V : Volumen del líquido que pasa por el conducto.
 t : Tiempo que tarda el volumen V en fluir.

En un viscosímetro como el de Ostwald (figura C.1), la presión hidrostática que causa el flujo a través del capilar depende de la diferencia en alturas h , de los dos niveles del líquido en el viscosímetro y del peso específico μ del líquido; además, si se define como $C = \pi r^4 / 8VL$, la ecuación (C.1) puede reescribirse, ecuación C.2.

$$\begin{aligned}
 n &= C h \mu t \quad \text{donde } \mu = \rho g \\
 n &= C h g \rho t \quad \text{(C.2)}
 \end{aligned}$$

La medida de la viscosidad absoluta por este método, es decir, usando las ecuaciones (C.1) y/o (C.2), es bastante problemática. Usualmente, se hacen medidas indirectas en las cuales, la viscosidad de un líquido es determinada con relación a otro líquido cuya viscosidad es conocida. A esta relación se le conoce como viscosidad relativa n_r .

Entonces, si de un líquido de viscosidad conocida (sustancia de referencia) se toma un mismo volumen y se analiza en el mismo viscosímetro, la viscosidad relativa viene dada por las relaciones de la ecuación C.3.

$$n_r = n/n_e = C\mu t / C\mu_o t_o = \mu t / \mu_o t_o \cong t/t_o \quad \text{(C.3)}$$

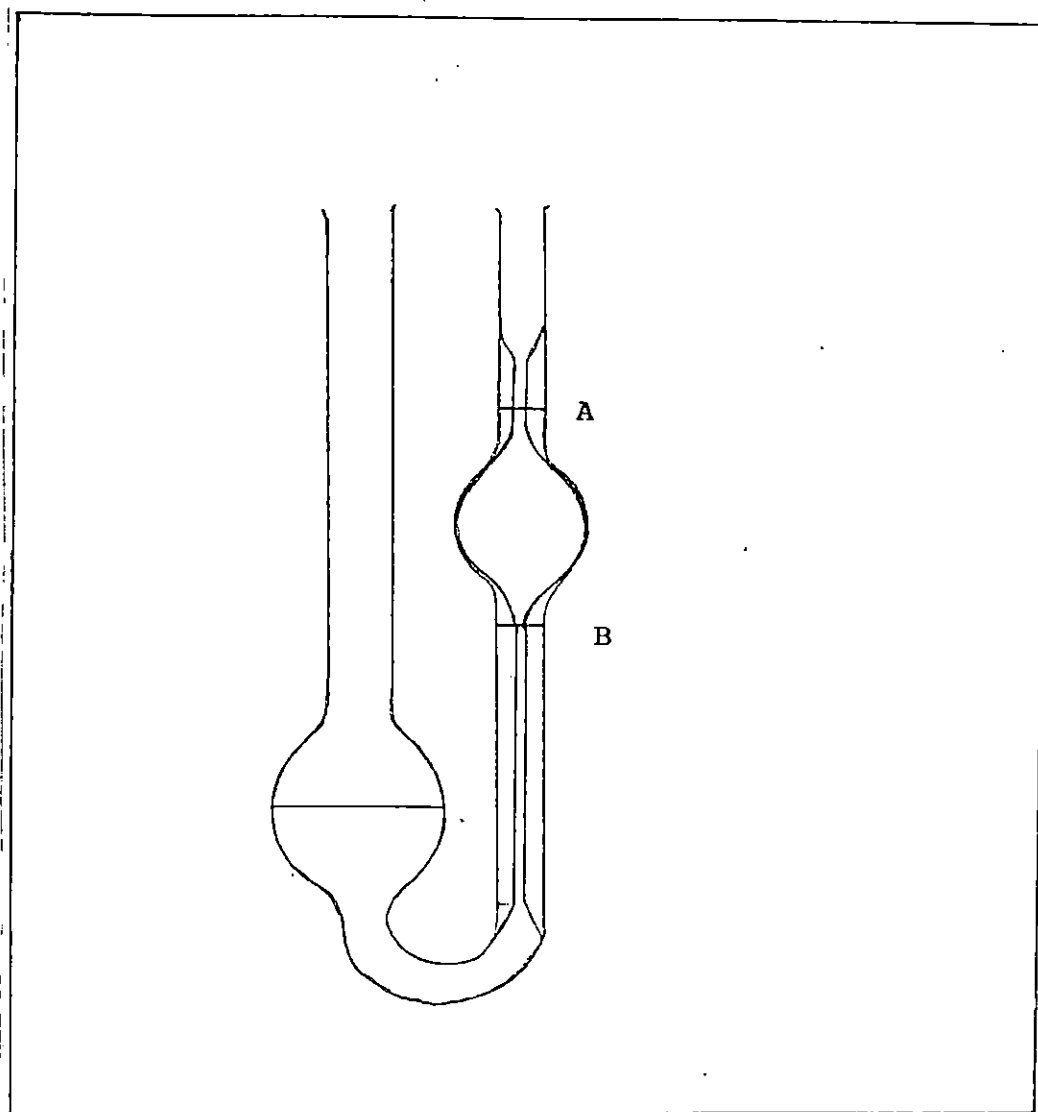


FIGURA C.1: Viscosímetro tipo Ostwald

El subcero se refiere al disolvente puro. A bajas concentraciones las densidades ρ y ρ_0 son aproximadamente iguales; por ésto la viscosidad relativa de una disolución de un polímero viene dada sencillamente por el número abstracto que resulta de dividir los tiempos de flujo correspondientes a la disolución, y al disolvente.

Por viscosidad específica n_e se entiende la diferencia entre la viscosidad relativa y la unidad. Es también un número adimensional.

Siendo:

$$n_e = n_r - 1 = \frac{n \text{ disolución}}{n \text{ disolvente}} - 1 = \frac{n}{n_0} - 1 = \frac{n - n_0}{n_0} \quad (\text{C.4})$$

La viscosidad específica mide el aumento relativo que experimenta la viscosidad de cierto disolvente, al añadirle un polímero soluble en éste.

Finalmente, la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de una disolución de un polímero, se define como el límite de la razón entre la viscosidad específica y la concentración, cuando ésta última tiende a cero.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{n_e}{c} \quad (\text{C.5})$$



En las medidas de viscosidad, es normal expresar la concentración c en gramos de polímero contenidos en 100 ml de disolución.

En consecuencia, la viscosidad intrínseca se medirá en decilitros/gramo, ya que no es adimensional.

Para $n_r < 2$, la representación gráfica de la función empírica.

$$\frac{\eta_e}{c} = f(c) \quad (C.6)$$

obtenida experimentalmente, es casi una línea recta para muchas disoluciones de polímeros.

Extrapolando a concentración cero (dilución infinita), se determina la ordenada en el origen de dicha recta, es decir, la viscosidad intrínseca.

Huggins observó que las pendientes de estas rectas, eran con frecuencia directamente proporcionales al cuadrado de la propia viscosidad intrínseca y el factor de proporcionalidad oscilaba entre + 0.35 y + 0.40. Por ello, propuso para la ecuación (C.6) una ecuación lineal (C.7) respecto a la concentración:

$$f(c) = \frac{\eta_e}{c} = [n] + k' [n]^2 c^1 \quad (C.7)$$

Si se toma en cuenta que a medida que aumenta la dilución la viscosidad relativa tiende a uno, la diferencia $(n_r - 1)$, será un infinitésimo equivalente a $\ln(n_r)$ por lo que la viscosidad intrínseca también podrá venir dada por la expresión

$$[n] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{n_e}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{n_r - 1}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln n_r}{c} \quad (\text{C.8})$$

La ecuación de Huggins (C.7) al tener en cuenta la ecuación (C.8) puede tomar la forma de la ecuación C.9.

$$\frac{\ln n_r}{c} = [n] + k''[n]^2 c^1 \quad (\text{C.9})$$

Donde tanto k' , k'' como c^1 son constantes propias de las ecuaciones empíricas. La pendiente es distinta, pues $\ln(n_r)$, y n_e sólo son iguales en el límite, cuando $c = 0$. Huggins encontró, que la nueva pendiente era también directamente proporcional al cuadrado de la viscosidad intrínseca, en mucho de los sistemas investigados, estableciendo que entre los dos factores de proporcionalidad existía la relación:

$$k' - k'' = + \frac{1}{2} \quad (\text{C.10})$$

En la práctica, se miden las viscosidades relativas a dos o más concentraciones de la disolución del polímero, eligiendo aquellas de manera que:

$$1.1 < n_r < 1.5$$

y luego se colocan los puntos experimentales en los diagramas en los que en abscisas se colocan las concentraciones, y en ordenadas los valores de los cocientes n_e/c y $(\ln n_r)/c$ obteniéndose aproximadamente unos puntos alineados de acuerdo con las ecuaciones (C.7) y (C.9). Si bien en general, la primera recta tiene pendiente positiva y la segunda negativa, al extrapolar a concentración cero, debe obtenerse el mismo valor para la viscosidad intrínseca. En caso contrario, si la discrepancia es pequeña, se toma el valor medio. Como se muestra en la figura (C.2)

La predicción que hizo Staudinger en el año de 1930 sobre la proporcionalidad entre pesos moleculares y viscosidades intrínsecas de las disoluciones de polímeros, ha experimentado hasta la fecha sólo pequeñas modificaciones.

Si un polímero se fracciona, puede determinarse el peso molecular medio numérico y la viscosidad intrínseca de las disoluciones de cada fracción, los logaritmos neperianos de ambas magnitudes, están en una relación de proporcionalidad directa y en un diagrama dan lugar a puntos aproximadamente alineados.

Determinando gráficamente la pendiente y la ordenada en el origen de estas rectas, se puede escribir:

$$\ln[n] = a \ln M + b \quad (C.11)$$

$$\text{y de aquí } [n] = k M^a \quad (C.12)$$

en donde "a" es la pendiente; "b" es la ordenada en el origen y M es el peso molecular medio numérico de la fracción cuya viscosidad intrínseca es $[\eta]$.

Cuando los valores de "k" y "a" han sido establecidos para una serie dada de polímeros en un disolvente dado y a una temperatura especificada, basta una determinación de la viscosidad intrínseca, para encontrar inmediatamente el peso molecular medio numérico sin necesidad de usar el osmómetro, se lee sencillamente en la gráfica correspondiente a la relación de la ecuación (C.11). Para polímeros heterogéneos en cuanto a pesos y longitudes, es decir, sin fraccionar, se usa la ecuación C.13.

$$[\eta] = k \bar{M}_v^a \quad (\text{C.13})$$

en la que:

$$\bar{M}_v = \left(\sum w_x \bar{M}_x^a \right)^{1/a} \quad (\text{C.14})$$

A este resultado se llega considerando disoluciones lo suficientemente diluidas como para que se pueda aceptar la hipótesis de que cada molécula contribuye independientemente de las demás, a la viscosidad de la disolución.

Evidentemente, el peso molecular medio viscosimétrico \bar{M}_v , depende de "a", y de la fracción ponderal w_x , es decir de la distribución del peso molecular. Generalmente han encontra-

do para "a", valores experimentales comprendidos entre 0.5 y 0.8, siendo el más frecuente 0.7

Por otro lado κ varía entre 0.5 y 5×10^{-4} , y en cuanto a \bar{M}_v , oscila entre 80% y 90% de \bar{M}_w

Evidentemente, para "a" igual a 1.0, ambos pesos moleculares medios coinciden.

Si se suponen polímeros lineales cuya distribución del peso molecular sea la prevista en la teoría de Flory, la llamada distribución más probable, las relaciones que existen entre los diferentes pesos moleculares medios, fueron encontradas matemáticamente por Shaefgen y Flory, y se resumen en la expresión, dada por la ecuación C.15.

$$\bar{M}_n : \bar{M}_v : \bar{M}_w = 1 : [(1+a) \Gamma(1+a)]^{1/a} : 2 \quad (\text{C.15})$$

siendo Γ la función gamma de Euler.

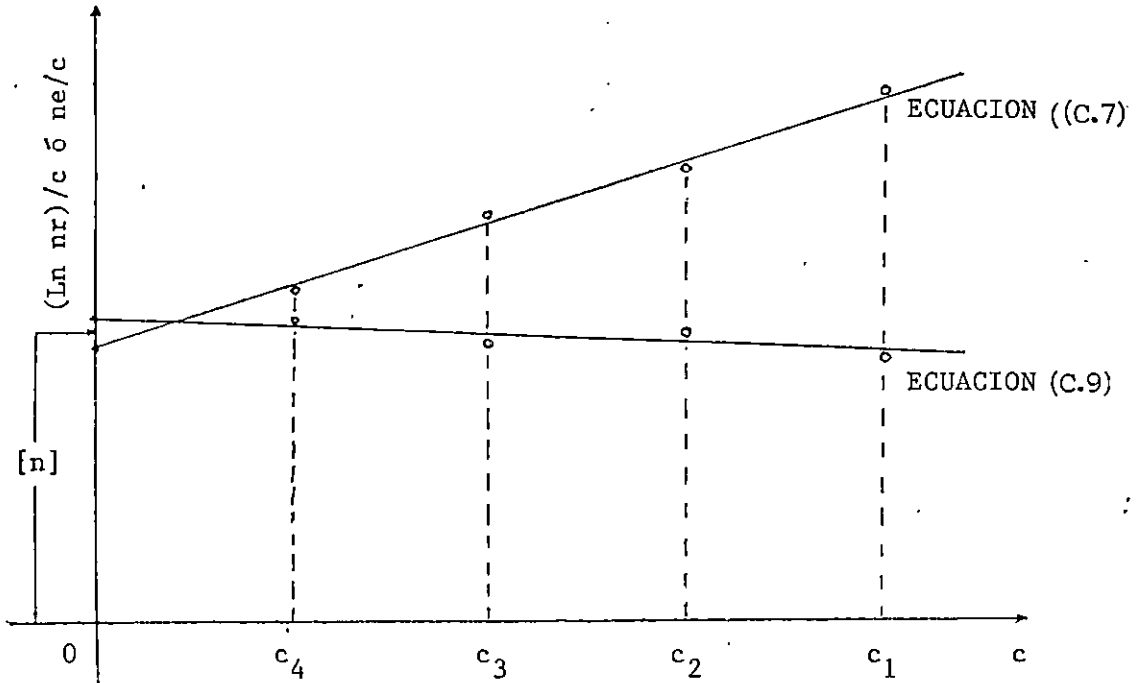


Figura C.2: Datos experimentales para la determinación de la viscosidad intrínseca de las disoluciones de polímeros.

FUENTE: FONOLL, 1967

"o": Valores Experimentales para los cuales se cumple

$$1.1 < n_r < 1.5$$

c : Concentración

$[n]$: Viscosidad intrínseca

n_e : Viscosidad específica

n_r : Viscosidad relativa

$$c_1 > c_2 > c_3 > c_4 \longrightarrow 0$$

APENDICE D
PRUEBAS TOXICOLÓGICAS PARA SOLUCIONES DE DEXTRANA
INYECTABLE: DEXTRAN 40.

La información presentada ha sido tomada de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1986.

DEXTRAN 40, SOLUCION INYECTABLE

Solución estéril de dextrán (40,000) y dextrosa en agua inyectable. Contiene no menos del 90.0 por ciento y no más del 110.0 por ciento de la cantidad de dextranas indicada en el marbete. Contiene no menos del 90.0 por ciento y no más del 110.0 por ciento de $C_6H_{12}O_6$ anhidra indicada en el marbete.

CLARIDAD DE LA SOLUCION. El contenido debe ser transparente.

HERMETICIDAD

Procedimiento. Sumergir completamente 10 muestras en sus envases originales en solución al 0.1 por ciento p/v de azul de metileno en tween 60 al 0.1 por ciento p/v, contenida en un recipiente al que se le pueda aplicar vacío hasta un diferencial mínimo de 50 mm de Hg, durante 1 hora. Lavar los envases con agua corriente, escurrir y observar. El contenido de los envases no debe presentar ningún cambio de color, ni

debe haber indicios de entrada de la solución colorida en ningún sitio de los envases.

PARTICULAS VISIBLES. La solución debe estar libre de partículas visibles.

VARIACION DE VOLUMEN. MGA 0981*. Cumple los requisitos.

IDENTIDAD

A. Dextran y dextrosa . Mezclar 1 ml de la muestra con 50 ml de agua, a 5 ml de esta solución, agregar 0.1 ml de ácido clorhídrico, hervir durante 30 segundos, enfriar rápidamente, agregar 2 ml de hidróxido de amonio y 5 ml de agua saturada con ácido sulfhídrico, preparada el día de su uso, hervir hasta remover el ácido sulfhídrico, enfriar y filtrar.

a) Hervir 5 ml de filtrado con 5ml de reactivo de Fehling. La solución debe adquirir color verde lo que indica presencia de dextran y debe aparecer un precipitado rojizo, lo que indica presencia de dextrosa.

b) Hervir 5 ml del filtrado con 0.5 ml de ácido clorhídrico durante 5 minutos y enfriar, agregar 2.5 ml de solución 0.5 M de hidróxido de sodio y 5 ml de reactivo de Fehling, hervir nuevamente. La solución no debe adquirir color verde y el precipitado rojizo debe ser más copioso, lo que indica la degradación del dextran a dextrosa.

* MGA y el número que le acompaña es la especificación de la técnica analítica según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1986.

ACIDEZ. A 25 ml de la muestra, agregar unas gotas de SI* de rojo de fenol y neutralizar con solución 0.01 M de hidróxido de sodio. La muestra no debe requerir más de 2.0 ml de solución 0.01 M de hidróxido de sodio para neutralizarse.

METALES PESADOS. MGA 0561

Solución de sulfuro. Pasar 12 g de sulfuro de sodio a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver por calentamiento en una mezcla de 10 ml de agua y 25 ml de glicerol, enfriar y aforar con la misma mezcla.

Procedimiento. A un tubo de Nessler de 50 ml, pasar 2 ml de la muestra y 5 ml de solución de referencia de plomo 0.010 mg/ml; a otro tubo de Nessler de 50 ml, pasar 12 ml de la muestra, agregar a cada tubo 5 ml de solución 6 M de ácido acético y solución al 37.5 por ciento v/v de hidróxido de amonio hasta alcalinizar cada solución y diluir cada tubo a 50 ml con agua, agregar a cada uno 0.1 ml de la solución de sulfuro y mezclar.

Cualquier color desarrollado en el tubo conteniendo los 12 ml de la muestra, no debe ser más intenso que el color desarrollado en el tubo conteniendo la solución de referencia de plomo y de la muestra, lo que equivale a no más de 5 ppm de metales pesados.

SI*: Solución indicadora

ETANOL

Procedimiento. Destilar 100 ml de la muestra, coleccionar los primeros 45 ml del destilado y diluir a 50 ml con agua; mezclar por separado 10 ml de solución 0.0617 M de dicromato de potasio con 10 ml de ácido sulfúrico en un recipiente para ebullición, provisto de tapón, inmediatamente agregar 5 ml del destilado, mezclar, tapar y dejar reposar durante 5 minutos. Pasar a un matraz volumétrico de 500 ml y diluir a 300 ml con agua libre de bióxido de carbono, agregar 2 g de yoduro de potasio y 1 ml de solución de 10 por ciento p/v de tiocianato de potasio, reposar durante 5 minutos y titular el yodo liberado con solución 0.1 M de tiosulfato de sodio hasta coloración roja, agregar unos mililitros de SI de almidón y continuar la titulación hasta desaparición del color azul. Correr un blanco de reactivos en las mismas condiciones, sustituyendo los 5 ml del destilado por 5 ml de agua.

La diferencia entre el volumen consumido en la titulación de la muestra y el volumen consumido en la titulación del blanco, no debe ser mayor de 4.2 ml de solución 0.1 M de tiosulfato de sodio.

NITROGENO. MGA 0611

Procedimiento. A un matraz Kjeldahl de 200 ml, pasar 50 ml

de la muestra y 30 ml de ácido sulfúrico libre de nitrógeno, calentar durante 15 minutos, agregar 3 g de la mezcla de mercurio sulfato para Kjeldahl y calentar con flama suave hasta que la mezcla sea incolora, mantener la mezcla a ebullición lenta durante 2 horas, enfriar y agregar agua hasta un volumen aproximado de 80 ml, mezclar y dejar enfriar en baño de hielo, agregar cuidadosamente 112 ml de solución 2:5 de hidróxido de sodio fría, resbalándola lentamente sobre las paredes del matraz a modo de formar un estrato por debajo de la solución ácida, agregar algunas granallas de zinc y 2 g de tiosulfato de sodio en 25 ml de agua y conectar inmediatamente el matraz por medio de una trampa a un refrigerante, cuyo tubo de salida tenga adaptada una alargadera recta que deberá estar sumergida en 50 ml de solución valorada 0.05 M de ácido sulfúrico. Mezclar el contenido del matraz Kjeldahl con movimientos circulares y destilar de 150 a 200 ml, agregar al destilado unas gotas de SI de rojo de metilo azul de metileno y titular el exceso de ácido con solución 0.1 M de hidróxido de sodio, correr un blanco de reactivos en las mismas condiciones. La diferencia entre las 2 titulaciones representa el nitrógeno liberado por la muestra y no debe consumir más de 0.35 ml de solución 0.05 M de ácido sulfúrico, lo que equivale a no más del 0.001 por ciento de nitrógeno.

RESIDUO DE LA IGNICION. MGA 0751. Emplear 25 ml de la mues

tra. El peso del residuo no debe ser mayor del 0.05 por ciento.

PROTEINAS EXTRAÑAS

Procedimiento. Inyectar a cada uno de 6 cobayos, 0.5 ml de la muestra, en la cavidad peritoneal, cada 2 días durante 3 ocasiones; 14 días, después de la primera aplicación peritoneal, inyectar a 3 de los animales, 0.2 ml de la muestra, por vía intravenosa y a los 21 días de la primera aplicación intraperitoneal, inyectar a los 3 animales restantes, 0.2 ml de la muestra, por vía intravenosa. Observar a cada animal, 30 minutos después de cada aplicación y 24 horas más tarde en cada ocasión.

Ningún animal debe presentar síntomas de anafilaxis, lo que indica ausencia de proteínas extrañas.

PARTICULAS MICROSCOPICAS. MGA 0651. Cumple los requisitos.

ESTERILIDAD. MGA 0381. Cumple los requisitos.

PIROGENOS. MGA 0711. Cumple los requisitos. Inyectar 10 ml/kg de peso de la muestra, como dosis de prueba.

TAMAÑO MOLECULAR

Preparación de la muestra. A un volumen de la muestra, agregar 4 volúmenes de etanol al 96 por ciento, mezclar y centri

fugar, desechar el líquido sobrenadante y disolver el residuo en un volumen de solución al 0.9 por ciento p/v de cloruro de sodio, equivalente al volumen original de la muestra. Emplear esta solución en las determinaciones siguientes:

Determinación A. MGA 0951

A partir de la solución de la muestra preparada como se indica en el párrafo anterior, hacer diluciones en solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento p/v, que contenga 3.5, 2.5, 1.5 y 0.75 g de dextranas en cada 100 ml, respectivamente.

Procedimiento. Determinar la viscosidad de cada solución de la muestra y de la solución al 0.9 por ciento p/v de cloruro de sodio a 37°C.

Calcular el cociente de viscosidad para cada dilución, por medio de la fórmula siguiente: T_m/T_s ; en donde T_m es el tiempo promedio de fluído de la muestra en segundos y T_s es el tiempo promedio de fluído de la solución al 0.9 por ciento p/v de cloruro de sodio en segundos.

Calcular las viscosidades intrínsecas de la muestra construyendo una gráfica con los datos siguientes: (cociente de viscosidad de cada dilución 1.00) / gramos de dextrán en 100 ml de cada dilución, contra gramos de dextrán en 100 ml de cada di

lución; unir los puntos con una línea recta y extrapolarla hasta interceptar con eje de concentración. La distancia en tre este punto y la intersección de los ejes, representa la viscosidad intrínseca, la cual no debe ser menor de 0.15 ni mayor de 0.20.

Determinación B. MGA 0951

Diluir la preparación de la muestra como se indica en tamaño molecular, con solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento para obtener una concentración de 6 por ciento p/v de dex tranas.

Procedimiento. A 5 matraces Erlenmeyer provistos de tapón, pasar por separado, 200 ml de la preparación de la muestra y ajustar la temperatura a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1$. Con precaución, para mantener esta temperatura, agregar lentamente y con agitación continua, etanol absoluto hasta producir turbiedad (se requiere n aproximadamente 90 ml), agregar a cada matraz por separado 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ml respectivamente de etanol absoluto, taparlos y sumergirlos en BA* a 35°C agitando ocasionalmente, hasta obtener soluciones claras, pasar los matraces a otro baño de agua manteniendo a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ y dejar reposar hasta la formación de 2 fases claras, desechar los líquidos sobrenadantes y disolver, por separado, los residuos viscosos, en suficiente solución al 0.9 por ciento p/v de cloruro

BA*: Baño de agua

de sodio para obtener 50 ml, remover el etanol por evaporación, bajo presión reducida, diluir a 50 ml con agua y determinar la rotación óptica de cada dilución como se indica en MGA 0771. Calcular el contenido de dextranas de cada dilución en gramos por 100 ml como se indica en la determinación A. Una vez obtenido este dato, escoger la dilución que contenga la concentración más cercana pero que no exceda al 10 por ciento p/v de dextranas y proceder como se indica en la determinación A, pasando por separado a matraces correspondientes de 50 ml, partes alicuotas que contengan 1.75, 1.25, 0.75 y 0.375 g de dextranas, aforar con la solución 0.9 por ciento p/v de cloruro de sodio y mezclar.

Estas diluciones contienen 3.5, 2.5, 1.5 y 0.75 g de dextran en cada 100 ml. Calcular la viscosidad intrínseca de cada solución como se indica en la determinación A, la cual no debe ser mayor de 0.27.

Determinación C. MGA 0951.

Preparación de la Muestra. Como se indica en la determinación B.

Procedimiento. A matraces Erlenmeyer provistos de tapón pasar, por separado, 100 ml de la preparación de la muestra, agregar a cada uno lentamente y con agitación continua 80, 90, 100, y 110 ml respectivamente de etanol absoluto, tapar-

los y sumergirlos en BA a $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1$, dejándolos ahí hasta la formación de 2 fases claras. Separar los líquidos sobrenadantes en los residuos viscosos y remover el etanol de cada solución por separado, por evaporación bajo presión reducida, remover el cloruro de sodio de cada solución, pasándolas por separado, a través de un tubo de celofán para diálisis contra agua; ajustar el volumen de cada solución a 25 ml con agua y agregar a cada una 225 mg de cloruro de sodio para reponer la concentración de 0.9 por ciento p/v removida en la diálisis; determinar la rotación óptica correspondiente de cada solución como se indica en el MGA 0771 y calcular la concentración respectiva de dextranas, en gramos por 100 ml como se indica en la Determinación A. Una vez obtenido este dato, escoger la dilución que contenga la concentración más cercana pero que no exceda al 10 por ciento p/v de dextranas y proceder como se indica en la determinación A, pasando, por separado, a matraces correspondientes de 50 ml, partes alícuotas que contengan 1.75, 1.25, 0.75 y 0.375 mg de dextranas, aforar con la solución al 0.9 por ciento p/v de cloruro de sodio y mezclar. Estas diluciones contienen 3.5, 2.5, 1.5 y 0.75 g de dextran en cada 100 ml. Calcular la viscosidad intrínseca de cada solución como se indica en Determinación A, la cual no debe exceder de 0.08, lo que equivale a no más del 30 por ciento de dextranas.

VALORACION DE DEXTROSA

Solución reguladora. Pasar 14.3 g de carbonato de sodio y 4 g de yoduro de potasio a un matraz volumétrico de 100 ml, di solver y aforar con agua, mezclar.

Solución de la muestra. Preparar una dilución de la muestra que contenga 15 mg/ml de dextrosa.

Procedimiento. A un matraz volumétrico, pasar 5 ml de la so lución de la muestra, agregar 25 ml de la solución regulado- ra y una parte alícuota de 25 ml de solución 0.05 M de yodo, tapar el matraz y dejar reposar exactamente 30 minutos a 20 °C agregar 30 ml de solución 2 M de ácido clorhídrico y titu lar inmediatamente con solución 0.1 M de tiosulfato de so- dio. Correr un blanco de reactivos empleando 5 ml de agua en lugar de 5 ml de la solución de la muestra. El punto fi- nal de la titulación también se puede determinar potenciomé- tricamente (MGA 0991), empleando electrodos de platino / ca- lomel o platino / plata cloruro de plata.

La diferencia entre las dos titulaciones representa el volu- men requerido de yodo para oxidar la dextrosa. Calcular la cantidad de dextrosa anhidra contenida en la muestra, consi- derando que cada mililitro de solución 0.05 M de yodo, es equivalente a 9.01 mg de dextrosa anhidra.

VALORACION DE DEXTRANAS. MGA 0771.

Procedimiento. Determinar la rotación óptica, agregando 0.05 ml de solución al 37.5 por ciento v/v de hidróxido de amonio a 100 ml de la muestra. Calcular el contenido de dextranas en la muestra por medio de la fórmula: $0.5076 (\alpha - 0.528 D)$; en donde α es la rotación angular observada y D los gramos de dextrosa por 100 ml obtenidos en la Valoración de dextrosa.

APENDICE E
REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCION DE DEXTRANA NATIVA

SUSTANCIA	FORMULA QUIMICA	MARCA COMERCIAL
Acetato de etilo	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	Merck
Acetona	CH_3COCH_3	Merck
Acido acético	CH_3COOH	Merck
Acido sulfúrico	H_2SO_4	Mallinckrodt
Agar	-	Difco
Azul de metileno	-	Mallinckrodt
Benceno	C_6H_6	Mallinckrodt
Cloruro de sodio	NaCl	Mallinckrodt
Cristal violeta	-	Merck
Dicromato de potasio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Merck
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Merck
Fosfato dipotásico	K_2HPO_4	Merck
Fosfato dipotásico USP *	K_2HPO_4	
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	J.T.Baker chemical
Fructosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Merck
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Mallinckrodt
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck
Nitrato de plata	AgNO_3	Merck
Oxalato de amonio	$(\text{NH}_3)_2\text{C}_2\text{O}_4$	Merck
Peptona	-	Difco
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Mallinckrodt
Sulfato de magnesio	MgSO_4	Mallinckrodt
Sulfato de manganeso	MnSO_4	Mallinckrodt
Sulfato ferroso	FeSO_4	Mallinckrodt
Tartrato de sodio y potasio	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_5 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	J.T.Baker Chemical
Tolueno	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$	Mallinckrodt

* Todas las sustancias son de calidad analítica a excepción del fosfato dipotásico USP que es de calidad industrial con una pureza entre 60% y 85%.