



63
28/2/85

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES DE INGRESO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA
PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE DEXTRANAS**

TESIS

JORGE PEDRO MARTINEZ ESPINOLA

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Introducción	6
Objetivos	12
Generalidades	14
Materiales y Métodos	42
Resultados	57
Conclusiones	98
Apéndice	101
Bibliografía	103

CAPITULO I

INTRODUCCION

El término dextrana se da a una gran clase de homopolisacáridos extracelulares compuestos exclusivamente de unidades α -D-glucopiranososa ligadas con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en su mayor proporción. La enzima responsable de su síntesis es la dextran sacarasa (E.C.2.4.1.5.).

Fuentes de obtención

Se han obtenido una gran cantidad de dextranas sintetizadas por bacterias de los géneros Streptococcus, Streptobacterium Acetobacter, Betabacterium y en especial Leuconostoc, especies mesenteroides y dextranicum, tribu Streptococceae, familia Lactobacillaceae. Las dextranas pueden distinguirse por las proporciones de los diferentes tipos de enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$, así como por rotación específica viscosidad intrínseca, solubilidad en agua y naturaleza del producto sólido. En la tabla I-1 se muestra la composición de las dextranas de los diversos microorganismos capaces de sintetizarlas.

Industrialmente se ha trabajado con varias cepas de Leuconostoc mesenteroides y en particular con la NRRL-B512F porque es capaz de producir dextrana conteniendo 95% de enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ y solo 5% de enlaces de ramificación $\alpha(1\rightarrow3)$.

Aplicación comercial

Debido al gran número de aplicaciones que se han encontrado y modificaciones que se les han hecho, las dextranas se convierten en el polisacárido microbiano más estudiado hasta la fecha.

Atendiendo al peso molecular, las dextranas se dividen en:

- a) Nativas o naturales
- b) Fraccionadas

Las primeras son producidas normalmente por fermentación o síntesis enzimática y no han sufrido alteración por hidrólisis.

Tabla I-1.- Composición de las dextranas producidas por diferentes microorganismos (López, 1979)

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

sis o fraccionamiento. El peso molecular promedio de la dextrana nativa de la cepa NRRL-B512F es de 30 a 50 millones, determinado por métodos de dispersión de luz.

Las fraccionadas resultan de la hidrólisis o fraccionamiento de la dextrana nativa. También se pueden obtener dextranas de bajo peso molecular a través de la síntesis directa con aceptores (27, 39).

A continuación se enlistan algunos de sus usos:

* De la dextrana NATIVA

- Recuperación secundaria del petróleo
- Capas protectoras para semillas
- Floculantes en productos de papel
- Procesos de chapado de metales
- Suturas quirúrgicas
- En alimentos:
 - . Estabilizador y viscosante en jarabes
 - . Concentrados de jugos cítricos
 - . Procesamiento de frutas
 - . Conservación de camarones
 - . Preservación de alimentos (película protectora)
 - . Como conservador (en combinación con antibióticos)
 - . Composición de helados
- Producción de fibras
- Vector de medicamentos
- Agentes de sedimentación
- Preparación de lociones
- Purificación de sosa
- Preparación de dentríficos
- Fabricación de compuestos para recubrimiento
- Preparación de filamentos especiales
- Fabricación de lápices de labios

* De las dextranas FRACCIONADAS

- Sustituto o expansor del volumen del plasma sanguíneo
- Mejorador del flujo sanguíneo
- Complejo hierro-dextrana
- Dextran-hemoglobina
- Dextran-sulfato con anticoagulante

* Otros

- Dextranas activadas:
 - . Oxidación a polialdehído-dextrana por periodatos
 - . Preparación de azida-dextrana
 - . Activación por cianatos orgánicos a imido carbonato de dextrana
 - . Preparación de bromo-hidroxi-dextrana vía bromo propil epóxido

El peso molecular 70,000 fué introducido hace 35 años como sustituto de plasma sanguíneo porque en solución salina isotónica al 6% p/v provee viscosidad, propiedades coloidales y osmóticas equivalentes a las características de las proteínas del plasma. Esta dextrana se excreta rápidamente vía urinaria sin provocar reacciones colaterales. Así mismo sucede con el de 40,000 que se utiliza como mejorador del flujo sanguíneo.

En 1954, utilizando dextrana, se produjo la primera solución estable de hierro (Fe) que podía ser administrada vía intramuscular en caso de anemia. El complejo Fe-dextrana conteniendo 20% p/v de hierro se ha difundido comercialmente tanto en el ramo clínico humano como en la medicina veterinaria. Se ha estudiado la posibilidad de aplicar soluciones de hemoglobina con dextrana para abarcar el doble papel de expansión plasmática y transporte de oxígeno.

Por otro lado, las dextranas activadas pueden ser acopladas con proteínas y enzimas. Recientemente muchos trabajos se han destinado a la inmovilización de enzimas a soportes de polisacáridos insolubles y a la preservación de enzimas por conjugación con dextranas.

Dentro de la industria fotográfica se ha experimentado en las películas de rayos X así como en otras emulsiones fotográficas el uso de dextranas y se ha observado que economiza Ag^+ sin pérdida en la finura del grano.

OBJETIVOS

- 1.- Optimizar las condiciones de fermentación y producción enzimática de las dextranas.
- 2.- Estudiar las condiciones de síntesis de dextranas, con el objeto de obtener un modelo para el diseño del sistema de reacción.
- 3.- Optimizar la producción de dextrana de orden clínico a nivel laboratorio por medio de hidrólisis ácida.
- 4.- Establecer una técnica analítica para el análisis y cuantificación de dicha dextrana.
- 5.- Diseñar el proceso en forma global con base en los datos obtenidos.

CAPITULO II

GENERALIDADES

Fermentaciones y características del medio de cultivo para la óptima producción enzimática

Tsuchiya (1952) descubrió los efectos de ciertos factores en el medio de cultivo sobre la producción de dextransacarasa de Leuconostoc mesenteroides. En primera instancia confirmó que la sacarosa es esencial para la producción enzimática. El organismo puede crecer en glucosa, fructosa o maltosa contenidos en el medio, pero sin inducción de la dextransacarasa. Encontró también que al incrementar los niveles de sacarosa progresivamente de 0.5% a 5% incrementaba el rendimiento de la enzima pero que a concentraciones mayores al 2% en sacarosa las soluciones se tornaban muy viscosas dificultando la separación de las células, debido a que la enzima una vez en el medio y en presencia de sacarosa, iniciaba la producción de dextrana.

El medio de cultivo usado le permitió obtener rendimientos normales de dextrana con 0.25% de sólidos de remojo del maíz como nutrimentos, sin embargo, al aumentar este porcentaje al 2%, obtuvo progresivamente niveles más elevados de enzima, solo si la concentración de fosfato aumentaba paralelamente. En el estudio del efecto del pH sobre la producción enzimática encontró que el máximo rendimiento se logra a pH 6.7 (Fig. II-1) a pesar de que a este pH la enzima es inactivada rápidamente a 25°C. Los iones NH_4^+ reducen el porcentaje de dextransacarasa, prefiriéndose el NaOH para controlar el pH. Dentro del intervalo de temperatura 20-29°C, el máximo rendimiento enzimático se encontró a 23°C. Las concentraciones de enzima fueron 40 y 70 UDS/ml (UDS = unidades dextransacarasa). Hasta hace poco estas condiciones se consideraban como las óptimas para la producción de la dextransacarasa, sin embargo, los trabajos realizados por Schneider (1980) y por López y Monsan (1980) resultaron en niveles mucho más elevados

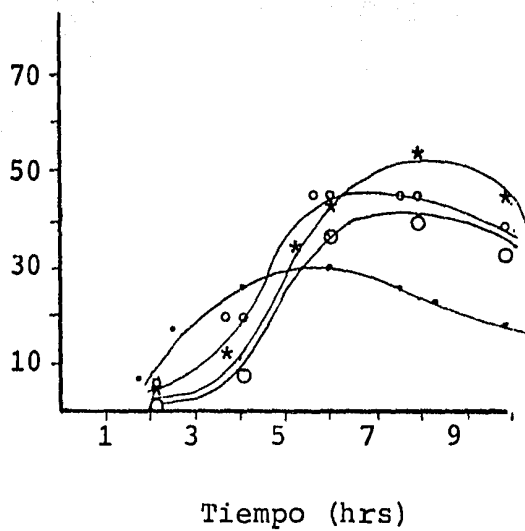


Fig. II-1.- Efecto del pH sobre los rendimientos de dextransacarasa.

• ____ • pH 6.1, ° ____ ° pH 6.4, * ____ *
 pH 6.7, ○ ____ ○ pH 6.9.

(Tsuchiya, 1952)

de dextransacarasa. En fermentaciones a gran escala basadas en el método que lleva su nombre, Scheneider (1980) alcanzó, a nivel laboratorio, un rendimiento de 300 UDS/ml. López y Monsan (1980) reportaron 180 UDS/ml.

Las elevadas concentraciones de dextransacarasa se obtuvieron gracias a la cuidadosa optimización de las condiciones del proceso y en particular el control de los niveles de sacarosa durante la fermentación. Dichas concentraciones se mantuvieron alrededor de 0.5%-1.0% por adición continua de sacarosa particularmente durante la fase del crecimiento activo donde sucede la inducción y consecuente producción enzimática.

A continuación se describen los factores que resultan relevantes para dicha optimización del proceso:

* El organismo

Leuconostoc mesenteroides (NRRL-B512F) es un miembro de la familia Streptococcaceae, género Leuconostoc, son bacterias de forma esférica o lenticular de 0.5-0.7 por 0.7-1.2 μm . Es Gram positivo, anaerobio facultativo, no es móvil ni forma esporas. No es patogénico, es quimoorganótrofo que requiere de un medio rico. Necesita de factores de crecimiento como lo son el ácido nicotínico, la tiamina, el ácido pantoténico y la biotina, junto con los aminoácidos valina y ácido glutámico.

El crecimiento depende de un carbohidrato apropiado que es fermentado por la vía hexosa monofosfato dando ácido láctico CO_2 y etanol. También tiene lugar un metabolismo aerobio oxidativo produciendo CO_2 , ácidos láctico y acético. El crecimiento y la consecuente producción de biomasa puede ser medida por densidad óptica a 600 nm. La máxima cantidad de biomasa es relativamente baja (9 g/l) (Alsop, 1983).

* pH del medio de fermentación

Para establecer las condiciones óptimas de pH en la producción de la enzima es necesario conocer la influencia del pH en la producción, actividad y estabilidad enzimática. Koepsell (1952) encontró que el pH óptimo para la producción enzimática es de 6.5-7.0, para la actividad y estabilidad, 5.0-5.2, además es relativamente inestable a 6.7.

La enzima cruda o purificada adicionada de dextranas es mucho más estable que la enzima purificada. Esta enzima cruda puede ser almacenada por varios meses en un refrigerador sin pérdida significativa de actividad a pH 5, pero la enzima pura perderá el 80% de su actividad en unos días bajo las mismas condiciones.

La influencia del pH sobre la actividad enzimática determinada por Alsop (1983) se compara con los resultados obtenidos por Kaboli (1980) (Fig. II-2).

* Temperatura

La regulación de la temperatura durante la fermentación es también un parámetro crítico e independiente del pH. Koepsell (1952) mencionó un pH óptimo igual a 6.7 para la producción enzimática, sin embargo, solo puede ser aplicado a una temperatura de 23°C. Bergey (1974) reporta que la formación de dextrana a partir de sacarosa es favorecida a una temperatura de 20-25°C. El valor óptimo para el crecimiento es de 30°C (21), sin embargo, resulta demasiado alto para una máxima producción enzimática. En la Fig. II-3 se representan las diferentes actividades enzimáticas obtenidas por Alsop (1983) a 19, 23 y 27°C.

* Aireación

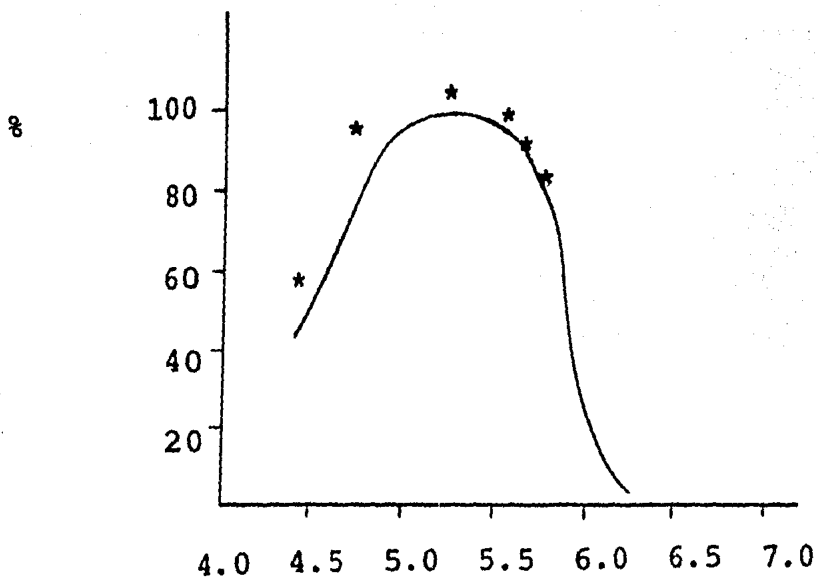


Fig. II-2.- Dependencia de la actividad enzimática con el pH. % de actividad vs. pH en solución de sacarosa 5% p/p y 25°C.
_____ Alsop (1983), * Kaboli (1980).

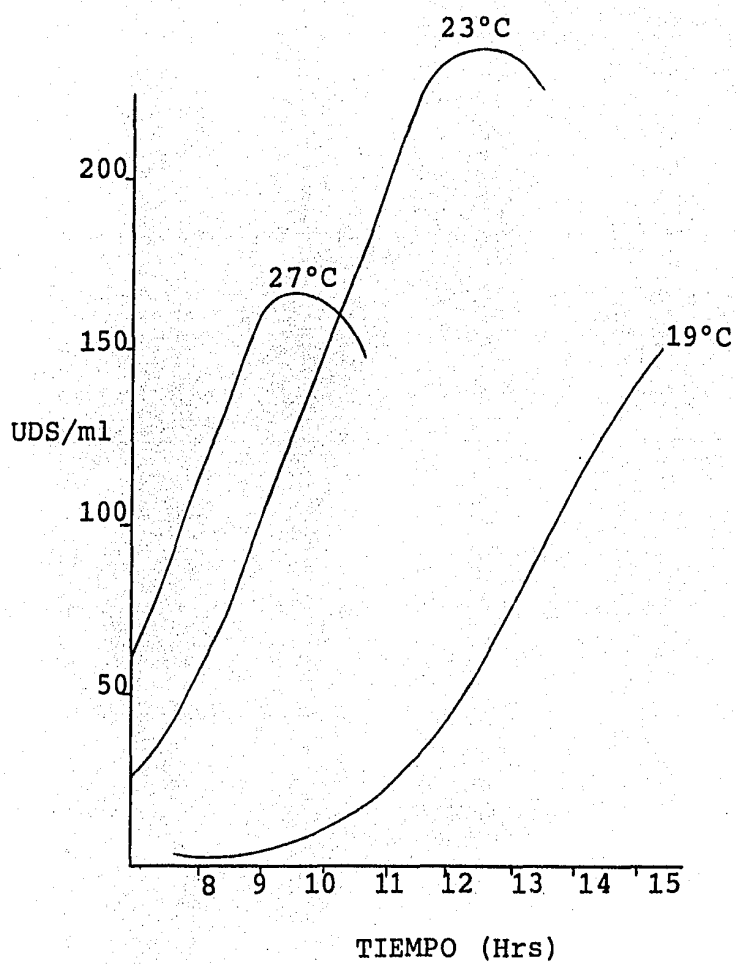


Fig. II-3.- Producción de enzima vs Tiempo a diversas temperaturas. pH 6.7 (Alsop, 1983).

Según Alsop (1983), en el medio de cultivo del proceso de fermentación convencional no se requiere aireación. Foster (1968) estableció que la aireación da un menor rendimiento en dextrana, sin embargo Koepsell (1952) y Tsuchiya (1952) notificaron que los niveles enzimáticos fueron más elevados en frascos agitados que en estáticos y Johnson (1957) cuantificó los valores de crecimiento de diferentes cepas de Leuconostoc mesenteroides obteniendo resultados similares bajo las mismas condiciones.

Alsop (1983) realizó el estudio del grado de aireación sobre las fermentaciones de producción enzimática.

De la Fig. II-4, Alsop concluyó que:

- 1.- Con oxígeno puro y bioxido de carbono saturado el crecimiento termina rápidamente.
- 2.- Con 0% y algo de aireación (50%) se incrementa el crecimiento.

* Fuentes de carbono

Las cepas de Leuconostoc mesenteroides utilizan un gran número de carbohidratos (11), sin embargo, la sacarosa es el único sustrato que induce la producción de la enzima y también es el único necesario para la síntesis de dextranas.

Como es sabido, en el caso de las enzimas inducibles, el sustrato análogo puede ser mejor inductor que el sustrato natural. Un ejemplo clásico es la β -galactosidasa de E. Coli donde el isopropil- α -D-tiogalactósido induce mayores cantidades de enzima que la propia lactosa. Se ha demostrado que el palmitato de sacarosa es un buen inductor de invertasa (36). Alsop (1983) probó mezclas tales como glucosa/sacarosa, fructosa/sacarosa y glicerol/sacarosa para encontrar un proceso económico libre de células donde el crecimiento bacteriano ocurriera con una fuente de carbono barata y poste-

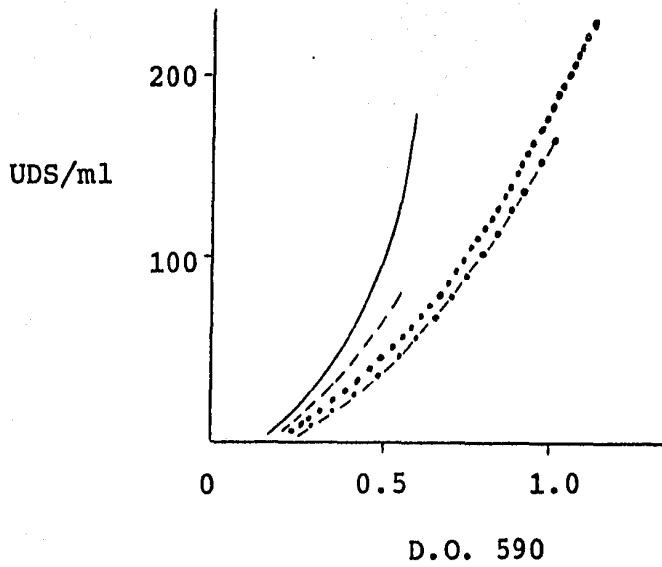


Fig. II-4.- Aireación en la fermentación
 Rendimiento de enzima vs. crecimiento
 bacteriano. Condiciones (_____ O₂,
 - - - CO₂, con aireación, -.-.-
 sin aireación).
 (Alsop, 1983).

riormente la sacarosa fuera añadida para inducir la producción enzimática. Ninguno de estos experimentos fueron exitosos. Para una producción económica de la enzima con altos rendimientos se encontró que es necesario mantener un nivel bajo en sacarosa (5-10 g/l) a lo largo de la fermentación (42). Esto fué verificado al muestrear el medio de cultivo para analizar la sacarosa por HPLC con una columna adecuada para carbohidratos.

Debido a que las bacterias son productoras de ácidos y a la necesidad de mantener los niveles de sacarosa, puede llevarse a cabo paralelamente el control de pH con la alimentación de álcali y sacarosa.

A. López (1980) añadió 20 g/lh de sacarosa en la fase de crecimiento para maximizar el rendimiento enzimático. Los resultados de este experimento aparecen en la Fig. II-5.

Si los niveles de sacarosa alcanzan el valor cero en cualquier instante durante la fermentación, la producción enzimática es seria e irreversiblemente afectada. Lawford (1979) reportó una discontinuidad similar en un lote de actividad enzimática dentro de un sistema intermitente y aunque observó un rápido recobro en la actividad de la dextransacarasa, sus rendimientos fueron bajos (6-7 UDS/ml).

Se muestra en la Fig. II-6 la variación de la actividad enzimática en función de la productividad celular (D.O. 590 nm) según Alsop (1983). El comparó un nivel inicial de 20 g/l con otro de 5 g/l seguido de una adición de 15 g/l durante la fermentación.

Dicho autor ha confirmado recientemente que el porcentaje de la enzima es proporcional a la concentración de sacarosa presente.

* Fuentes de nitrógeno y factores de crecimiento

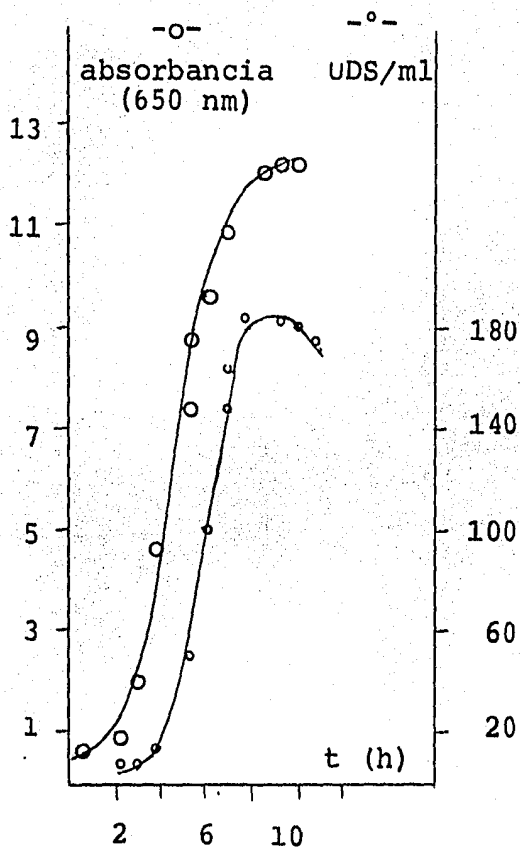


Fig. II-5.- Producción de dextransacarasa por cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B-512.

Fuente de carbono: Sacarosa 20 g l^{-1} con adición continua de una solución de sacarosa de 1 Kg/l , a razón de 20 g/lh .

(A. López, 1979, 1980).

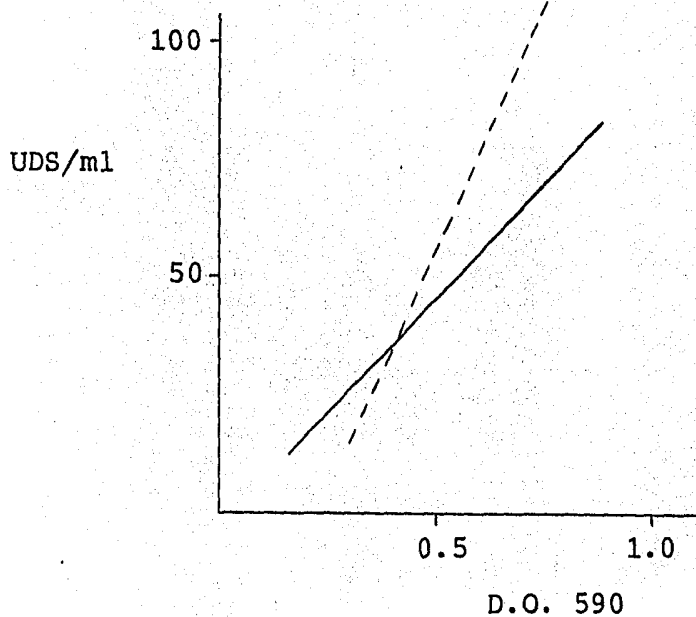


Fig. II-6.-- Productividad celular en dos valores de adición de sacarosa. Rendimiento de enzima vs. crecimiento bacteriano (_____ 20g/l de sacarosa al inicio de la fermentación, ----- 5 g/l de sacarosa al inicio y 15 g/l durante la fermentación). (Alsop, 1983).

Normalmente las fuentes de nitrógeno fundamental que se han utilizado para el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides han sido el "líquido de remojo del maíz" y el "extracto de levadura". Estos materiales complejos proveen los factores de crecimiento requeridos. La bacteria no es proteolítica y no reduce los nitratos (11).

El nitrógeno en forma de iones NH_4^+ parece tener un efecto adverso en la producción de la enzima (48).

Alsop (1983) reportó la dificultad de obtener una biomasa mayor a 9 g/l y determinó las posibles causas como debido a:

- 1.- La falta de un nutriente esencial
- 2.- La presencia de un inhibidor producido durante la fermentación
- 3.- El incremento de la fuerza iónica del medio.
- 4.- El estado fisiológico del medio de cultivo

La adición de extracto de levadura, metales traza o sacarosa cerca del final de la fermentación así como la dilución por adición de medio fresco, no mejoró el crecimiento, concluyendo que la limitación de biomasa es causa de razones fisiológicas.

* Fosfato

Ha sido utilizado usualmente en forma de K_2HPO_4 como ingrediente tanto en la preparación del inóculo como en la producción de la enzima y de la dextrana, en cantidades que van de 0.1 a 20%. Proporciona capacidad amortiguadora al medio de cultivo. Rorem (1955) demostró que las células activas asociadas con polisacárido utilizan fosfato en mucha mayor cantidad que las células inactivas, por lo tanto, es necesario calcular la cantidad de fosfato a utilizar en las fermentaciones para la producción de dextranosa.

* Elementos traza

El uso de extracto de levadura o líquido de remojo del maíz supuestamente proporcionaría los elementos traza necesarios, sin embargo, en los medios de fermentación reportados en la literatura existe una suplementación de ciertos elementos. Se trata de una mezcla de Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y Mn^{2+} conocida como "sales R" y Koepsell fué el primero en utilizarla (25). En años recientes se ha hecho hincapié en la importancia del calcio en la preparación y acción de la dextransacarasa. Itaya (1975) demostró que la enzima purificada es estable en diálisis contra agua desionizada y que la adición de EDTA causó la inactivación de la enzima. Posteriormente fué reactivada con iones de metales alcalino-térreos y el calcio fué el mejor. Obtuvo resultados negativos con otros iones. Se concluyó que la dextransacarasa es una alcalino-térreo metalo-enzima. Robyt (1979) reportó que la producción de dextransacarasa es incrementada al doble en presencia de 0.05% de $CaCl_2$, pero esta sustancia no afecta el creciente valor en la producción de ácidos durante la fermentación. Sin embargo, alcanzó bajos niveles enzimáticos (28 UDS/ml) en presencia de calcio, comparados con los de Jeanes (1948) y Tsuchiya (1952) y considerablemente bajos respecto a los obtenidos por Schneider (1980) en sus recientes trabajos donde no adicionó calcio a sus fermentaciones. Kaboli (1980) reportó que la estabilidad de la dextransacarasa purificada puede ser significativamente mejorada por la adición de Ca^{2+} . A pH 4.5 y $T = 27.5^{\circ}C$ aproximadamente el 70% de la actividad se perdió en soluciones carentes de calcio en 5 h. La adición de Ca^{2+} en concentración 50 mM reduce esta pérdida a 25%. Monsan (1978) estableció que la presencia de 0.05% de $CaCl_2$ estabiliza las soluciones enzimáticas. A. López (1980) demostró que el medio de fermentación preparado con 0.005% de $CaCl_2$ no presenta ninguna modifica-

ción en actividad, ni aún aumentando a 0.05%, empero, la actividad de la enzima purificada es notablemente afectada. En consecuencia, una solución purificada incrementa su actividad desde 12.6 a 33.9 UDS/ml adicionando 0.05% de CaCl_2 . Lawford (1979) demostró que la enzima es irreversiblemente desnaturada por incubación prolongada en ausencia de Ca^{2+} . En todos estos estudios es necesario verificar la naturaleza del sistema amortiguador en que se encontraba la enzima, ya que en citratos, el calcio puede acomplejarse.

La enzima

La dextransacarasa (E.C.2.4.1.5.) (sacarosa: 1,6- α -D-glucan 6- α -glucosil transferasa) es una transglucosidasa que cataliza la síntesis de dextranas a partir de sacarosa. En la Fig. II-7 se representa la reacción global en la que interviene dicha enzima.

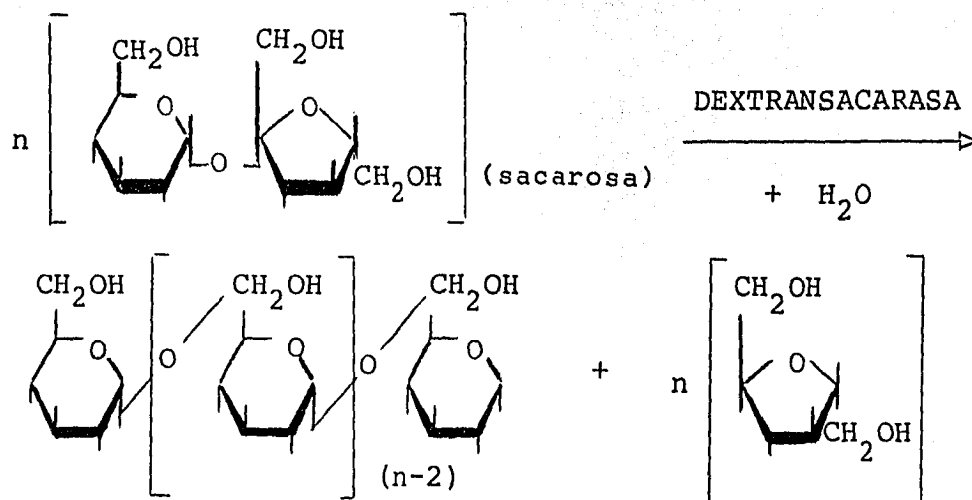


Fig. II-7.- Reacción global de síntesis de dextranas por acción de la dextransacarasa.

Se considera una glicoproteína en cuya fracción carbohidrato está constituida principalmente por D-manosa (40).

Su peso molecular es de 280,000 (15, 16). Parece razonable pensar que la enzima posee un cofactor cuyo peso molecular se encuentra entre 5,000 y 30,000 (28).

Los valores de Km reportados para la sacarosa están dentro del intervalo 0.02-0.03 M.

La energía de activación de la reacción en niveles de temperatura de 15 a 30°C es de 6.9 Kcal/mol (13).

* Mecanismo de acción catalítica

En contraste con los mecanismos comunes de biosíntesis de polisacáridos, la producción de dextranas por la dextranasa no requiere ningún intermediario nucleótido activado-azúcar. La energía requerida para la condensación de dos unidades glucosilo es proporcionada por la hidrólisis de sacarosa (32).

El equipo de Robyt en la Universidad del Edo. de Iowa (1974, 1976, 1978 y 1979) ha publicado una serie de trabajos que demuestran el mecanismo de acción catalítica de la dextranasa. Este mecanismo hace intervenir un complejo enzimático activo entre la enzima, la glucosa y la dextrana.

Un grupo nucleofílico del sitio activo de la enzima libre ataca a la sacarosa entre el carbono 1 de la glucosa y el oxígeno interglucosídico, hidrolizándola formando un complejo glucosil-enzima.

El oxígeno ligado al carbono 6 de esta glucosa repite el mecanismo atacando al carbono 1 de la dextrana.

Dicho mecanismo implica en la enzima la existencia de 2 grupos catalíticos equivalentes X_1 y X_2 . Inicialmente los dos grupos atacan a la sacarosa dando 2 complejos glucosídicos tal como se muestra a continuación (Fig. II-8) :

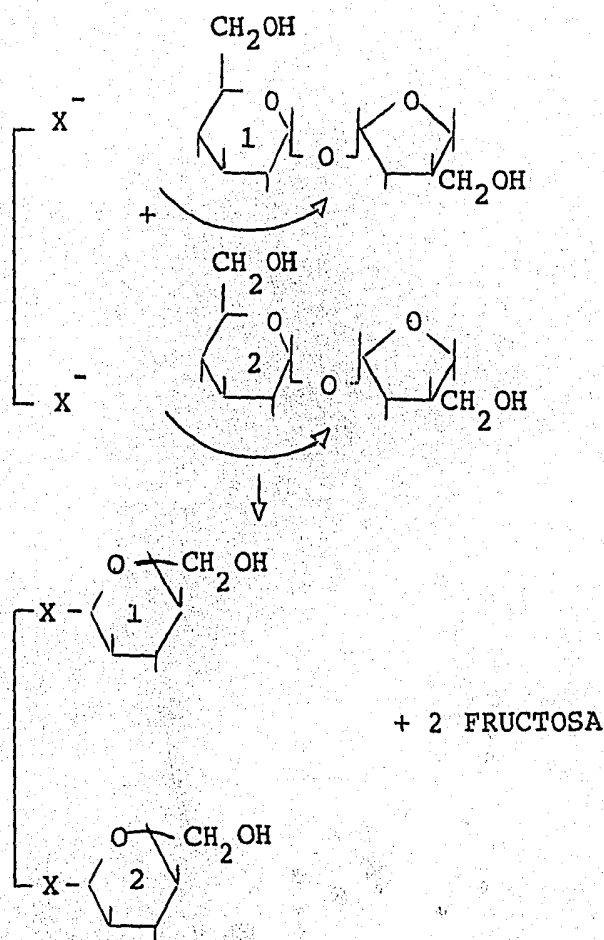


Fig. II-8.- Mecanismo de acción de la dextranasa

Enseguida, el oxígeno ligado al carbono 6 de uno de estos 2 grupos, efectúa un ataque nucleofílico sobre el carbono 1 del otro grupo formando el enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. Se propaga al mismo tiempo otro ataque nucleofílico a una nueva molécula

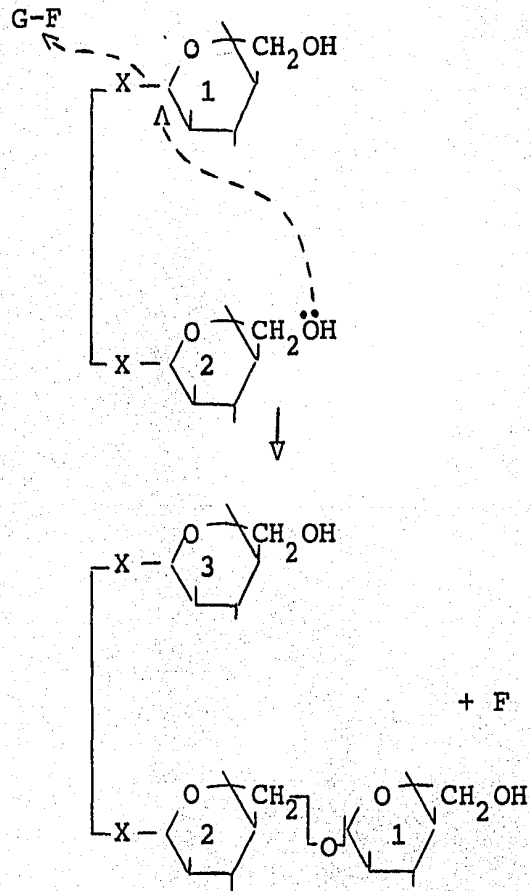


Fig. II-8

de sacarosa, de tal manera que la cadena en crecimiento va desplazándose de uno a otro de los grupos catalíticos al repetirse nuevamente el ataque del oxígeno del carbono 6, en esta ocasión, de la tercera unidad de glucosa sobre el carbono 1 de la segunda unidad.

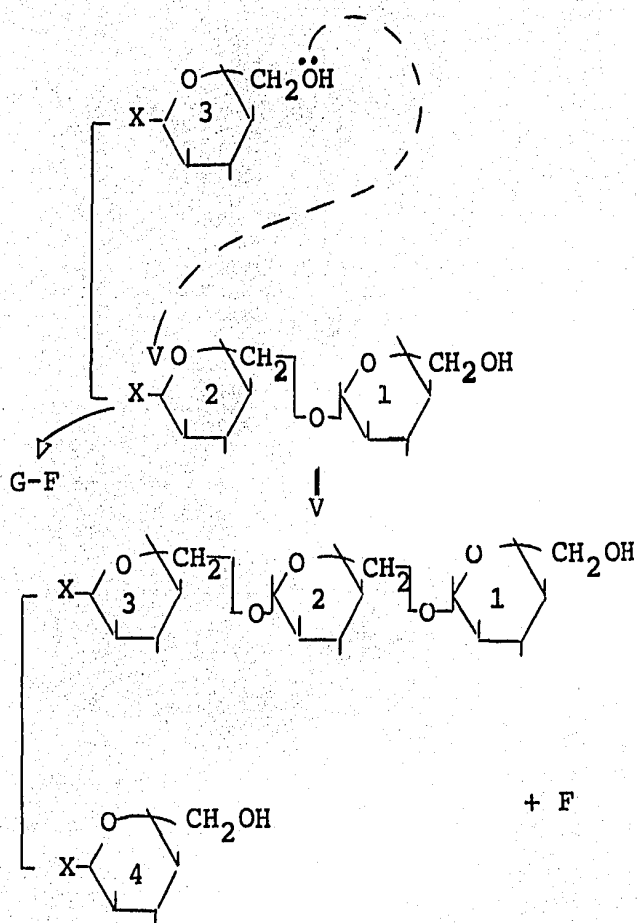


Fig. II-8

Terminación de la cadena

Roby y Taniguchi (1976) demostraron que la síntesis de enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ de la dextrana de Leuconostoc mesenteroides NRRL B512F ocurre cuando el $-\text{CH}_2\text{OH}$ de las moléculas de dextrana libre atacan nucleofílicamente al C_1 del grupo glucosil y/o al del grupo dextranosil desplazándolos del complejo.

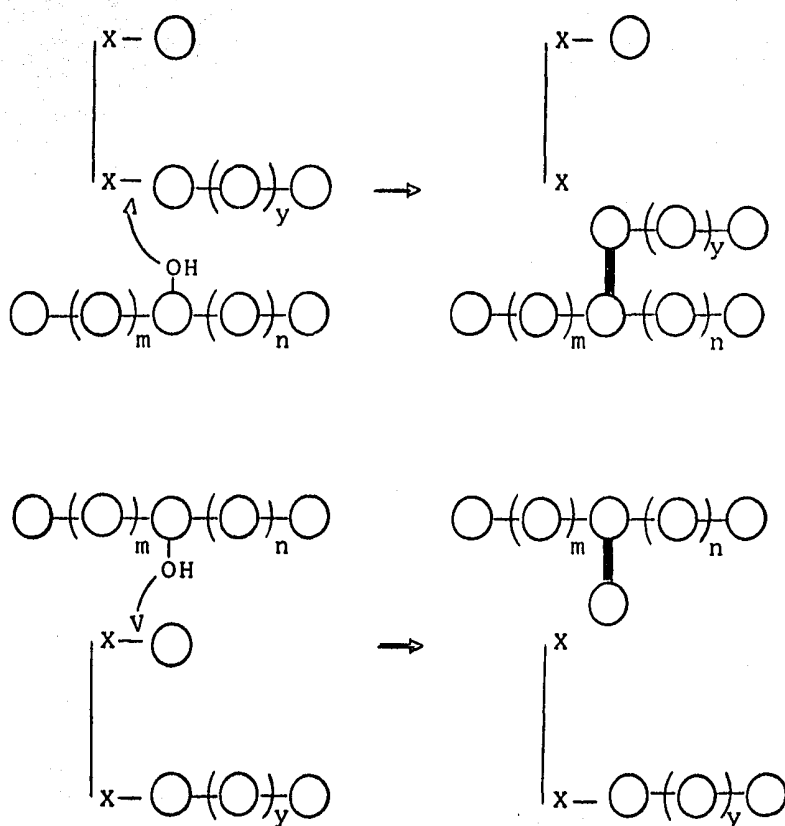


Fig. II-9.- Formación de enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ en la reacción de terminación de la cadena de dextrana.

* Unidades de actividad enzimática

Koepsell, Tsuchiya y colaboradores (1952) establecieron las condiciones de producción de la dextransacarasa, posteriormente Jeanes (1965) las replicó. Una unidad de actividad dextransacarasa (UDS) fué definida como la cantidad de enzima capaz de convertir 1 mg de sacarosa a dextrana en una hora liberando 0.52 mg de fructosa a 30°C y una concentración de sustrato (sacarosa) del 10% en amortiguador acetatos pH 5.2. La determinación de fructosa se realizó por el método Somogyi para azúcares reductores.

Se han sugerido unidades alternativas. Lawford (1979) expresa la actividad enzimática como μg de azúcar reductor producido/min/ml a pH 5.5 y 30°C. Relacionando ambas unidades, obtenemos; $10 \mu\text{g}$ de azúcar reductor/min/ml = 1.15 UDS/ml.

Robytt y Walseth (1979) definieron la actividad como 1 unidad (U) es la cantidad de enzima que incorpora un μmol de D-glucosa al polisacárido en un minuto a pH 5.0 y 25°C. Entonces $1 (U) = 20.27 \text{ UDS}$.

Kaboli y Rally (1980) definieron 1 unidad (u) como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcar reductor en un minuto a pH 5.2 y 30°C. Es lo mismo que describieron Robytt y Walseth excepto el pH y la temperatura.

La comparación de las unidades es difícil por la variación de las condiciones usadas. Para uso industrial, UDS es el más conveniente.

Obtención de los pesos moleculares de interés

Existen 2 métodos para producir dextrana nativa:

- 1.- Directo. La dextrana es producida en el mismo seno del crecimiento bacteriano y de la producción enzimática. En la Fig. II-10 se ejemplifica lo obtenido por Alsop (1983).
- 2.- Indirecto. Como la enzima es extracelular en varias especies de bacterias antes mencionadas, puede ser aislada para sintetizar el polímero en ausencia del microorganismo (Fig. II-11, según Alsop, 1983).

Existen algunas cepas de *Leuconostoc* (por ejemplo, NRRL-B-1299) que producen dextranas insolubles y cuya enzima se encuentra ligada a la pared celular durante la síntesis. Otro tipo de dextrana es la producida por la cepa NRRL-B1355 y ha sido demostrado recientemente que contiene enlaces alternados $\alpha(1\rightarrow6)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$.

Como puede observarse, el tipo de dextrana depende de la cepa utilizada.

Se ha propuesto con base en varias investigaciones sobre la producción satisfactoria de dextrana clínica que la cepa NRRL-B512F, desde los puntos de vista técnico y económico, es la más útil y relevante.

La secuencia para producir dextrana clínica es:

- 1.- Fermentación
 - a) Crecimiento celular
 - b) Producción enzimática
 - c) Producción de dextrana nativa (en presencia o ausencia de microorganismos)
- 2.- Hidrólisis
- 3.- Fraccionación
- 4.- Separación sólida (secado en spray)
- 5.- Formulación de las dosis farmacéuticas.

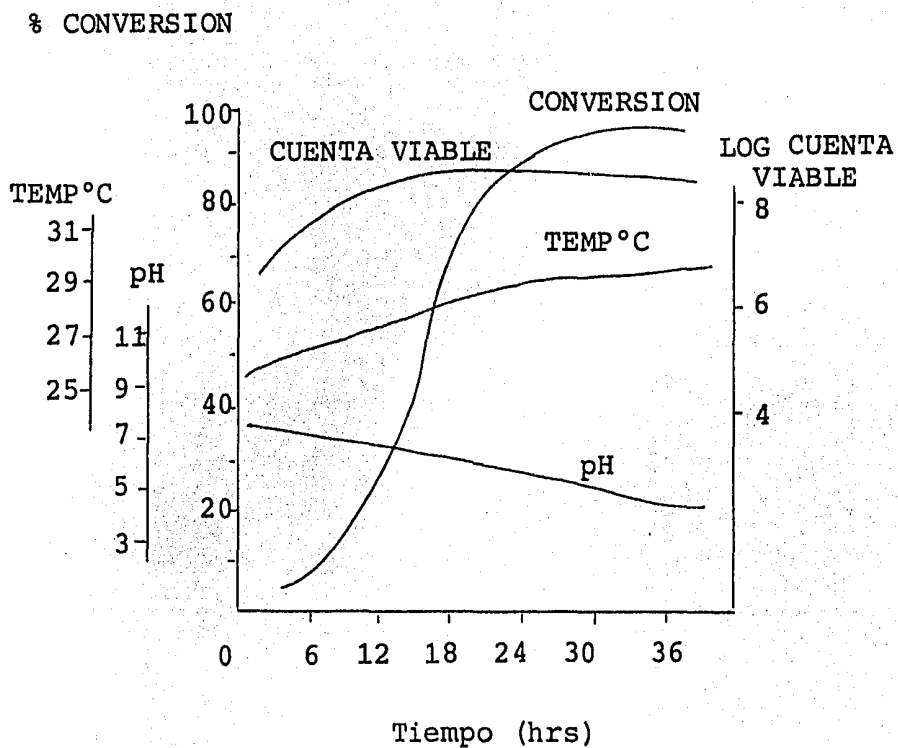


Fig. II-10.- Cambios en los parámetros de fermentación durante la producción convencional de dextranas.

(Alsop, 1983)

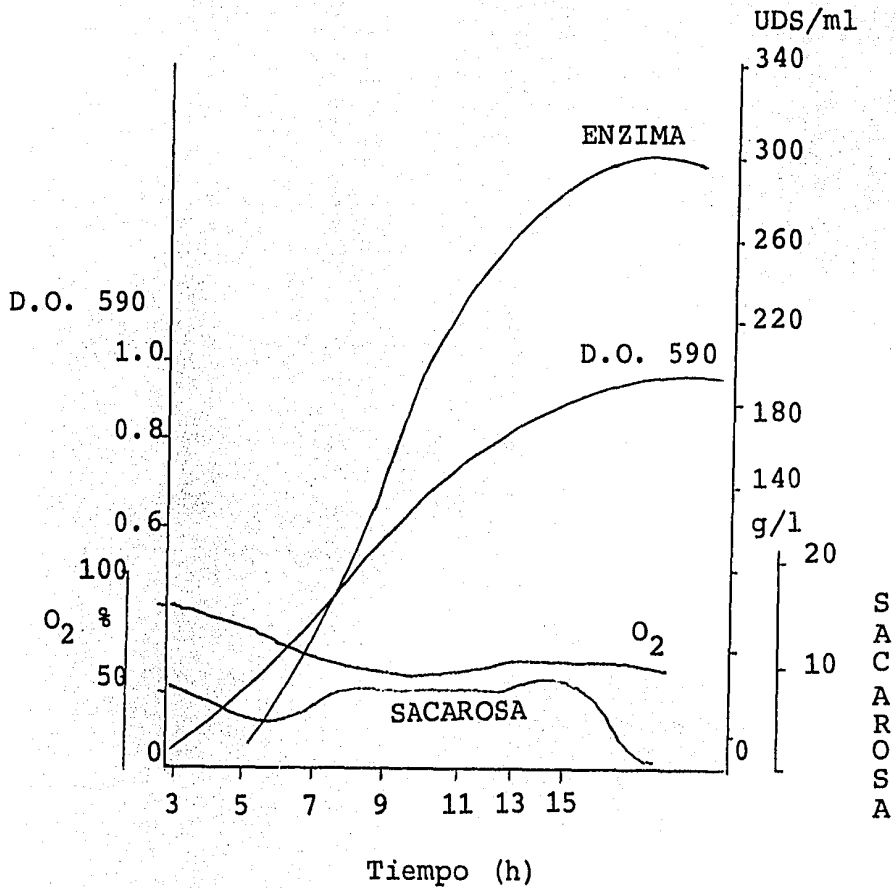


Fig. II-11.- Condiciones óptimas en fermentación intermitente para la producción de dextransacarasa (el pH y la temperatura se conservaron constantes, 6.7 y 23°C respectivamente) (Alsop, 1983).

Con anterioridad se ha descrito el inciso No. 1. A continuación se tratarán aspectos generales de los puntos 2 y 3. En lo referente al inciso 5, se reproducirán algunas particularidades de las patentes sobre la composición y preparación de las formulaciones farmacéuticas:

* Hidrólisis

La dextrana nativa o dextrana de alto peso molecular puede ser hidrolizada de 3 formas:

a) Acida. La hidrólisis ácida parece ser el método más atractivo, debido a que no precisa instalación compleja y se puede regular fácilmente. Colin y Belval (1940) describieron la hidrólisis parcial de la dextrana con ácido y la precipitación del producto hidrolizado con alcohol. Sohns et al. (1954) establecieron el tratamiento en instalación piloto del dextrano purificado por una precipitación previa a la hidrólisis, la cual la llevaron a cabo a pH 1 (H_2SO_4) y $80^{\circ}C$.

b) Enzimática. La hidrólisis enzimática de la dextrana es llevada a cabo por la enzima dextranasa. Dicha enzima es producida por ciertas bacterias aeróbicas y por hongos de los géneros Penicillium y Aspergillus. La familia de las dextranasas esta clasificada en endógenas y exógenas. La acción de las dextranasas sobre la dextrana ha sido muy estudiada. Charles y Farrell (1957) estudiaron la enzima de Penicillium lilacinum para obtener dextrana clínica a partir de la dextrana natural de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B512F. El producto cumplía con las directrices de la Food and Drug Administration y fué usado clínicamente.

Alsop (1983) experimentó con enzimas de Beckman y

Calbiochem demostrando que las de acción endógena producen una pequeña cantidad de oligosacáridos al inicio de la hidrólisis originando una distribución similar a la obtenida en la hidrólisis ácida. En contraste, la dextranasa Sigma grado I usada por Basedow (1980), aunque descrita como endógena, produce oligosacáridos, maltosa e isomaltosa al principio de la reacción. Una selección de enzimas comercialmente apropiadas producen diferentes distribuciones de peso molecular sobre el mismo tipo de dextrana, obviamente actúan de diferente forma en relación al ataque sobre la molécula de dextrana y a su comportamiento cerca de ambas ligaduras, $\alpha(1\rightarrow6)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$ en el polímero. Económicamente estas enzimas ofrecen algunas ventajas sobre el proceso ácido, a menos que puedan ser inmovilizadas y/o recuperadas y reusadas. Tales técnicas se han descrito también para purificar jarabes azucarados contenidos de dextranas contaminantes.

- c) Ultrasonica. Esta hidrólisis ha sido estudiada por numerosos investigadores. En particular, Basedow (1975) describió inicialmente la cinética de esta reacción. Este método provoca la ruptura de la molécula de dextrana preferentemente en su punto medio. A través de un análisis de GPC, mostró que una pequeña fracción de dextrana '40' (peso molecular, 40,000) se produce después de sucesivas hidrólisis obteniéndose también distribuciones de pesos moleculares cercanos a 10,000 y 20,000. Este estudio se llevó a cabo a nivel laboratorio y no se ha reportado hasta la fecha nada acerca del escalamiento a los niveles piloto e industrial (10).

* Fraccionación

Convencionalmente las dextranas con distribuciones características de peso molecular son fraccionadas, después de la hidrólisis, por medio de precipitaciones sucesivas con disolventes. Estas consumen tiempo y son caras, particularmente en relación a los costos de recuperación del disolvente. Recientemente se ha propuesto para la fraccionación de las dextranas a escala industrial la ultrafiltración seguida de una cromatografía (4-8). Barker y colaboradores (1978) en la Universidad de Aston escalaron la separación continua de dextranas de alto peso molecular de los hidrolizados industriales usando empaques de Porasil en columnas de acero inoxidable de 2" de diámetro operando a 60°C y 200 psig. La eficacia de la separación iguala a la producida en la fracción con solventes a escala industrial.

* Preparación de las dosis farmacéuticas

- Composición y preparación de la dextrana clínica destinada para sustituir el plasma sanguíneo, según las patentes 2,708,174 y 2,784,143 de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica (USOP)

La dextrana clínica es un material que posee ciertas propiedades químicas y físicas que la hacen apropiada para su uso en el cuerpo humano. Generalmente es empleada en una solución salina inyectable al 6%. El peso molecular debe tener un intervalo de 75,000 \pm 25,000, con no menos de un 5 a 10% de 25,000 ni más, con el mismo porcentaje, de 200,000. La viscosidad de una solución al 6% no debe ser menor a 2.5 ni mayor a 3.5 centipoises a 25°C, y el pH no menor a 5 ni mayor a 7. En cuanto a las condiciones salinas, no menos de 0.85 g de NaCl ni más de 0.95 g por 100 ml de solución. Stavely, autor de la primera patente antes mencionada, dis-

tingue su dextrana clínica de otras preparaciones, esencialmente con base en el porcentaje de enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en el polímero que alcanza un valor de 95%, el resto, son enlaces diferentes, por ejemplo $\alpha(1\rightarrow3)$.

Anteriormente las soluciones al 6% de dextrana clínica con un pH de 6 a 7 después del proceso de esterilización, presentaban un pH alrededor de 3. Cuando el pH era ajustado a un valor de 9.5 con NaOH antes de la esterilización, aparecía después de esta un color café en la solución que no podía ser eliminado con filtración ni con centrifugación.

Wiemann, autor de la segunda patente, describió su proceso y consiste primordialmente en desionizar las soluciones de dextrana a través de una monocapa de resinas intercambiadoras de iones; a las soluciones obtenidas se les adicionó de 0.05 a 0.2 g de una mezcla de Na_2HPO_4 y K_2HPO_4 por litro de solución de dextrana. Las preparaciones así esterilizadas eran incoloras y apropiadas para el uso como sustituto del plasma.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

* Equipo

- . Autoclaves vertical y horizontal
- . Incubadoras
- . Fermentador con capacidad de 1 l
- . Fermentador con capacidad para 4, 7 y 14 l
- . Potenciometros
- . Centrífugas
- . Espectrofotómetros de uno y dos haces
- . Baño de agua con termostato
- . Baño de agua con termostato y agitación
- . Agitador de tubos
- . Parrilla de calentamiento con agitadores magnéticos
- . Estufa con vacío
- . Balanzas digital y granataria
- . Cromatógrafo HPLC
- . Registradores
- . Equipo Millipore para filtración de agua

* Sustancias

- . Bacteria empleada.- Leuconostoc mesenteroides NRRL-B512F, cepa perteneciente al Depto. de Alimentos de la División de Posgrado, mantenida en forma liofilizada en ampolletas de 5 ml.
- Grado técnico
- . Sacarosa (azúcar standard)
- . Extracto de levadura (Yestal-400, Arancia, Ingredientes Especiales, S. A. de C. V.)
- . Fosfato dibásico de potasio, K_2HPO_4 (Cosmocel, S.A.)
- . Cloruro de sodio, NaCl
- . Sulfato de magnesio, $MgSO_4$
- . Sulfato de manganeso, $MnSO_4$

- . Sulfato ferroso, FeSO_4
- . Cloruro de calcio, CaCl_2
- . Acido fosfórico, H_3PO_4
- . Acido sulfúrico, H_2SO_4
- . Hidróxido de sodio, NaOH
- . Dextrana utilizada como materia prima para la elaboración de hierro-dextrana (Fisons de México, S. A.)
- Grado farmacéutico
- . Alcohol etílico $^{\circ}96$
- Grado reactivo
- . Reactivo DNS

Preparación.- 10 g de ácido 3, 5 dinitro salicílico se suspenden aproximadamente en 200 ml de agua destilada; se añade una solución de sosa (16 g en 150 ml de agua) gota a gota bajo una buena agitación, calentando un poco se es necesario; se añaden poco a poco 300 g de tartrato de sodio y potasio aforándose finalmente a un litro. Se mantiene en la oscuridad.

- . Fructosa, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- . Acido sulfúrico (conc.), H_2SO_4
- . Hidróxido de sodio, NaOH
- . Dextranas de pesos moleculares 10^4 , 4×10^4 , 7×10^4 y 2×10^6 , como azul de dextrana (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala Sweden)
- . Glucosa, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- . Etilen glicol
- . Azida de sodio, NaN_3

* Métodos empleados

En la tabla III-1 se presenta la composición del medio de cultivo utilizado tanto en la preparación de inóculos como en las fermentaciones.

Tabla III-1.- Composición del medio de cultivo tradicional

	(%)
Sacarosa	2
Extracto de levadura	2
Fosfato dibásico de potasio, K_2HPO_4	2
Sulfato de magnesio, $MgSO_4$	0.02
Sulfato de fierro (II), $FeSO_4$	0.001
Sulfato de manganeso (II), $MnSO_4$	0.001

El cloruro de sodio, que en este medio de cultivo pertenece a los elementos traza introducidos al 0.001%, no fué incluido en la formulación debido a que el extracto de levadura contiene altas cantidades del mismo según se muestra en la siguiente tabla (III-2).

Tabla III-2.- Contenido de NaCl
de los extractos de levadura disponibles

<u>Extracto de levadura</u>	<u>% Cl^-</u> (base seca)
Bioxon	3
Yestál-400	4

Preparación de inóculos

En volumen, el inóculo de todas las fermentaciones fué del 10%.

Volumen de fermentación, 0.5 l.- Una ampolleta conteniendo a la bacteria liofilizada, se puso en contacto con 50 ml de medio fresco, posteriormente se incubó 16 h a 30°C, necesarias para la hidratación y máximo crecimiento de bacterias activas.

Volumen de fermentación, 4.0 l.- Se procedió igual variando el volumen de medio (400 ml) y el tiempo de incubación (24 h).

Volumen de fermentación, 13.5 l.- Se propagó el inóculo debido a la magnitud del volumen. Se tomaron 50 ml de inóculo destinado a 0.5 l de fermentación, se vertieron en 1.35 l y se incubó durante otras 16 h.

Fermentaciones

Se experimentaron dos variaciones:

- 1.- Fermentación convencional. Controlando solo la temperatura, se permitía que la bacteria consumiera la sacarosa inicialmente implementada en el medio de cultivo, esquematizándose las variaciones en el crecimiento y en el pH.
- 2.- Fermentación retroalimentada. Partiendo con el mismo porcentaje de sacarosa que en la fermentación convencional, se experimentó la adición intermitente de sacarosa controlando el pH y la temperatura. Paralelamente se siguió la evolución del crecimiento.

En la Fig. III-1 se muestra el diagrama de flujo para la obtención de la enzima cruda.

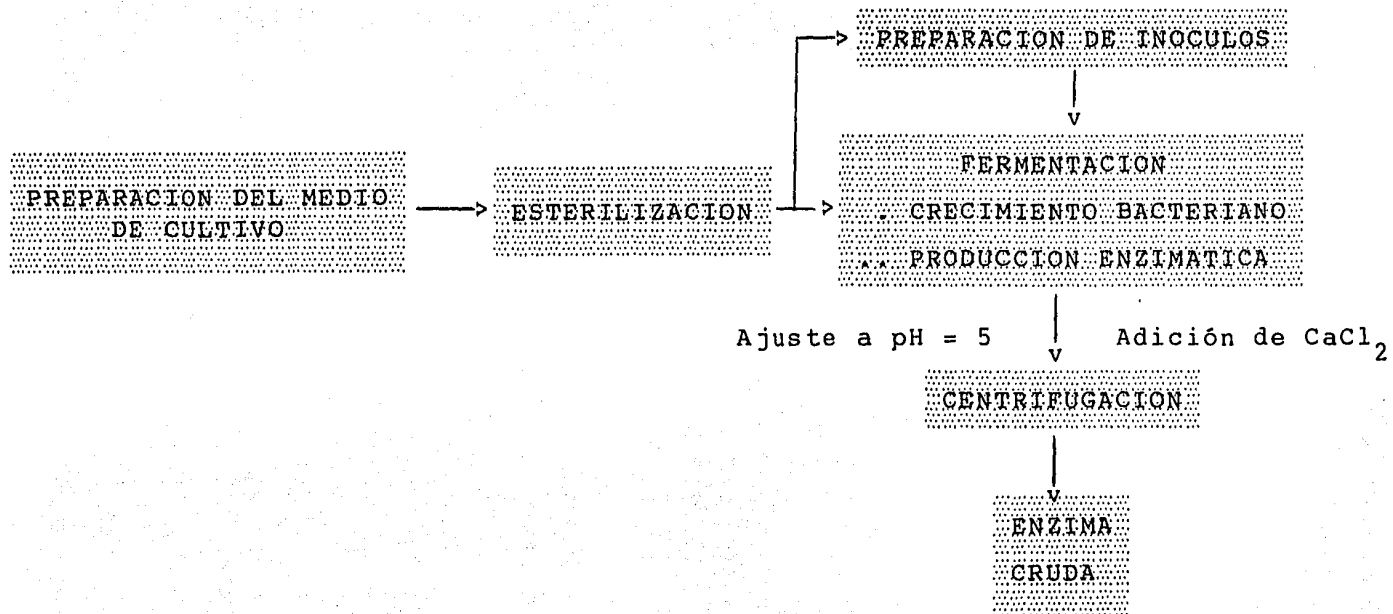


Fig. III-1.- Diagrama de flujo para la obtención de la enzima cruda.

El crecimiento bacteriano se detecto por turbimetría en un Spectronic 20 a 600 nm utilizando diferentes diluciones según la cantidad de biomasa presente, desde 1/10 para el inicio de las fermentaciones hasta 1/100, en particular, al final de las fermentaciones con adición de sacarosa.

Actividad enzimática

Revisando el mecanismo de acción de la dextransacarasa (Fig. II-8), se observa que después de hidrolizar a la sacarosa, esta enzima polimeriza unidades de glucosa liberando unidades de fructosa cuyo poder reductor puede detectarse con el método del DNS, por lo tanto, la velocidad inicial es proporcional a la cantidad de fructosa liberada.

Metodología.- A 10 ml de sobrenadante de fermentación contenido de enzima a pH 5 y con 0.05% de CaCl_2 , se le adicionan 2 ml de una solución de sacarosa al 60% de tal manera que la concentración final de sacarosa sea del 10%. Se homogeniza e incuba a 30°C. Se toman muestras a intervalos de tiempo bien definidos, por ejemplo, cada 3 min., siendo suficientes 12 min. de reacción.

Reacción del DNS.- El volumen de muestra fué de 0.5 ml y no de 1.0 ml como lo indica la técnica tradicional, por 2 razones:

- 1.- El pH = 5 del sobrenadante donde se encuentra la enzima provoca la precipitación del ácido DNS, que es estable a valores de pH fuertemente alcalinos donde se efectúa la reacción con el grupo reductor.
- 2.- En el caso de concentraciones enzimáticas elevadas, las lecturas en el espectrofotómetro revasarían los límites establecidos por la ley de Beer.

Por otro lado se tienen listos los tubos con 1 ml del reactivo DNS y 0.5 ml de NaOH 5 N (soluciona el problema planteado anteriormente en el punto No. 1). Inmediatamente después de

poner en contacto la muestra con dicho reactivo se homogenizan para someterlos 5 min a temperatura de ebullición en baño maría. Al finalizar este tiempo medido con cronómetro, se suspende la reacción en baño de hielo. Por último, se diluye con 10 ml de agua destilada y después de 10 min de reposo se lee en el espectrofotómetro a 540 nm (región visible). Como la fructosa es el azúcar con poder reductor que nos interesa detectar, previamente se determina una curva patrón de Absorbancia (540 nm) vs. concentración de fructosa (g/l) (de 0.2 a 2.0 g/l).

La actividad enzimática puede calcularse mediante la expresión:

$$\text{UDS/ml} = \frac{M (1.9) (1.2) (60) (2)}{m}$$

Donde M = pendiente de la curva de acción enzimática

1.9 = factor estequiométrico de conversión

= PM sacarosa/ PM fructosa

1.2 = 12/10

= 10 ml del sobrenadante con enzima + 2 ml de la solución de sacarosa 60°Brix/ 10 ml del sobrenadante con enzima.

60 = conversión de min a hr

2 = 0.5 ml de muestra en vez de 1.0 ml.

m = pendiente de la curva patrón (Absorbancia vs. concentración de fructosa (g/l)).

Síntesis enzimática

Se adicionó la sacarosa al sobrenadante contenido de la enzima, se controlaron la temperatura (30°C) y la agitación en el incubador. El líquido incrementa su viscosidad conforme

evoluciona la síntesis de dextranas. Para mantener la homogeneidad, se aumentó gradualmente la velocidad de agitación a intervalos de tiempo definidos.

El transcurso de la reacción se cuantificó en términos de la conversión de sacarosa a dextrana. Definiendo X como la conversión, se tiene que:

$$X = \frac{|\text{Sac}|_1}{|\text{Sac}|_0} \times 100$$

Donde $|\text{Sac}|_0$ = concentración de sacarosa al inicio de la reacción en g/l.

$|\text{Sac}|_1$ = concentración de sacarosa transformada a dextrana en el tiempo 1.

= $|\text{Fru}|_1$ (g/l) x 1.9 (factor estequiométrico de conversión entre sacarosa y fructosa).

La concentración de fructosa se determinó con el método del DNS detallado en la metodología para calcular la actividad enzimática.

Hidrólisis ácida

Se siguió el método de Sohns et al. (1954) para hidrolizar la dextrana nativa. Consiste en someter a una solución de dextrana nativa precipitada y redisuelta al 5-6% p/p, a 80°C y a un pH de 1 (H_2SO_4) durante aproximadamente 6 h.

Precipitación con alcohol. Fraccionación

Precipitación de la dextrana nativa
(previa al tratamiento hidrolítico)

Revisando lo reportado por H. M. Tsuchiya (1954) (Fig. III-2), se observa que hasta aproximadamente el 46% de etanol,

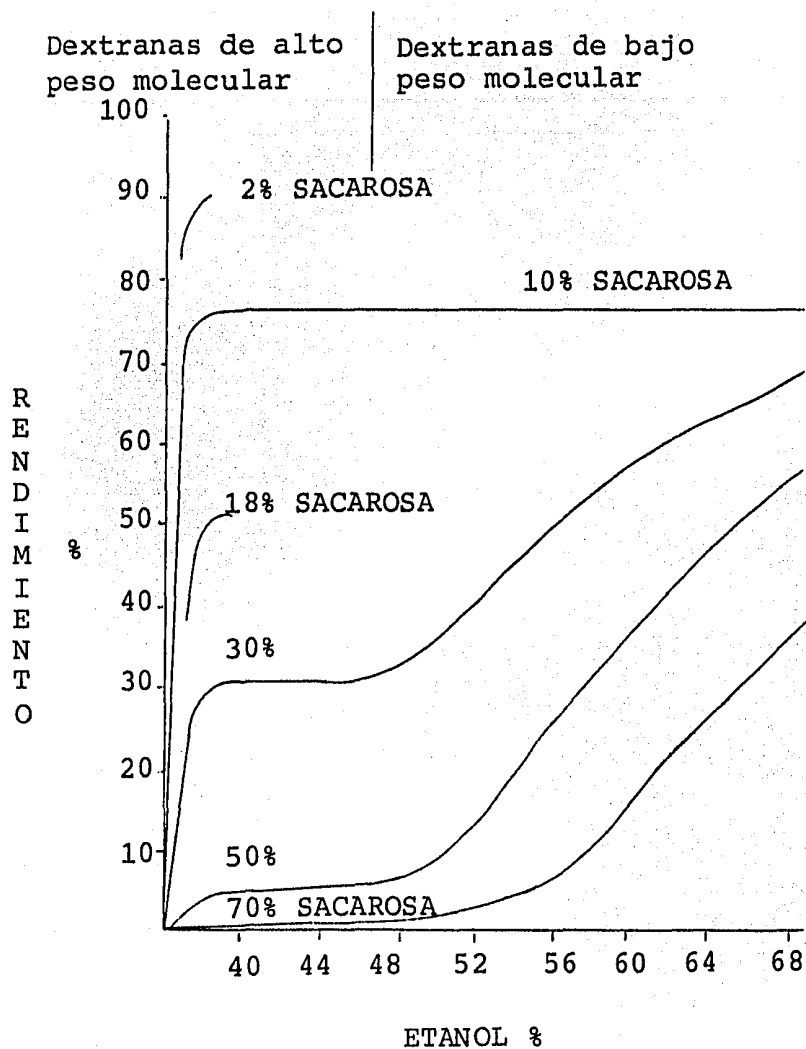


Fig. III-2.- Rendimiento de la fermentación de dextrana a diferentes concentraciones de sacarosa. Rendimiento de precipitación vs. concentración de etanol (Tsuchiya, 1954).

precipita la dextrana de alto peso molecular, independientemente de la concentración de enzima y de la cantidad de sacarosa utilizadas en la síntesis. A porcentajes mayores de alcohol, precipitan las de bajo peso molecular.

Precipitación de las dextranas hidrolizadas

Se modificó la segunda fase del método Sohns et al. ya que se utilizó etanol y no metanol. Se trazaron las curvas de precipitación de los patrones 70,000, 40,000 y 10,000, así como la de la dextrana destinada a la producción de hierro-dextrana (Fisons, S. A.). En la Fig. III-3 se muestran las curvas de precipitación, % de dextrana precipitada vs. % de etanol v/v a diferentes concentraciones iniciales de dextrana y en la Fig. III-4 se representa en forma de diagrama de flujo, el método Sohns et al.

Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Presión

Se desarrolló una técnica para el análisis y cuantificación de las dextranas hidrolizadas y fraccionadas. Esta se llevó a cabo en un cromatógrafo BECKMAN Modelo 332.

Se requirieron dos columnas conectadas en serie cuyas características se enlistan en la tabla III-3.

Las dextranas patrones, la glucosa y el azul de dextrana (estos últimos utilizados para la determinación de los límites de exclusión) se disolvieron en agua con 0.02% de azida de sodio (8) al 2% p/v.

La concentración de las muestras no fué exactamente 2%, pero si un valor aproximado y definido.

El agua con azida de sodio se utilizó como fase móvil del sistema; el flujo de esta última, el volumen de inyección, el índice de refracción así como la sensibilidad del registrador y la velocidad del papel en el mismo, se detallan en los cromatogramas del Cap. IV (resultados).

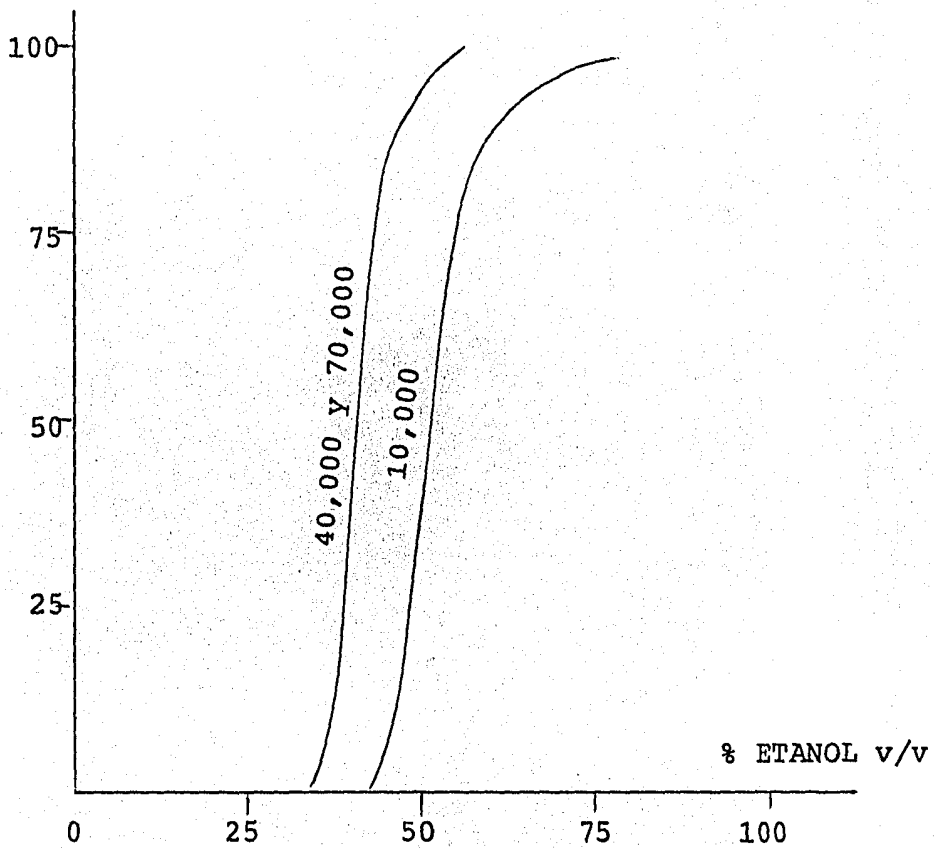
DEXTRANA
PRECIPITADA

Fig. III-3 a- Curvas de precipitación % de dextrana precipitada vs. % Etanol v/v de los estándares con pesos moleculares de 70,000, 40,000 y 10,000.

Condiciones: Concentración de dextrana = 10%
T = 19°C.

%
DEXTRANA
PRECIPITADA

54

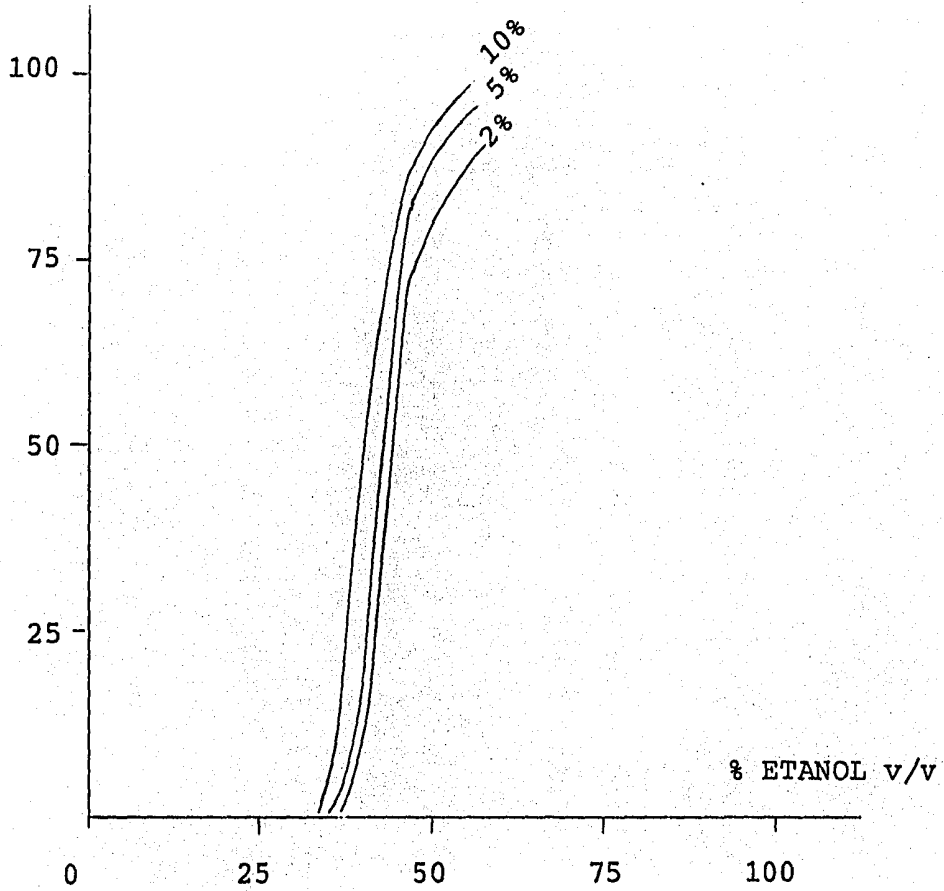


Fig. III-3b- Curvas de precipitación % de dextrana precipitada vs. % Etanol v/v de los estándares con pesos moleculares de 70,000 y 40,000 a diferentes concentraciones iniciales de dextrana.
T = 19°C.

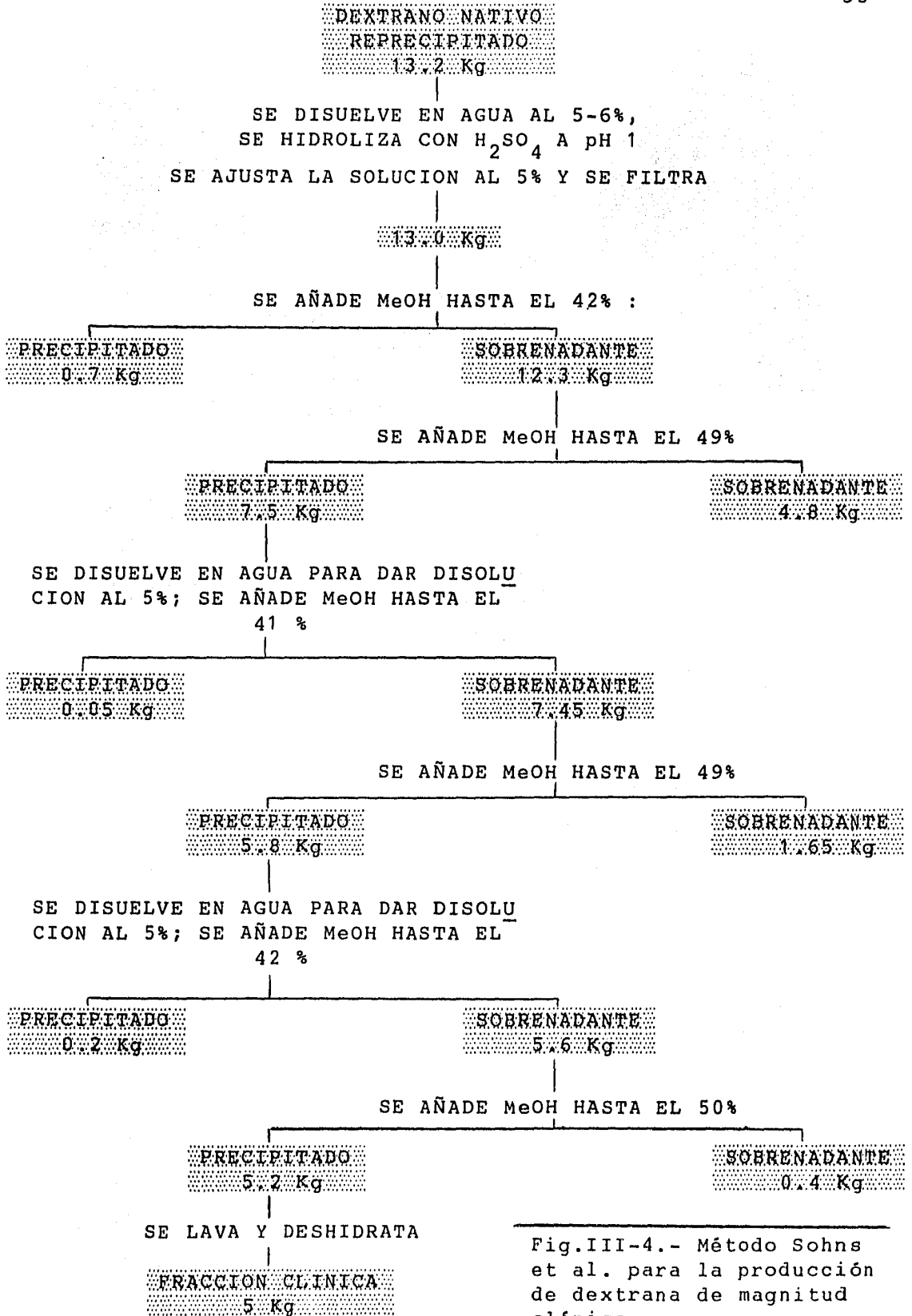


Fig.III-4.- Método Sohns et al. para la producción de dextrana de magnitud clínica.

Denominación	Spherogel TSK-5000 PW	TSK-3000 SW
Lugar en la conexión en serie	1 ^o	2 ^o
Diámetro x Longitud (mm x mm)	7.5 x 300	7.5 x 300
Tamaño de partícula	17 μm	10 μm
Límite de exclusión	7×10^6	1.5×10^5
Número de platos teóricos	10,000	

Tabla III-3.- Características de las columnas utilizadas en el análisis por cromatografía líquida de alta presión.

CAPITULO IV

RESULTADOS

FERMENTACION. PRODUCCION DE LA ENZIMA

DEFINICION DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION

Tomando como base el medio optimizado empleado por López (1980), se procedió a la sustitución de las materias primas no disponibles en el país, por aquellas de producción nacional. Las fermentaciones se efectuaron en un volumen de 0.5 l manteniendo constantes las condiciones de agitación (300 rpm) y la temperatura (28-29°C).

Se analizó la influencia de la aireación, efectuando varias pruebas a diferentes gastos de aire incorporado al medio de fermentación. Estos resultados se muestran en la Fig. IV-1 donde se observa que a partir de 0.1 VVM (volumen de aire/volumen de medio) la bacteria Leuconostoc mesenteroides NRRL-B512F crece mejor y por ende, segrega mayor cantidad de enzima.

Se analizó también la influencia del tipo de extracto de levadura efectuando fermentaciones a diferentes concentraciones. Los resultados de este estudio se muestran en la Fig. IV-2 de donde se desprende un valor óptimo para el extracto de levadura YESTAL-400 de 2%. En la misma figura se observa que el YESTAL-400 contribuye a una mejor producción de la enzima a pesar de ser un producto industrial de grado técnico con un alto contenido de sales, en particular, de cloruros. Por el contrario, el extracto de levadura de BIOXON, normalmente utilizado a nivel laboratorio para la preparación de medios de cultivo destinados a análisis microbiológicos, resultó de menor eficacia en la producción de dextranasa. En la tabla III-1 (Cap. III) se resume la composición del medio de cultivo empleado.

OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DE LA ENZIMA

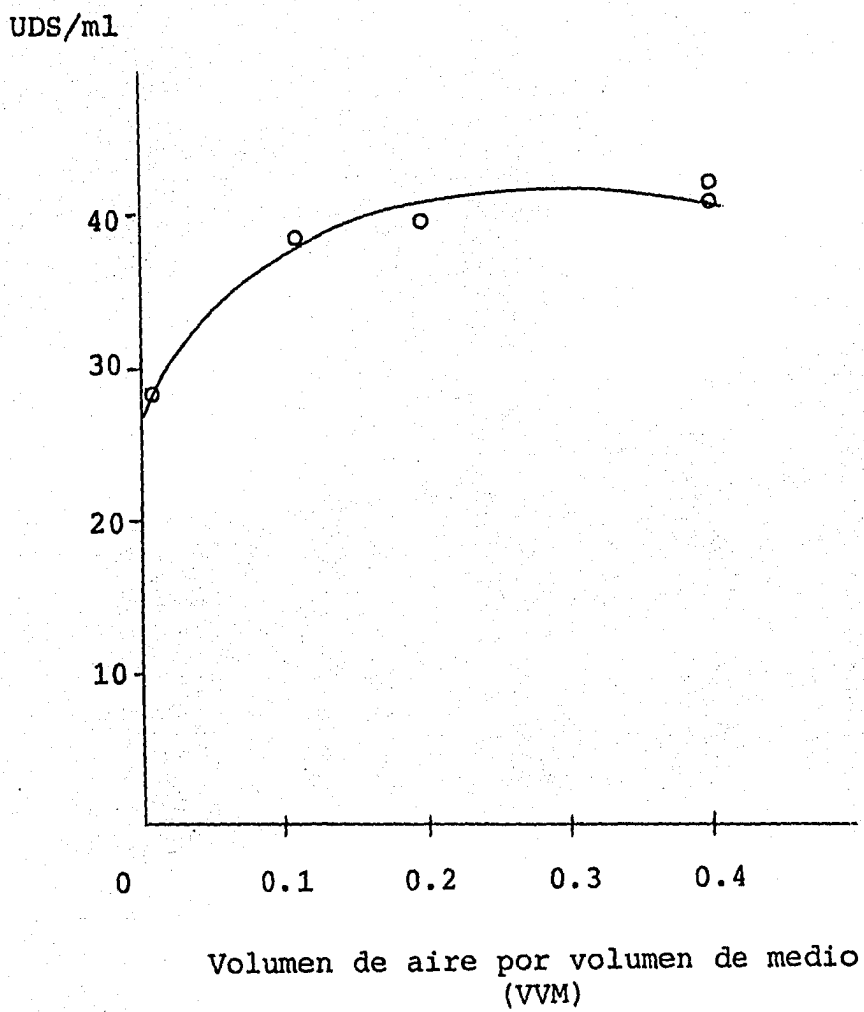


Fig. IV-1.- Influencia de la aireación en la producción de enzima.

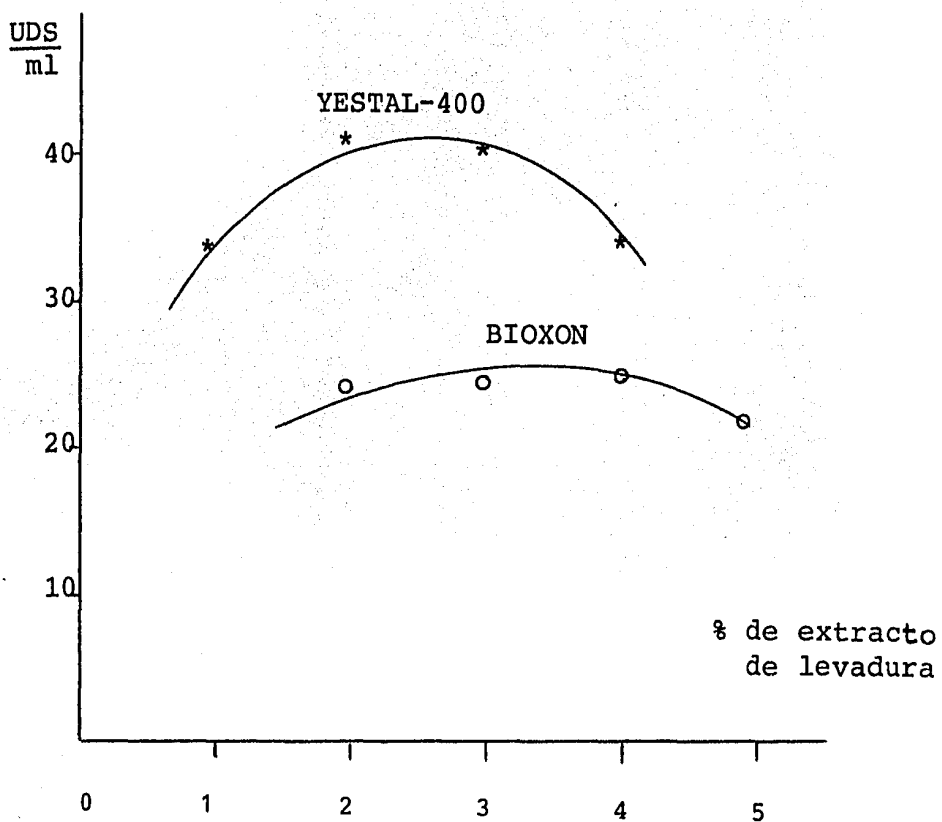


Fig. IV-2.- Selección del tipo y porcentaje óptimos de extracto de levadura.

En el presente trabajo, tomando como referencia los resultados obtenidos por López y Monsan (1980) en fermentación retroalimentada (Fig. II-5), se efectuó una fermentación en volumen de 0.5 l con regulación de pH partiendo con una concentración de sacarosa del 2%. Iniciando la fase de crecimiento se adicionó en forma intermitente 1% en peso de azúcar estandar con respecto al volumen de fermentación por hora. Este porcentaje va de acuerdo a lo reportado por Scheneider (1980) sobre el consumo de sacarosa por Leuconostoc mesenteroides NRRL-B512F que es de 10-11 g/lh.

Los resultados de este experimento se reportan en la Fig. IV-3 donde se observa que la producción de enzima alcanza 170 UDS/ml.

La finalidad de efectuar las adiciones en esta forma es de producir un mejor crecimiento bacteriano y un alto nivel de inducción enzimática sin permitir la síntesis del polímero, ya que su presencia dificultaría la posterior separación enzima-biomasa debido a la alta viscosidad del medio.

ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE FERMENTACION

Fermentación de 3 l

A este nivel se estudió el crecimiento de la bacteria y se cuantificó la actividad final alcanzada bajo las mismas condiciones de fermentación que a nivel de 0.5 l:

$$T(^{\circ}\text{C}) = 26$$

$$\text{rpm} = 300$$

$$|\text{Sac}|_0 = 2\% \text{ w/v}$$

Sin adiciones, con el fin de probar inicialmente el sistema en las condiciones tradicionales de fermentación.

Los resultados se muestran en la Fig. IV-4, donde se alcanza una actividad enzimática de 30 UDS/ml en comparación a 40

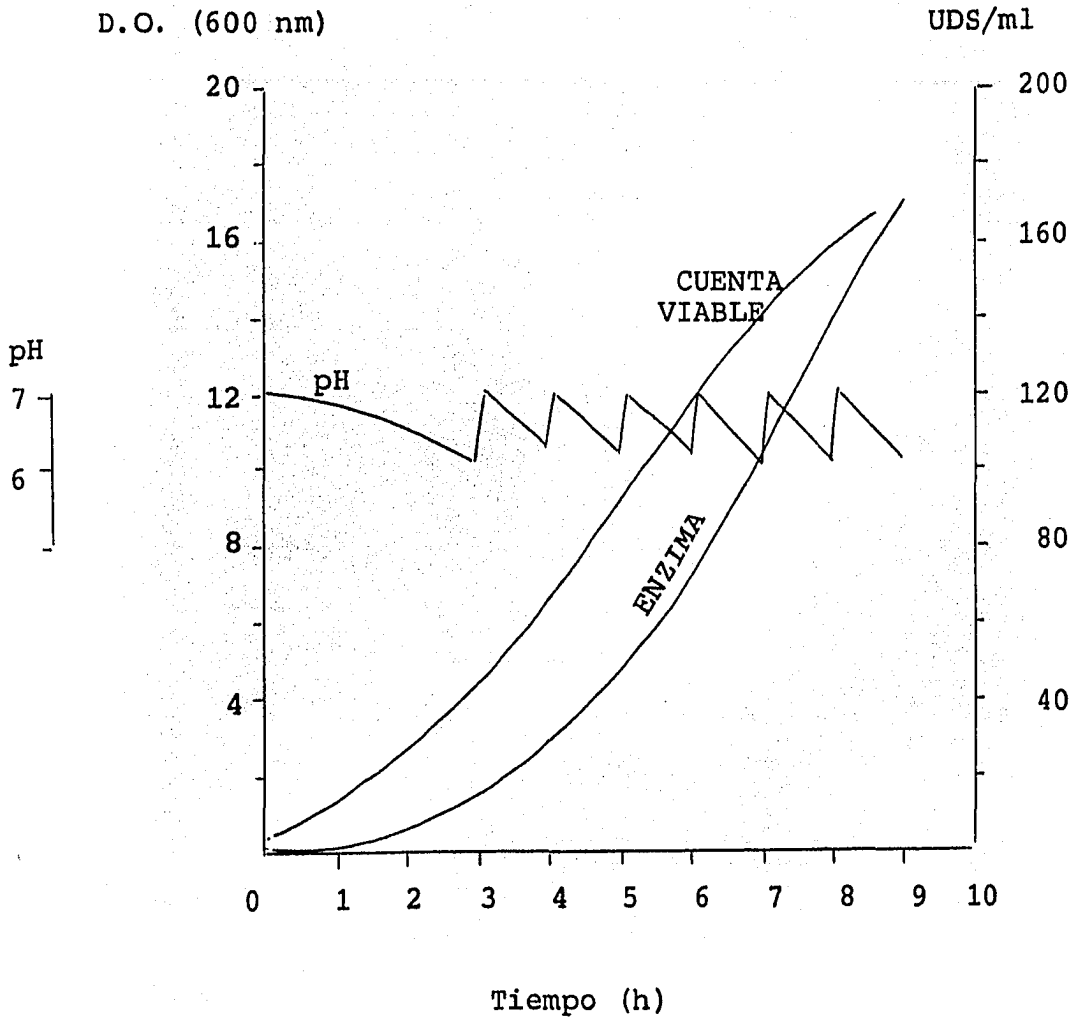


Fig. IV-3.- Fermentación retroalimentada en volumen de 0.5 l con control de pH.

T = 27-28°C.

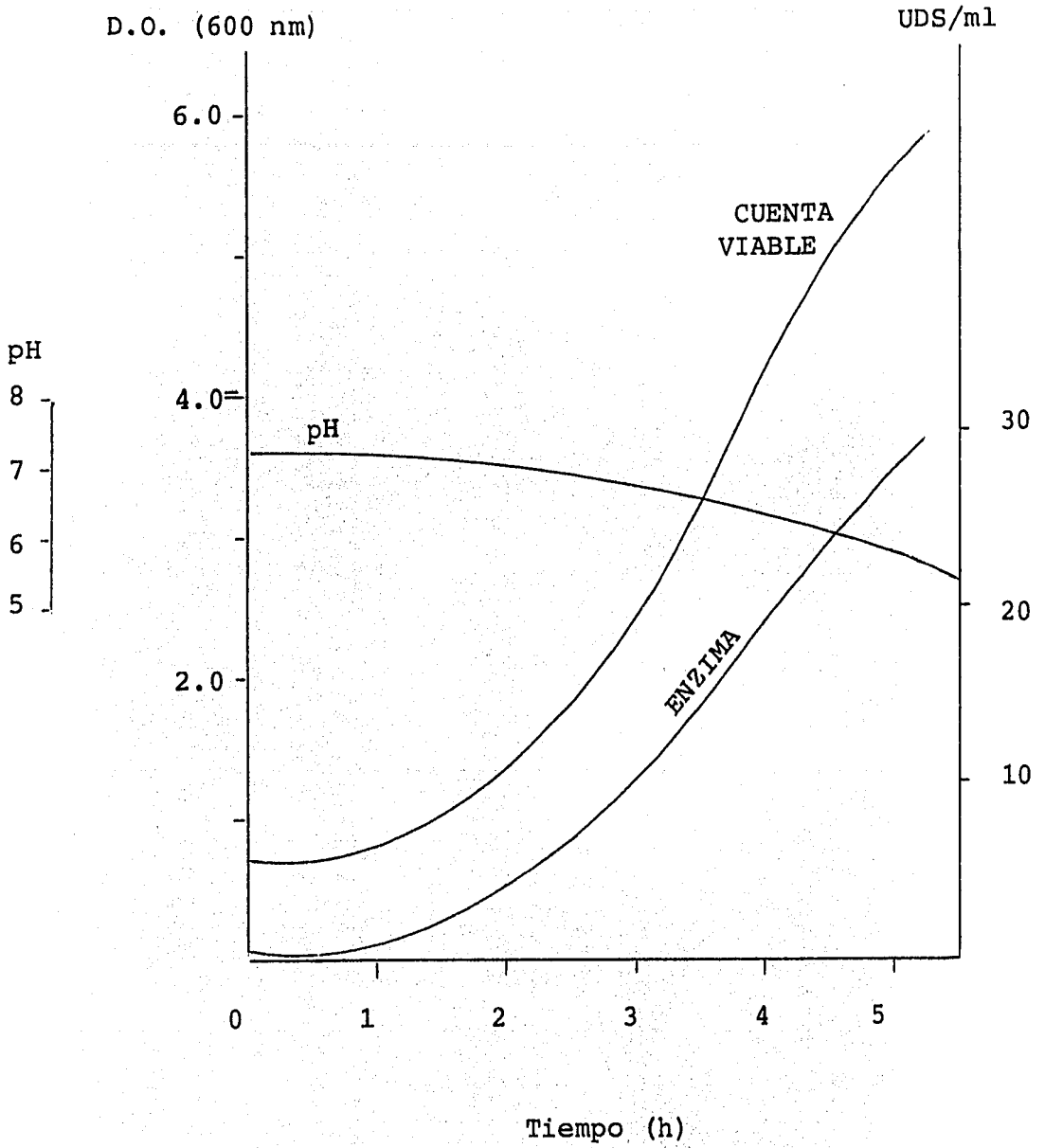


Fig. IV-4.- Fermentación convencional en volumen de 3.0 l.
T = 27-28°C.

UDS/ml obtenidas en 0.5 l de fermentación.

Para encontrar las posibles causas de esta baja en la producción de enzima se compararon las velocidades de crecimiento en ambos procesos.

El crecimiento microbiano responde a un modelo de primer orden, con respecto a la concentración de células:

$$\text{Ec. IV-1} \quad \frac{dx^*}{dt} = \mu x^*$$

Donde μ corresponde a la velocidad específica de crecimiento. Esta velocidad es función de la concentración de sustrato limitante (generalmente la fuente de carbono) de acuerdo al modelo de Monod:

$$\text{Ec. IV-2} \quad \mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s + S}$$

Considerando que la sacarosa se encuentra en exceso al inicio del cultivo, puede suponerse para esta etapa que:

$$S \gg K_s$$

La ecuación IV-2 quedaría simplificada de la siguiente forma

$$\text{Ec. IV-3} \quad \mu = \mu_{\text{máx}}$$

De cualquier forma, la evaluación puntual de la velocidad de crecimiento puede estimarse tomando intervalos discretos de tiempo y considerando de la ecuación IV-1 que:

$$\mu = \frac{1}{x^*} \frac{\Delta x^*}{\Delta t}$$

En la Fig. IV-5 se describe el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento a lo largo de las fermentaciones de 0.5 y 3 l. De esta figura se puede observar que el inicio de la fermentación es muy similar alcanzándose sin embargo, una mayor velocidad de crecimiento para el cultivo de 0.5 l. Esta situación puede deberse a limitaciones en el suministro de oxígeno, por deficiencias ya sea en la aireación o en la agitación.

Sin embargo, se decidió efectuar en aproximadamente el mismo volumen (4 l), el sistema de fermentación retroalimentado bajo las mismas condiciones del proceso. Los resultados se muestran en la Fig. IV-6, donde se alcanza una producción de dextranosa de aproximadamente 140 UDS/ml.

Criterios de escalamiento

Dada la capacidad de los fermentadores disponibles, se decidió efectuar un escalamiento a nivel semi-piloto, con el fin de definir el posible criterio de escalamiento que definiese los criterios de diseño para el proceso de fermentación a mayores capacidades.

Los criterios de escalamiento disponibles más adecuados a procesos de fermentación son:

- a) Potencia por unidad de volumen constante
- b) Coeficiente de transferencia de masa constante
- c) Número de Reynolds constante
- d) Velocidad en la punta del agitador constante
- e) Tiempo de mezclado constante

Se analizó para este proceso específicamente cada uno de estos criterios, encontrándose que el más adecuado dadas sus características fué la potencia por unidad de volumen constante ya que ofrecía las mejores perspectivas. Los demás

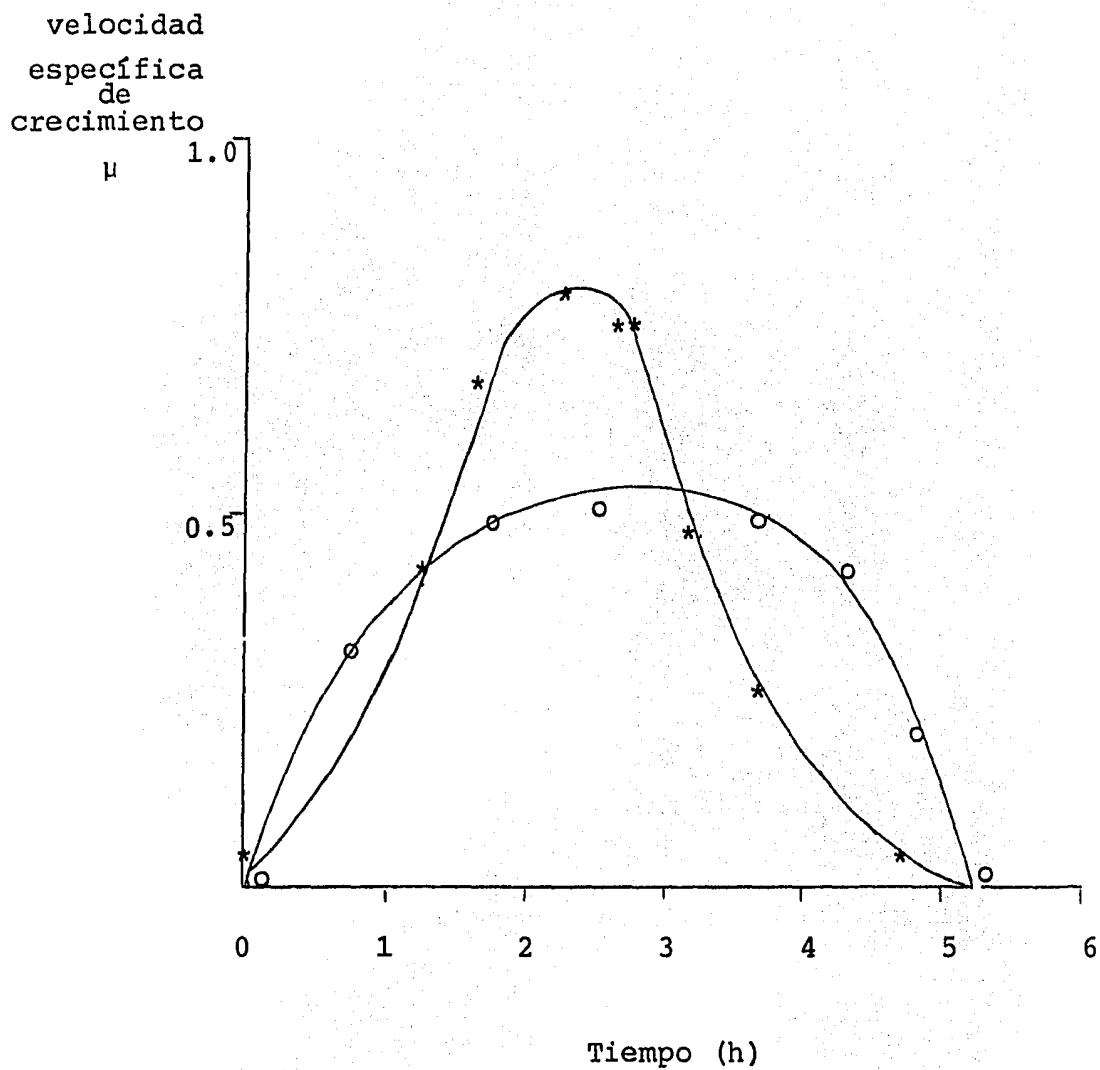


Fig. IV-5.- Comparación de la velocidad específica de crecimiento en los volúmenes de fermentación (convencional) 0.5 l (*_*) y 3.0 l (o_o).

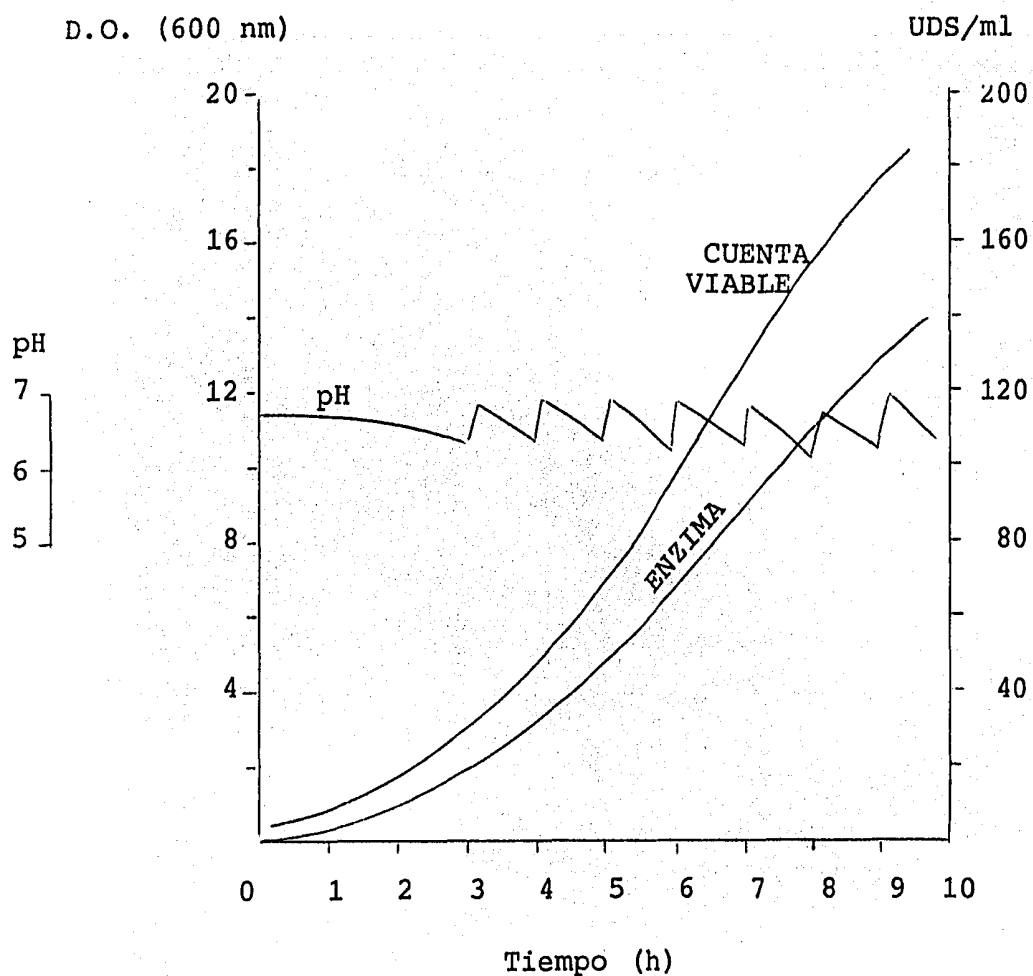


Fig. IV-6.- Fermentación retroalimentada en volumen de 4.0 l con control de pH.
T = 26-27°C.

criterios fueron descartados por las siguientes razones:

b) $k_{1a} = \text{cte.}$

(coeficiente de transferencia de masa constante)

Al ser el proceso microaerofílico, la disponibilidad de oxígeno no resulta limitante.

c) $N_{Re} = \text{cte.}$

(número de Reynolds constante)

Ocasiona disminuciones muy drásticas en la potencia suministrada y en la velocidad de agitación.

d) $NDi = \text{cte.}$

(velocidad en la punta del agitador constante)

El microorganismo no está sujeto a daños por esfuerzos cortantes en los rangos de operación.

e) $Q/V = \text{cte.}$

(tiempo de mezclado constante)

Los resultados de un proceso diseñado con estas características serían altamente costosos en términos energéticos.

En estas condiciones se seleccionaron como criterios de diseño los siguientes:

a) Similitud geométrica

$$b) N_2 = \left(\frac{N_1^3 \cdot Di_1^2}{Di_2^2} \right)^{1/3} = N_1 \left(\frac{Di_1}{Di_2} \right)^{2/3}$$

$$c) P_2 = P_1 \left(\frac{N_2^3 \cdot Di_2^5}{N_1^3 \cdot Di_1^5} \right) = \left(\frac{Di_2}{Di_1} \right)^3$$

El fermentador disponible con capacidad de 14 l fué entonces "diseñado", bajo este criterio, con el fin de determinar las condiciones de operación. De esta forma se encontró que dados los bajos consumos de potencia en los sistemas a nivel laboratorio, las condiciones resultaban muy similares a las de la fermentación de 0.5 l (0.11 en lugar de 0.15 VVM y 264 en lugar de 300 rpm).

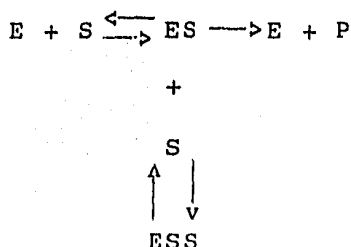
Los resultados de la fermentación en 14 l se muestran en la Fig. IV-7. Puede observarse que la actividad obtenida es prácticamente igual a los resultados de laboratorio, (170 UDS/ml), lo que permite aseverar que el criterio de escalamiento seleccionado es el adecuado, facilitando al mismo tiempo, el diseño de sistemas de producción semiindustrial. Un ensayo a nivel de 500-700 l es sin embargo recomendable para este tipo de procesos.

SINTESIS ENZIMATICA

Se procedió a establecer un modelo matemático que describiese el comportamiento cinético de la dextransacarasa producida.

Se observó que sólo obedece el modelo de Michaelis-Menten en zonas de baja concentración de sustrato, estando sujeta a un proceso de inhibición, a concentraciones superiores al 10%. Estos resultados se presentan en la Fig. IV-8.

Ante esta situación se postuló un modelo que incluyese dicha inhibición considerando que su mecanismo es:



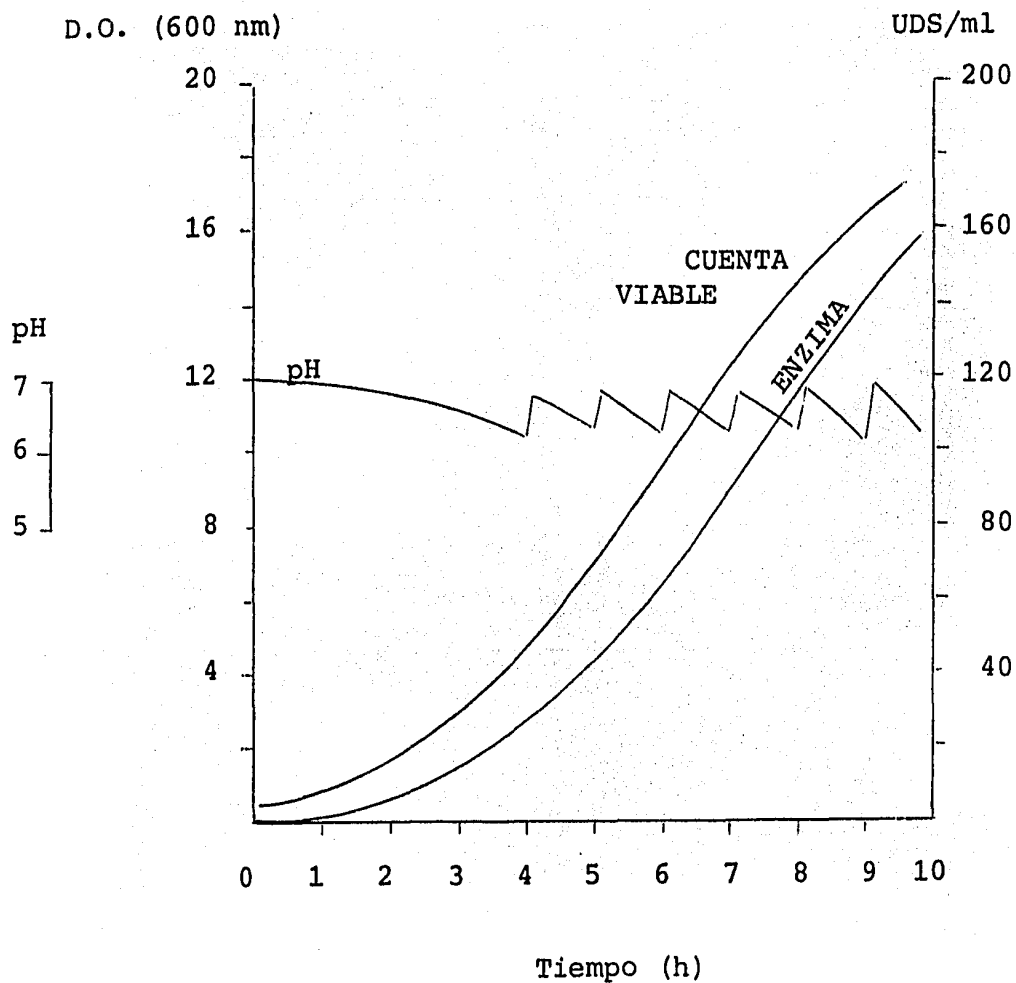


Fig. IV-7.- Fermentación retroalimentada en volumen de 13.5 l con control de pH.
T = 26-27°C.

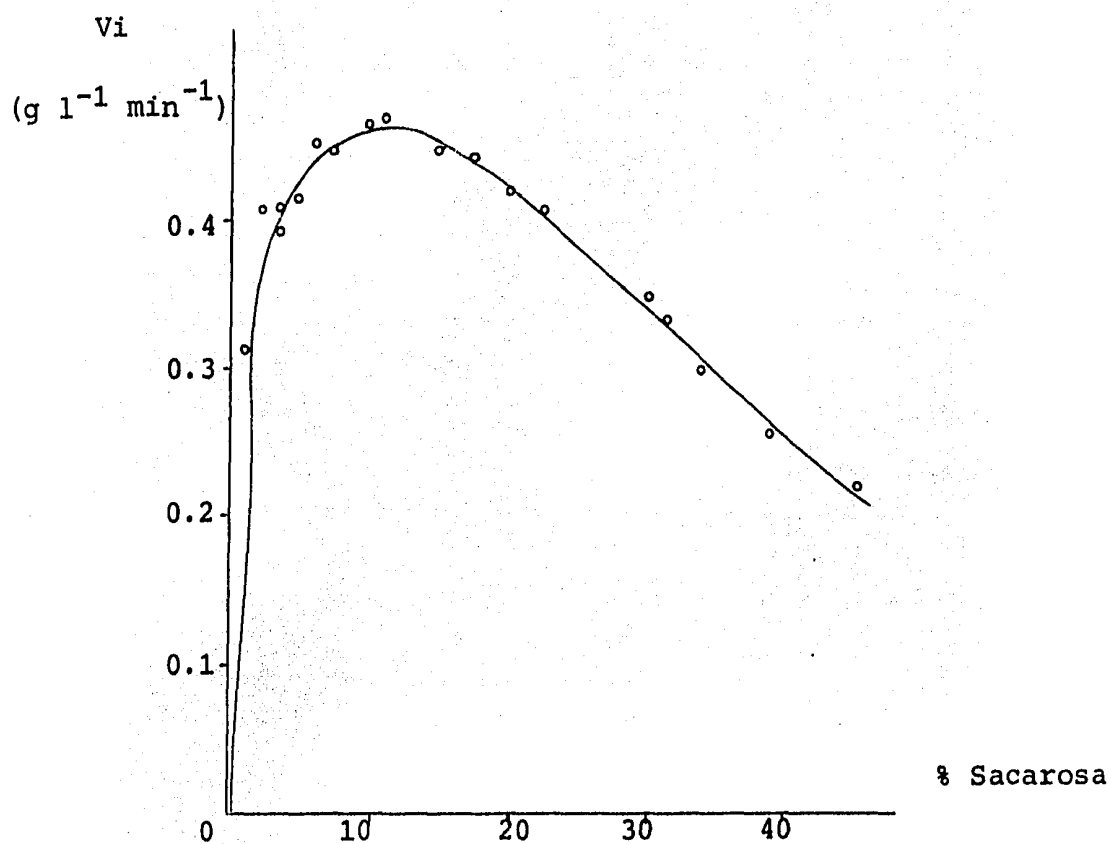


Fig. IV-8.- Estudio cinético de la dextransacarasa.
Velocidad inicial vs. % sacarosa

El modelo correspondiente resulta ser:

$$\text{Ec. IV-4} \quad v = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_m + S + K_i S^2}$$

Donde K_i es la constante de inhibición.

Dicha ecuación es la de Michaelis-Menten adicionada del término $K_i S^2$ que se refiere a la hipótesis planteada.

Para la obtención de los parámetros de dicho modelo, se analizaron por separado las zonas de baja y alta concentración, de tal forma que el inverso del modelo puede simplificarse para la zona de baja concentración ($K_i S/V_{\text{máx}} \rightarrow 0$):

$$\text{Ec. IV-5} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{S}$$

De donde se obtiene el valor de $K_m = 5.12 \text{ g l}^{-1}$ y el de $V_{\text{máx}} = 0.4859 \text{ g l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. IV-9a).

Para la zona de alta concentración ($K_m/V_{\text{máx}} S \rightarrow 0$):

$$\text{Ec. IV-6} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_i S}{V_{\text{máx}}}$$

De donde un valor de $K_i = 2.118 \times 10^{-3} \text{ l g}^{-1}$ fué calculado (Fig. IV-9b).

Contando ya con un modelo adecuado para la descripción del comportamiento de la enzima con base en las velocidades iniciales, se procedió a la obtención de una ecuación de diseño para un reactor intermitente agitado. Esta resulta ser la alternativa más adecuada puesto que dadas las características de la reacción, es prácticamente imposible concebir un sistema continuo, al menos para la síntesis de dextranas de alto peso molecular.

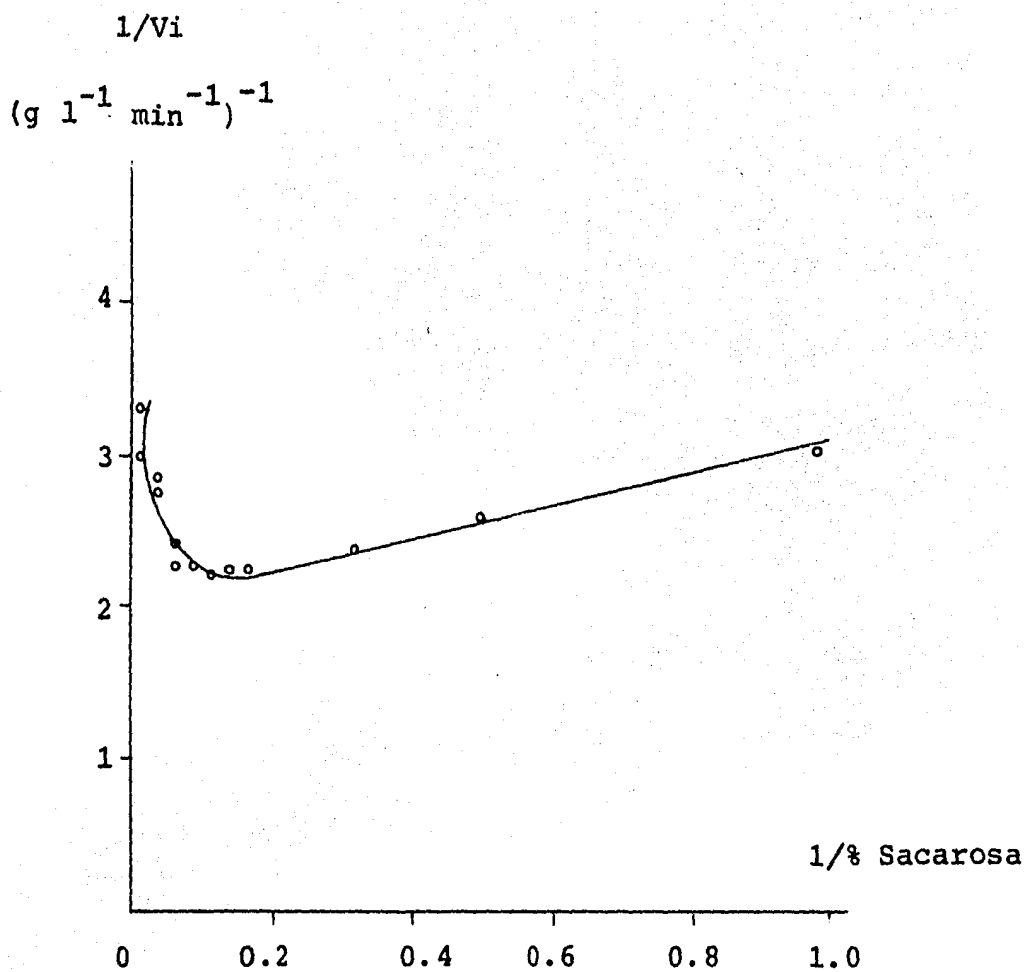


Fig. IV-9a.- Obtención de K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

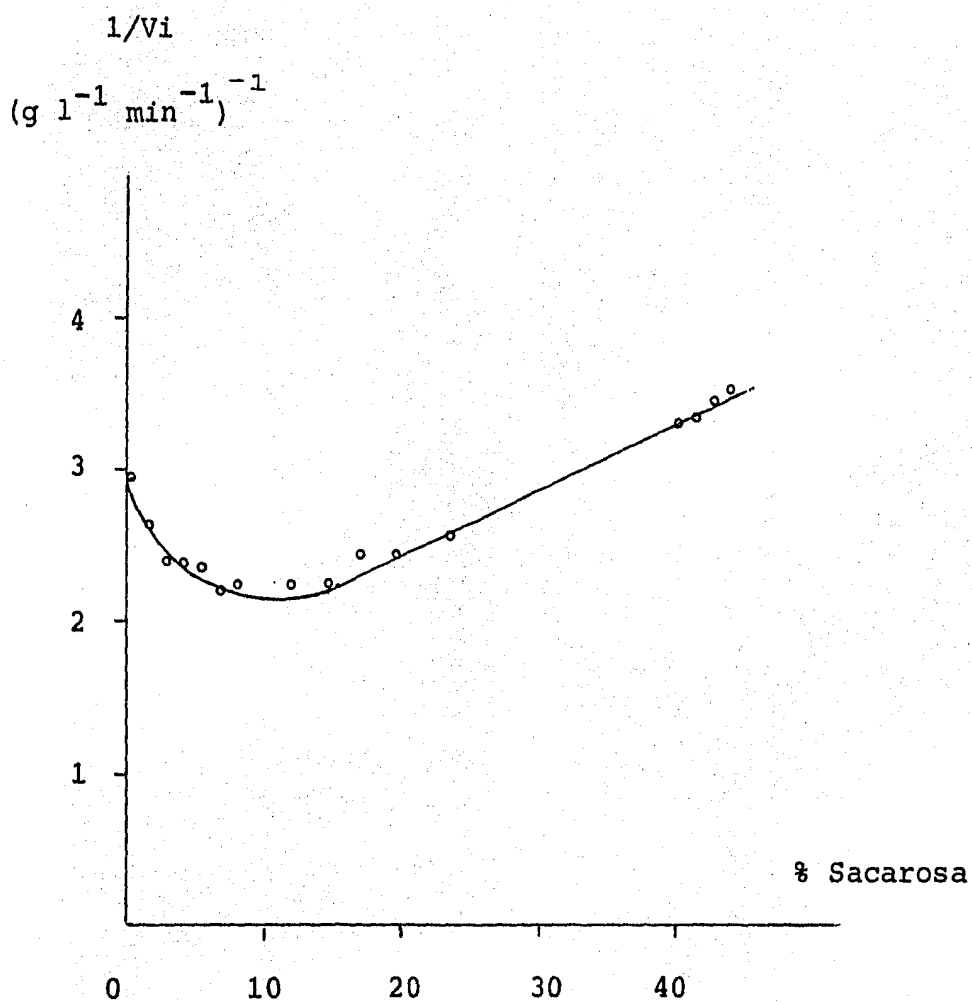


Fig. IV-9b.- Obtención de K_i .

En las operaciones por lotes (estado no constante) no hay corrientes entrando y saliendo del reactor. Se supone que el sustrato limitante sufre sólo una reacción. Si m es la masa del sustrato correspondiente a una conversión cero y Δx es la conversión en el tiempo Δt , la acumulación del sustrato en el tiempo Δt es $m \Delta x$.

Entonces, el balance de masa puede ser expresado como:

$$\text{Ec. IV-7} \quad vV \Delta t = m \Delta x$$

Las propiedades de la mezcla de reacción variarán con el tiempo, por lo que el balance de masa se transforma en una ecuación diferencial. Si se divide entre Δt y se toma el límite como $\Delta t \rightarrow 0$, la ecuación IV-7 adquiere la forma:

$$\text{Ec. IV-8} \quad \frac{dx}{dt} = \frac{v V}{m}$$

v , es la velocidad de desaparición del sustrato por unidad de volumen.

Para operaciones isotérmicas, v depende solo de la composición (o de la conversión para una sola reacción), de manera que la solución para la conversión con respecto al tiempo, puede obtenerse de un solo balance de materia. Se puede representar el resultado resolviendo la ecuación IV-8 para dt e integrando formalmente se obtiene que:

$$\text{Ec. IV-9} \quad t = m \int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{vV} = \frac{m}{mt} \int_{x_1}^{x_2} \rho \frac{dx}{v}$$

Donde x_1 es la conversión inicial y x_2 la conversión en el tiempo t . La segunda igualdad expresa el volumen de la mezcla de reacción en términos de su masa total mt y densidad.

La importancia de arreglar la expresión en esta forma radica en que el tiempo, variable designada como independiente en el diseño, esté separada de las variables dependientes características de la reacción química. Si la velocidad y la densidad de la mezcla de reacción son conocidas como funciones de conversión, el valor de la integral para cualquier conversión deseada puede ser evaluada sin referencia al equipo de reacción.

Si la densidad o el volumen de reacción son constantes, la ecuación IV-9 puede ser escrita en forma simple en términos de la concentración. Si S_0 es la concentración inicial y es igual a m/V , la ecuación adquiere la siguiente forma :

$$\text{Ec. IV-10} \quad t = S_0 \int_0^x \frac{dx}{v} = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{v}$$

Definiendo $v = - dS/dt$ como la velocidad de desaparición del sustrato, en este caso sacarosa, se puede integrar la ecuación IV-4 reorganizándola inicialmente de la siguiente manera

$$\text{Ec. IV-11} \quad v_{\text{máx}} dt = \frac{K_m + S + K_i S^2}{S} ds$$

Si los límites son $S = \left| \text{Sacarosa} \right|$ en el tiempo t y
 $S_0 = \left| \text{Sacarosa} \right|$ al inicio de la reacción

Se tiene finalmente que:

Ec. IV-12

$$v_{\text{máx}} t = K_m \ln \frac{S_0}{S} + (S_0 - S) + \frac{K_i}{2} (S_0^2 - S^2)$$

Esta ecuación puede expresarse en términos de conversión partiendo de la siguiente premisa :

$$\text{Ec. IV-13} \quad x = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad S = S_0(1-x)$$

Al sustituir S en la ecuación IV-12 se origina la siguiente igualdad (Ec. IV-14):

$$V_{\text{máx}} t = \underbrace{K_m \ln(1-x)^{-1}}_a + S_{0x} + \underbrace{\frac{K_i S_0^2}{2} (2x-x^2)}_b$$

Observando con detalle, se advierte que el término a pertenece a la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que el término b pertenece a la del efecto de inhibición por sustrato. En la Fig. 10 se muestran los puntos experimentales obtenidos a diferentes concentraciones iniciales aparte de la predicción teórica de los modelos de Michaelis-Menten y de inhibición por exceso de sustrato (resumen de 10 corridas). Del análisis de estos resultados, se presentan las siguientes alternativas:

- 1.- La producción de dextranas empleando bajas concentraciones de sacarosa se lleva a cabo a la mayor velocidad de reacción posible.
- 2.- Solo se logran obtener altas concentraciones de producto (dextranas) partiendo de altas concentraciones de sustrato, lo que va en detrimento de la velocidad de reacción.

Esta situación hace pensar en la existencia de un valor óptimo de concentración inicial de sacarosa, que resulte en una máxima productividad.

El sistema fué analizado de la siguiente forma;

Definiendo la productividad como:

$$\begin{aligned} \underline{P} &= \frac{\text{dextranas producidas}}{\text{tiempo invertido en la producción}} \\ &= \frac{S_{0x}}{t_{\text{muertos}} + t_{\text{reacción}}} \end{aligned} \quad (\text{Ec. IV-15})$$

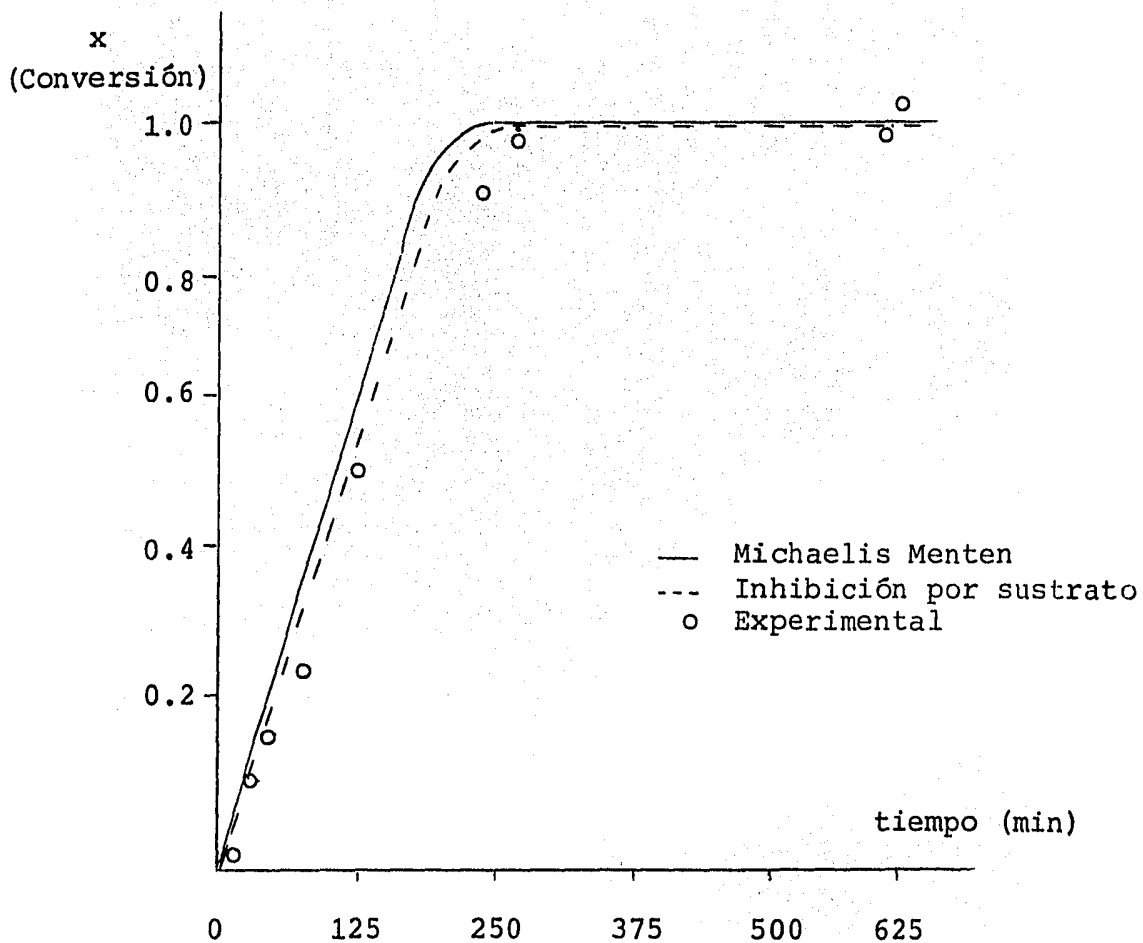


Fig. IV-10a.- Comparación de los puntos experimentales con la predicción teórica de los modelos de Michaelis Menten y de Inhibición por exceso de sustrato para una concentración inicial de sacarosa de 60 g/l.

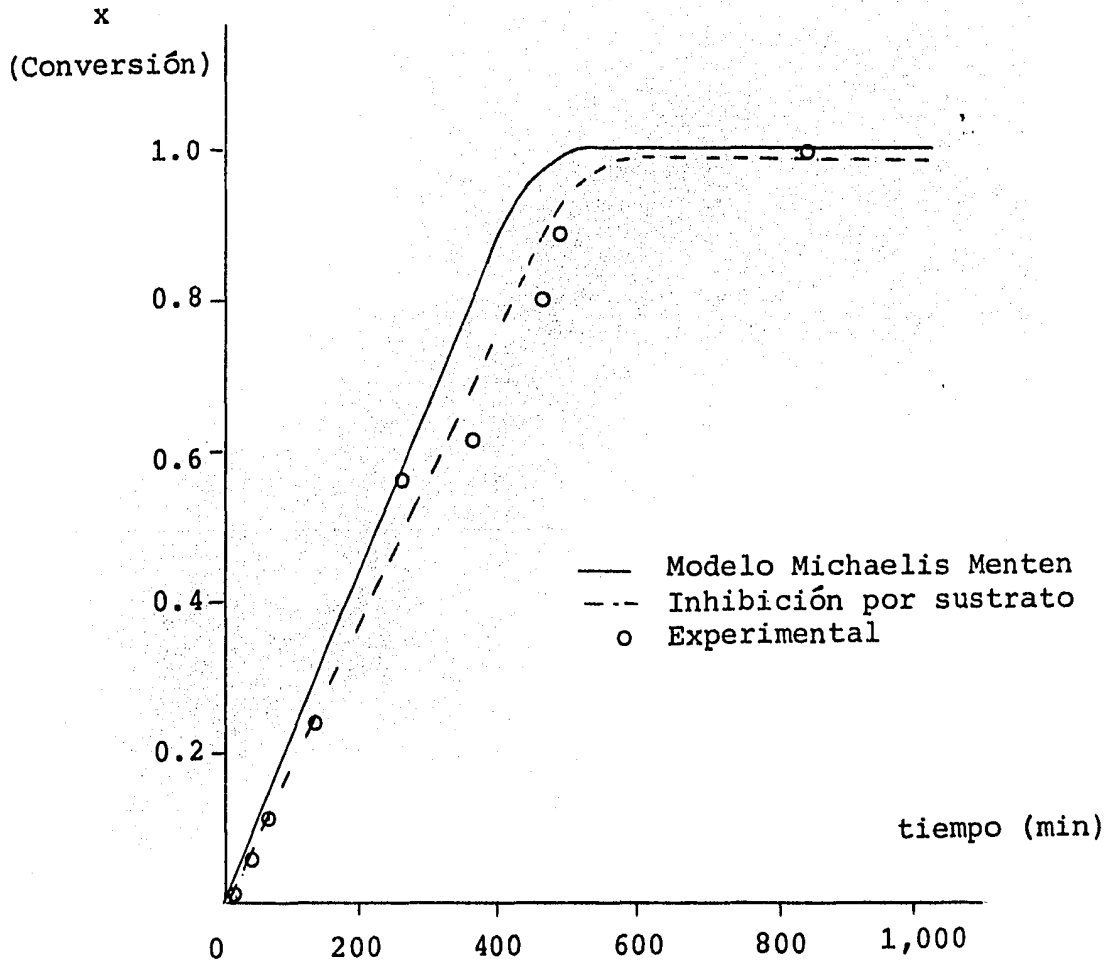


Fig. IV-10b.- Comparación de los puntos experimentales con la predicción teórica de los modelos de Michaelis Menten y de Inhibición por exceso de sustrato para una concentración inicial de sacarosa de 150 g/l.

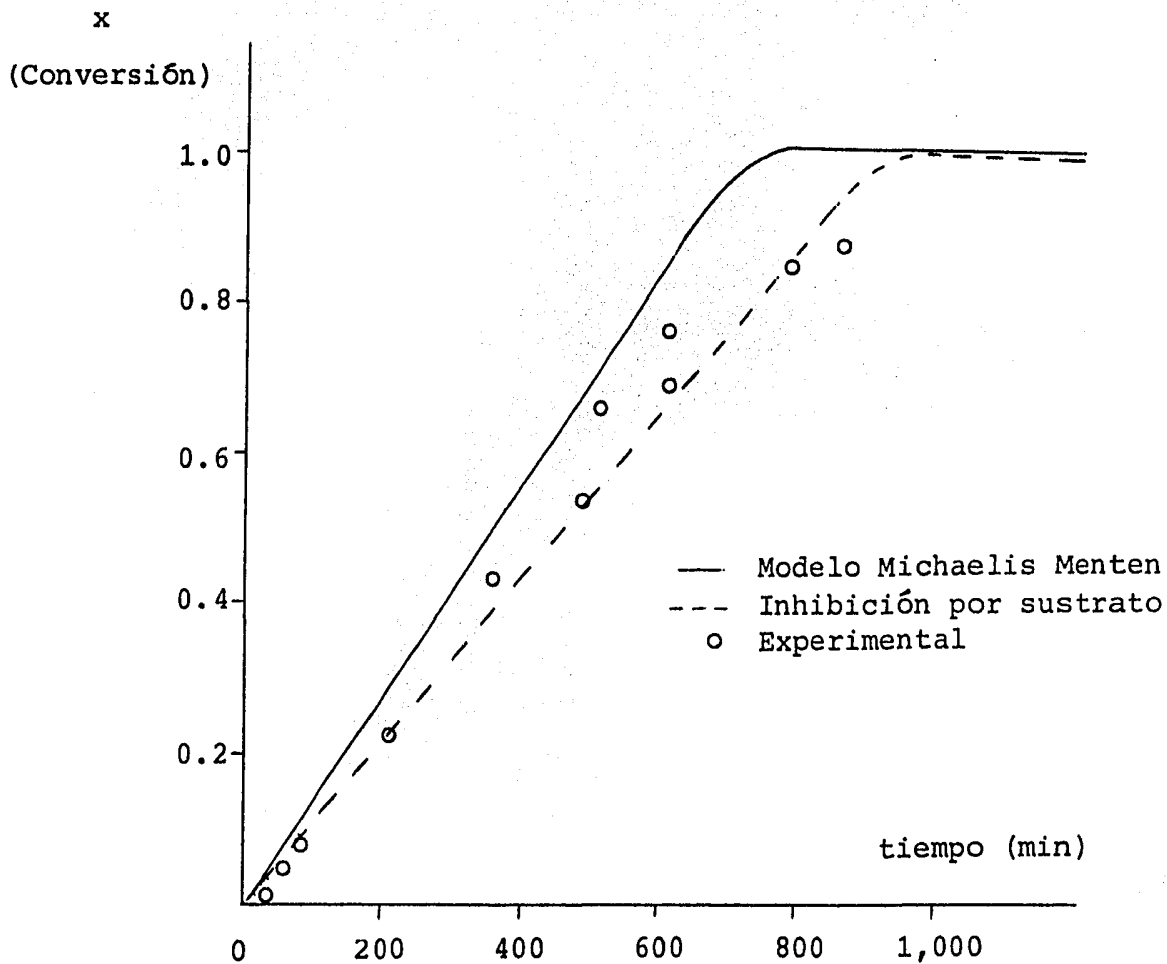


Fig. IV-10c.- Comparación de los puntos experimentales con la predicción teórica de los modelos de Michaelis Menten y de Inhibición por exceso de sustrato para una concentración inicial de sacarosa de 250 g/l.

debe existir un óptimo para el cual:

$$\frac{dP}{dS_0} = 0 \quad (\text{Ec. IV-16})$$

Sustituyendo el tiempo de reacción, por el que predice el modelo de inhibición por exceso de sustrato se obtiene:

$$P = \frac{S_0 x V_{\text{máx}}}{t_{\text{muertos}} V_{\text{máx}} + K_m \ln(1-x)^{-1} + S_0 x + \frac{K_i S_0^2}{2} (2x-x^2)} \quad (\text{Ec. IV-17})$$

Derivando esta expresión con respecto a S_0 y despejando el valor de esta concentración inicial, se obtiene:

$$S_0 \Big|_{P_{\text{máx}}} = \sqrt{\frac{t_{\text{muertos}} V_{\text{máx}} + K_m \ln(1-x)^{-1}}{\frac{K_i (2x - x^2)}{2}}} \quad (\text{Ec. IV-18})$$

Al sustituir los datos obtenidos para los parámetros cinéticos, considerando que los tiempos muertos (lavado, vaciado, etc.) son mínimos y para una conversión del 0.99, esta ecuación predice un valor de 150 g/l de sacarosa inicial para obtener una máxima productividad.

Estos resultados fueron verificados experimentalmente de la siguiente forma: En la ecuación IV-17 se sustituyeron los tiempos de reacción necesarios para alcanzar la máxima conversión provenientes de las corridas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato. En la Fig. IV-11 puede constatarse, que en efecto, una concentración inicial de 150 g/l resulta en una máxima productividad.

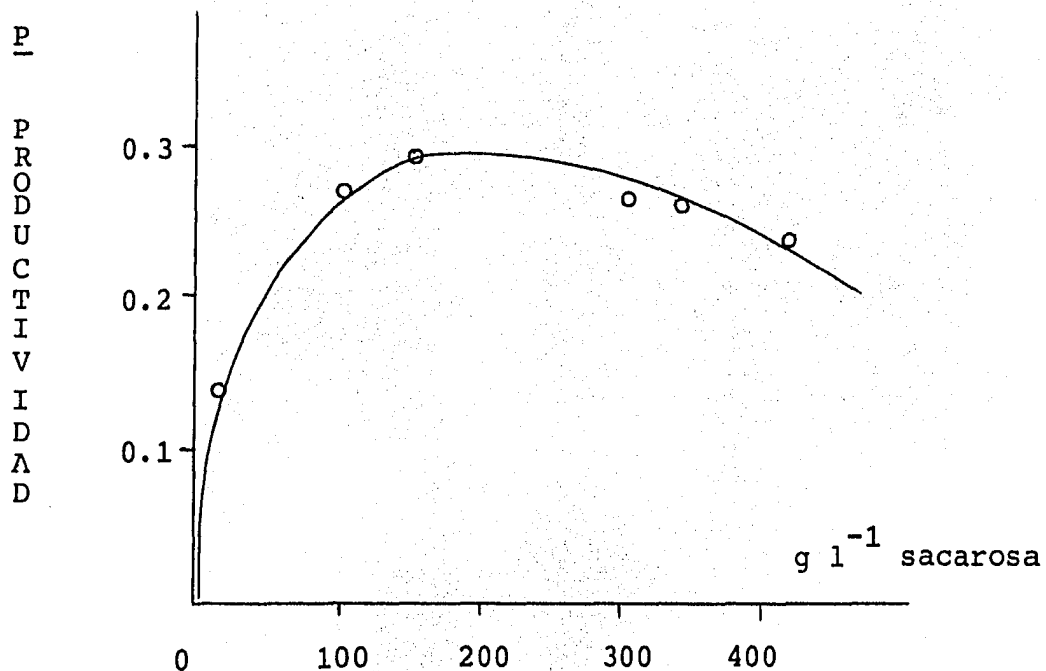


Fig. IV-11.- Comprobación experimental de la concentración de sacarosa necesaria para una máxima productividad.

PRODUCCION DE DEXTRANAS DE INTERES FARMACEUTICO

A partir de dextrana nativa se obtuvieron productos de interés farmacéutico mediante una hidrólisis con ácido sulfúrico y una posterior fraccionación con alcohol etílico (Sohns et al., 1954).

-Selección de la concentración de enzima para la síntesis de dextrana nativa.- Es posible demostrar que en términos de productividad, P, la cantidad de dextrana nativa producida por unidad de tiempo y por unidad de volumen es independiente de la actividad enzimática empleada en la síntesis. Esta situación se ilustra en la tabla IV-I

De la misma tabla se desprende que a mayor dilución mayor cantidad de dextranas podrán ser producidas por litro de solución de enzima preparada por fermentación.

Ante esta situación se seleccionaron 40 UDS/ml considerando el efecto de limpieza que la dilución tiene sobre el medio, ya que los constituyentes de éste le confieren un color café oscuro, así como el tiempo de reacción.

-Hidrólisis de la dextrana nativa producida.- Una vez definidas las condiciones de producción de dextranas nativas, se efectuaron varias síntesis con el fin de estudiar y caracterizar el proceso de hidrólisis ácida:

Precipitación inicial. Una vez concluida la síntesis, la totalidad de dextrana sintetizada se precipita del medio mediante la adición de 46% de alcohol etílico, con el fin de llevar a cabo una primera limpieza del producto obtenido. La dextrana precipitada se redisuelve al volumen original, debido a que la concentración con que resulta de la síntesis es la más adecuada para la hidrólisis.

Los parámetros que afectan el proceso de hidrólisis son, además de la concentración inicial de dextranas, la acidez (pH) la temperatura y el tiempo.

	Actividad enzimática en la reacción (UDS/ml)	dilución (1/x)	tiempo de reacción* (hrs)	Sacarosa** (gr/lt)	$\underline{P} = \frac{S_0}{t}$
caso 1	20	1/8	9.79	1,200	122
caso 2	40	1/4	4.9	600	122
caso 3	80	1/2	2.45	300	122
caso 4	160	1	1.23	150	122

* Según modelo de inhibición

** Cantidad de sacarosa que puede transformarse
al diluir 1/x el medio original con 160 UDS/ml

Tabla IV-1.- Selección de la concentración enzimática para
la síntesis de dextrana nativa en base a la
productividad \underline{P} , tiempo de reacción y pureza
del líquido enzimático.

Se fijaron, de acuerdo a reportes en la literatura, solubilidad del producto y otras experiencias previas, las siguientes condiciones:

Concentración inicial
de dextranas nativas = 6-8%

$T (^{\circ}\text{C}) = 80$

pH = 1

Una vez definidas estas condiciones, se procedió a determinar el tiempo de hidrólisis, para lo cual fué necesario el desarrollo de una técnica de control y cuantificación del peso molecular de las fracciones obtenidas.

-Cromatografía líquida de alta presión.- La técnica está descrita en el Cap. III (Materiales y Métodos) y en la Fig. IV-12, se muestran los diagramas de elución de los estándares 70,000, 40,000 y 10,000 así como el obtenido para una muestra de la dextrana importada por Fisons de México, S. A. para la fabricación de Fe-dextrana.

De estos resultados es posible correlacionar el peso molecular promedio, con el volumen de elución. Esta relación se muestra en la Fig. IV-13.

Una vez disponible esta metodología de control, se procedió a la hidrólisis en las condiciones antes descritas. Se tomaron muestras durante cada hora a partir de la segunda hora de reacción y hasta la octava para determinar el tipo de productos obtenidos.

Las muestras fueron precipitadas totalmente (60% etanol v/v) y analizadas en HPLC.

De estos resultados se concluyó que el tiempo crítico de hidrólisis para la obtención de las fracciones de interés clínico se encontraba entre las 4 y 5 horas, estando estos límites fuera de lo óptimo, es decir a las 4 horas los productos

Flujo de la fase móvil = 1.0 ml/min

Índice de refracción = 8

Velocidad del papel en el registrador = 10 mm/min

Volumen de inyección = 20 microlitros

Concentración de dextrana = 2% (10, 40 y 70,000)
1% (Fisons)

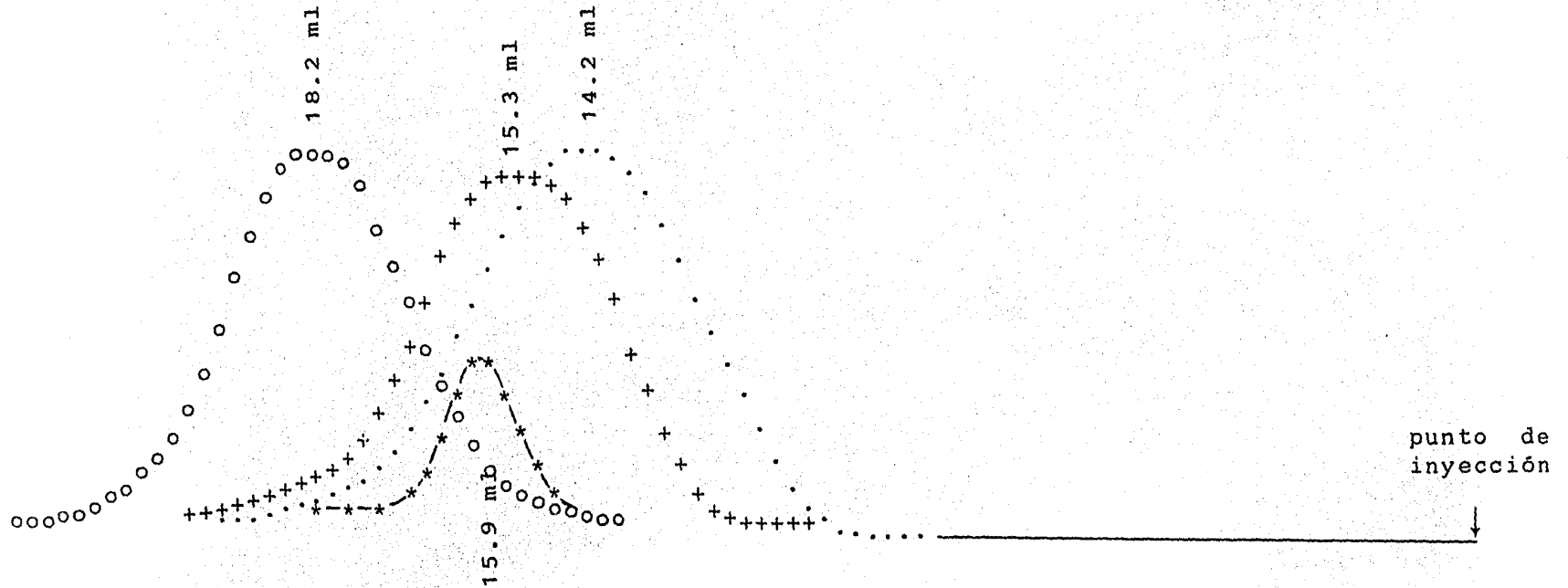


Fig. IV-12.- Diagramas de elución de los estándares de Pesos Moleculares 10,000 (ooo), 40,000 (+++), 70,000 (...) y de la dextrana destinada a la fabricación de Fe-dextrana (Fisons de Mexico, S. A.)(*-*-*).

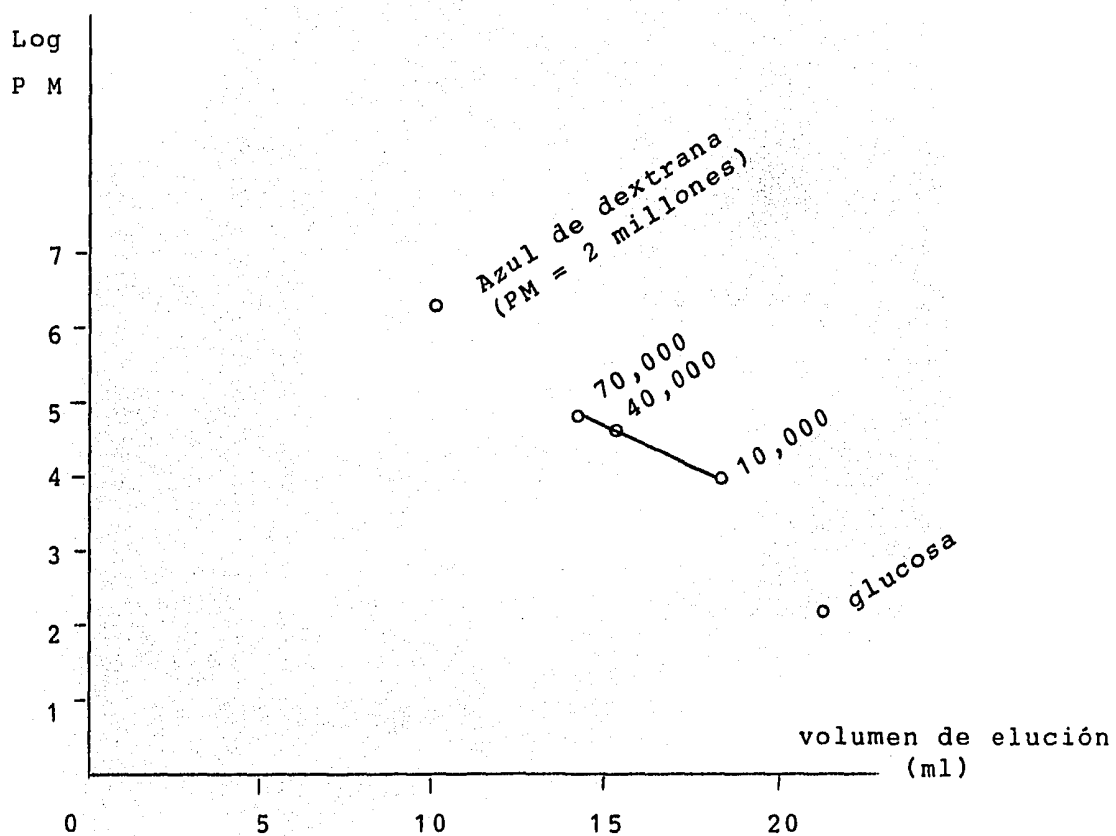


Fig. IV-13.- Relación entre el peso molecular y el volumen de elución.

Los límites de exclusión están dados por el azul de dextrana (volumen muerto) y por la glucosa (volumen total).

son aún relativamente grandes, mientras que a las 5 horas la presencia de oligosacáridos es considerable.

Se procedió entonces a analizar una muestra tomada a las 4.5 horas. Se obtuvieron varias fracciones de dextranas por pre cipitación en los intervalos de:

23 a 40% v/v de etanol	(muestra A)
40 a 50% "	(muestra B)
sobrenadante	(muestra C)

Los rangos fueron reducidos con respecto a los mencionados en el Cap. III para los estándares, con el fin de evitar altas dispersiones en la distribución de pesos moleculares. Los diagramas de elución de estas tres fracciones se muestran en la Fig. IV-14.

El balance de materia durante este proceso, se muestra en el diagrama de flujo de la Fig. IV-15.

Pueden observarse las siguientes conclusiones:

- * Con respecto a la dextrana nativa antes de la hidrólisis, un 23.6% es obtenido como dextrana de peso molecular promedio igual a 70,000. Fracción que puede ser empleada como expansor del volumen sanguíneo conocida como dextrana clínica.
- * El 25.3% de la dextrana original es obtenida en la fracción con peso molecular promedio de 40,000, que de acuerdo a los análisis, puede ser empleada en la formulación del complejo hierro-dextrana.
- * El 19.7% es obtenido como dextrana de peso molecular entre 10,000 y 40,000.
- * El rendimiento global en productos de interés farmacéutico, resulta ser entonces del 48.9%.
- * Las distribuciones son en lo general adecuadas para la formulación de los productos.
- * El rendimiento es superior a los reportados en la li-

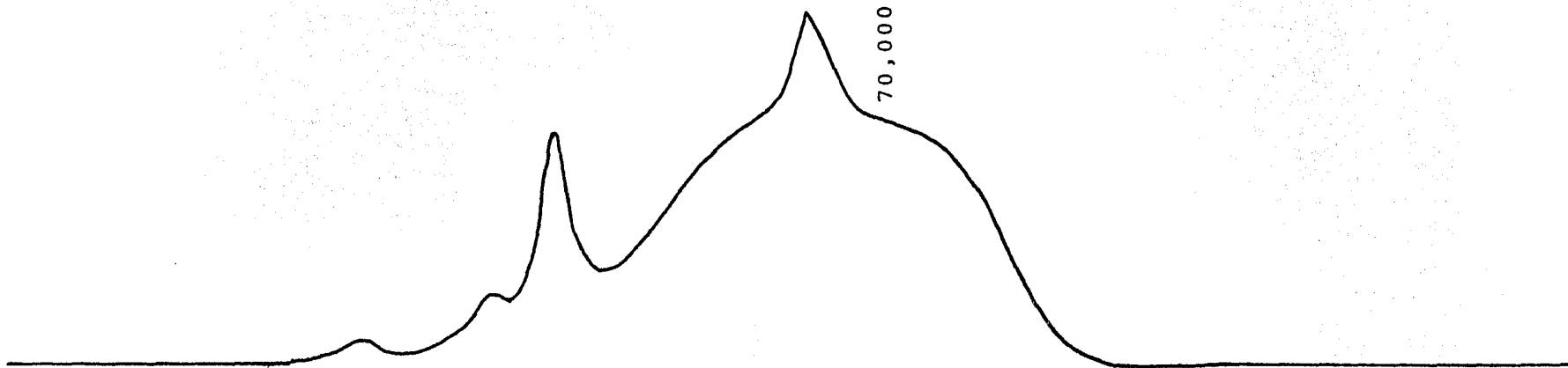


Fig. IV-14a.- Diagrama de elución de la fracción que precipita del 23 al 40% de EtOH después de 4.5 hrs. de hidrólisis.

(Muestra A)

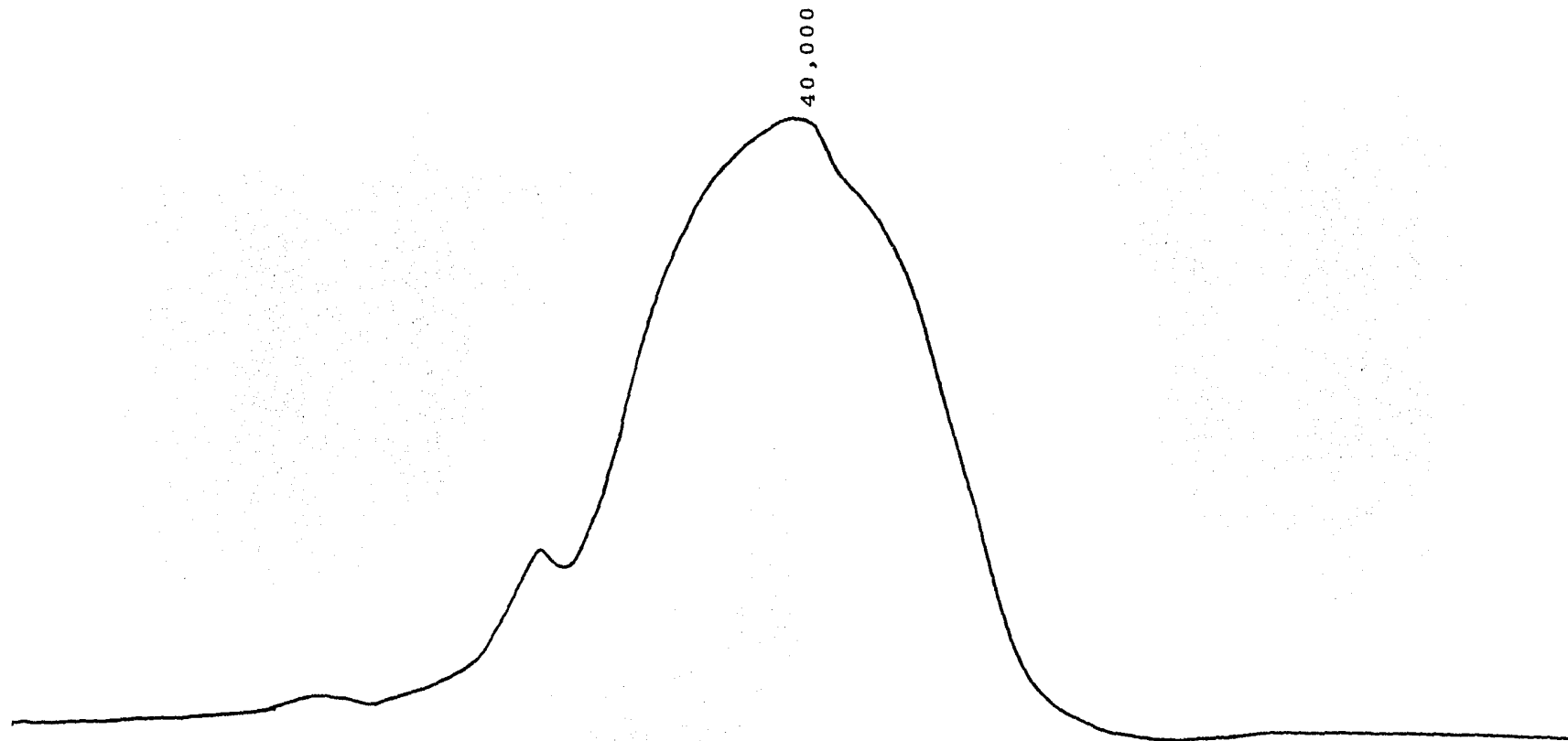


Fig. IV-14b.- Diagrama de elución de la fracción que precipita del 40 al 50% de EtOH después de 4.5 hrs. de hidrólisis.

(Muestra B)

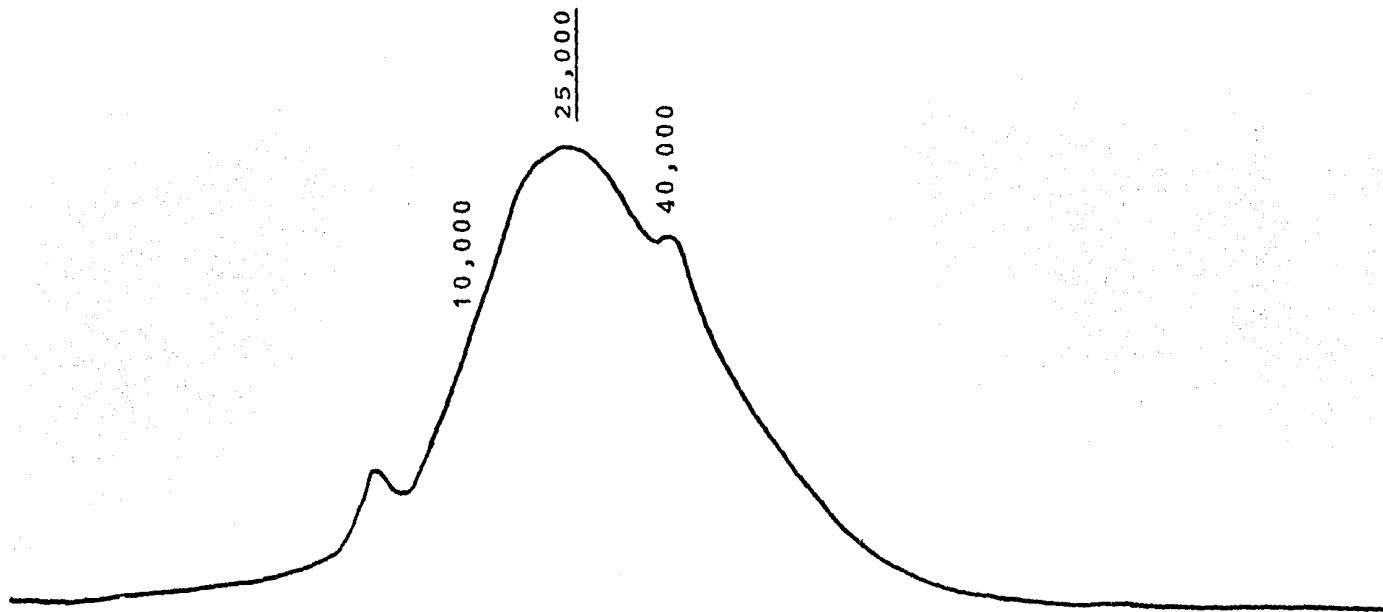


Fig. IV-14c.- Diagrama de elución de la fracción que sedimenta del sobrenadante con 50 % de EtOH después de haber separado la fracción que precipita en el intervalo 40-50% de EtOH.

(Muestra C)

Dextrana nativa
 precipitada y redisuelta al
 7.11% (71.1 g/l)

Se hidroliza con H_2SO_4 a pH=1
 y T = 80°C durante 4.5 h

Se filtra

Se añade EtOH hasta el 40%

Precipitado

Se redisuelve en agua
 al volumen original
 Se añade EtOH hasta
 el 40%

Sobrenadante

Precipitado

Se lava
 y
 deshidrata

Fracción clínica
 70,000
 15.5 g

Destinado a la preparación
 de un sustituto o expansor
 del volumen sanguíneo

Sobrenadante

Se añade EtOH
 hasta 50%

Precipitado

Sobrenadante

Se redisuelve en agua
 al volumen original
 Se añade EtOH hasta
 el 50 %

Precipitado

Sobrenadante

Se lava
 y
 deshidrata

Fracción clínica
 40,000
 18.0 g

Destinado a la síntesis
 de Fe-dextrana

Fig. IV-15.- Esquema cuantitativo de la producción de dextranas de magnitud clínica a partir del producto nativo reprecipitado.. (Tratamiento para un litro)

temperatura (Sohns y Rogovin, 1954, obtuvieron 38% de la fracción 70,000 y 0% de la fracción 40,000).

DISEÑO Y CARACTERIZACION DEL PROCESO

En la Fig. IV-16 se representa el diagrama de bloques del proceso a nivel laboratorio para la obtención de las fracciones clínicas 40,000 y 70,000.

Las operaciones a nivel industrial serían las mismas.

A continuación se presenta, a manera de ejercicio, el esquema numérico de cuales serían los requerimientos de materia prima y de equipo tomando, arbitrariamente una producción mensual de:

	1 tonelada de dextrana nativa
472	Kg de fracción 70,000
506	Kg de fracción 40,000

Estas cantidades se fijaron con base en los rendimientos obtenidos.

Dicho análisis se efectuaría en forma similar una vez efectuado un estudio de mercado.

El calendario de actividades quedaría distribuido de la siguiente forma:

- | | |
|-----------------------|---|
| 1 ^a semana | Proceso de fermentación para la producción de 10,500 l de sobrenadante de fermentación con actividad de 160 UDS/ml. |
| 2 ^a semana | Reacción con 3,500 l de enzima en un volumen total de 14,000 l al 15% de sacarosa para producir 1 ton de dextrana de alto peso molecular. |
| 3 ^a semana | Reacción en las mismas condiciones para producir 1 ton de dextrana e hidrolizarla para obtener 236 Kg de P.M.=70,000 y 253 Kg de P.M.=40,000. |
| 4 ^a semana | Igual a la tercera. |

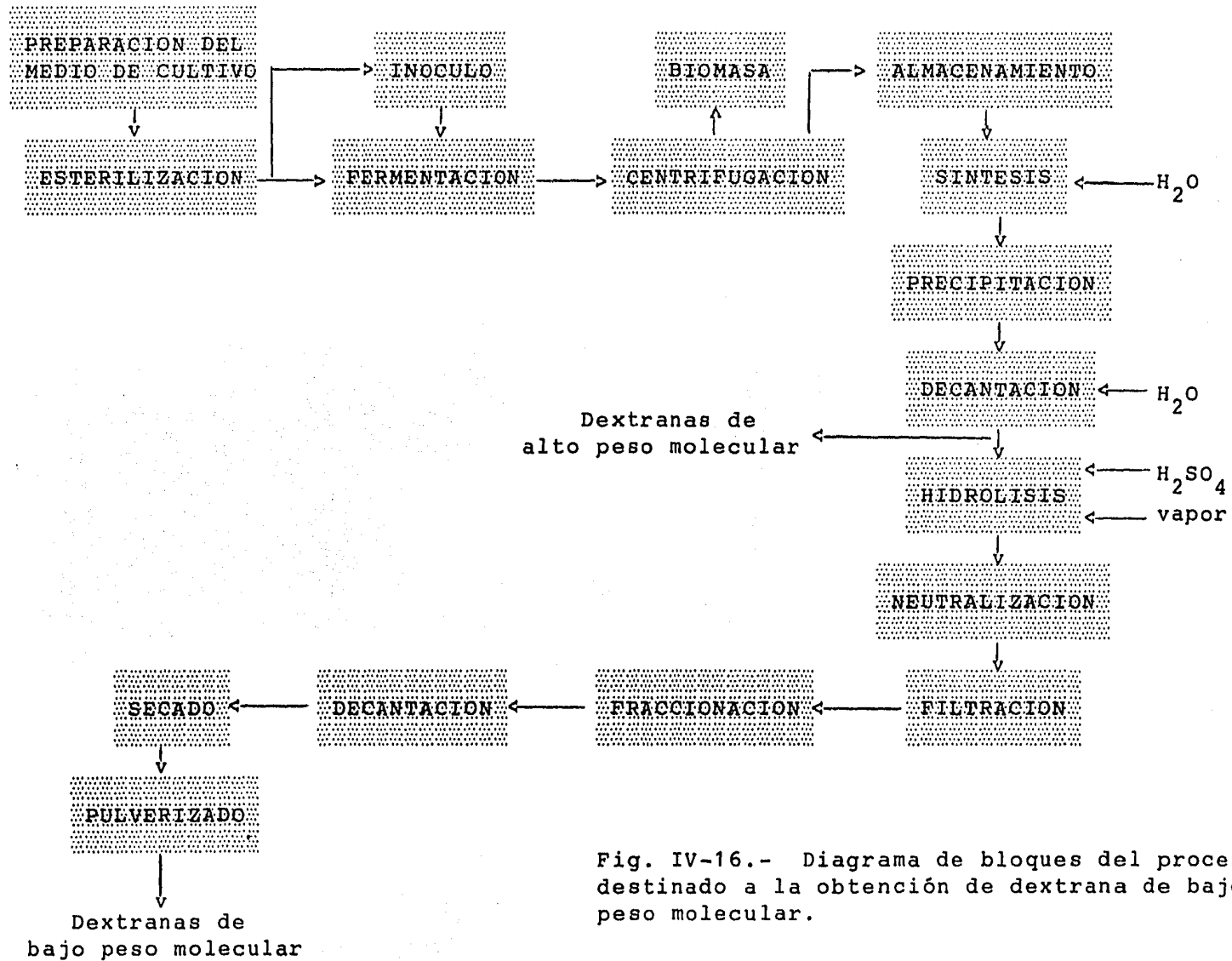


Fig. IV-16.- Diagrama de bloques del proceso destinado a la obtención de dextrana de bajo peso molecular.

En la Fig. IV-17 se muestra el diagrama de flujo del proceso a nivel industrial. Se describen las condiciones de operación así como los volúmenes de los recipientes para la capacidad supuesta.

En la tabla IV-2 se enlista el balance mensual de costos de materias primas para el proceso con el fin de determinar la contribución de este rubro al costo de producción, considerando que en los procesos biológicos es justamente la materia prima la que contribuye hasta en un 80% en los costos de producción. De dicha tabla pueden estimarse los costos de cada fracción obtenida:

$$\begin{aligned} \$/\text{Kg dextrana nativa} &= \frac{1/3 \text{ \$ fermentación} + 1/3 \text{ \$ síntesis}}{1,000 \text{ Kg}} \\ &= 311.98 \text{ \$/Kg} \end{aligned}$$

$$\$/\text{Kg f}_{70,000} =$$

$$\begin{aligned} &\frac{1/3 \text{ \$ fermentación} + 1/3 \text{ \$ síntesis} + 1/2 \text{ \$ hidrólisis}}{472 \text{ Kg}} \\ &= 729.95 \text{ \$/Kg} \end{aligned}$$

$$\$/\text{Kg f}_{40,000} =$$

$$\begin{aligned} &\frac{1/3 \text{ \$ fermentación} + 1/3 \text{ \$ síntesis} + 1/2 \text{ \$ hidrólisis}}{506 \text{ Kg}} \\ &= 680.90 \text{ \$/Kg} \end{aligned}$$

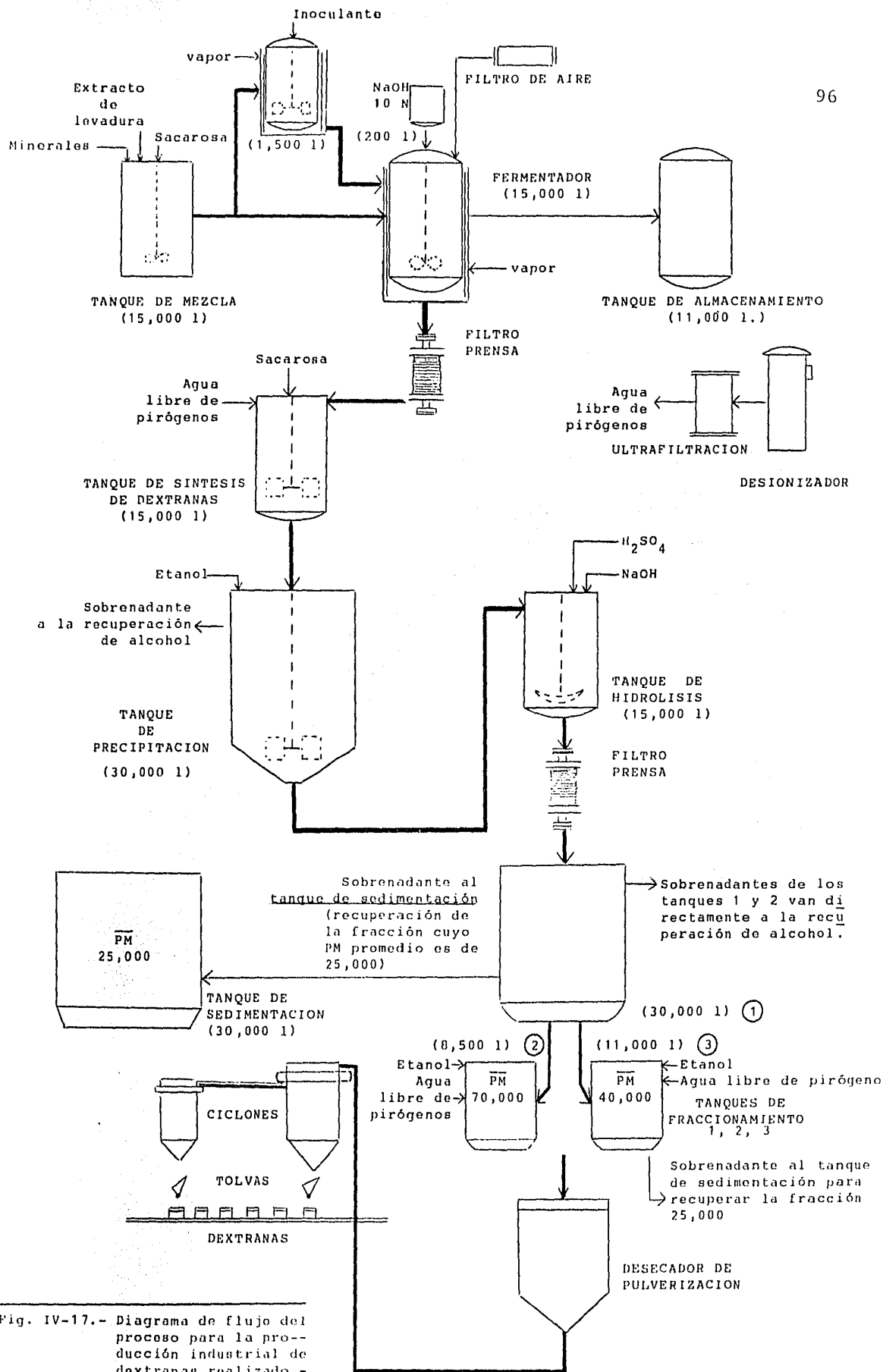


Fig. IV-17.- Diagrama de flujo del proceso para la producción industrial de dextranas realizado en base a las condiciones y resultados a nivel laboratorio.

SUSTANCIA	CANTIDAD REQUERIDA MENSUAL	COSTO POR UNIDAD (\$ (incluido IVA) (Febrero/85) (Grados industriales)	COSTO EN EL PROCESO (\$)
Sacarosa (Azúcar standard)	7,283.11 Kg	68,930.00/ton	502,024.98
Extracto de levadura	212.00 Kg	1,049,400.00/ton	222,472.80
K_2HPO_4	212.00 Kg	920,000.00/ton	195,040.00
$MgSO_4$	2.12 Kg	75.90/Kg	160.90
$FeSO_4$	0.10 Kg	49.45/Kg	5.24
$MnSO_4$	0.10 Kg	356.50/Kg	37.78
$CaCl_2$	5.27 Kg	776.25/Kg	4,093.94
NaOH	350.80 Kg	193,200.00/ton	67,774.56
H_2SO_4 (conc.)	362.29 Kg	26,105.00/ton	9,457.58
Alcohol etílico	100,076.24 l	178.25/l	se recupera
			<u>\$ 1,001,067.78</u>

Tabla IV-2.- Balance mensual de costos de materias primas necesarias para producir 1 ton de dextrana nativa, 472 Kg de fracción 70,000 y 506 Kg de fracción 40,000.

CONCLUSIONES

Fermentación

1.- El extracto de levadura Yestal-400 fabricado por Arancia Ingredientes Especiales S.A. de C.V., resulta de mayor eficacia con respecto al de Bioxon, debido a que con Yestal-400, Leuconostoc mesenteroides crece mejor y produce niveles enzimáticos más altos

2.- En lo referente a la fermentación retroalimentada, al escalar el proceso a un volumen de 14 l, se alcanzaron iguales niveles enzimáticos que en 0.5 l (160 vs. 170 UDS/ml). Al comparar estos resultados con los reportados por López (1980), para la fermentación retroalimentada en 3 l, se encuentra que prácticamente son los mismos (160, 170 UDS/ml vs. 180 UDS/ml).

Síntesis enzimática

1.- El modelo matemático elaborado describe adecuadamente el comportamiento cinético de la dextransacarasa considerando el efecto de inhibición que sobre dicha enzima ejerce el exceso de sustrato.

2.- De igual forma, la ecuación de diseño para un reactor agitado intermitente es apropiada ya que experimentalmente se comprobó el valor de la concentración de sacarosa que resulta en una máxima productividad calculada a partir de una expresión que se deriva de dicha ecuación de diseño.

Producción de dextranas de interés farmacéutico

1.- Con la técnica desarrollada en cromatografía líquida de alta presión para el análisis y cuantificación de dextranas hidrolizadas y fraccionadas, se pueden diferenciar las fracciones 70,000 y 40,000, que en peso molecular son aproximadas.

El tiempo necesario para el análisis de una muestra utilizando esta técnica no rebasa 20 minutos, comparado con el tiempo que se alcanza en los análisis en GPC.

2.- Trabajando con las mismas condiciones de temperatura y acidez en la hidrólisis, se obtuvieron las dos fracciones de interés en menos tiempo que el reportado en la literatura donde sólo obtienen la fracción de mayor peso molecular.

3.- Los rendimientos de dichas fracciones fueron en suma, mayores que los publicados en las fuentes de información.

Diseño y caracterización del proceso

Con la información obtenida a lo largo de la experimentación que implicó el presente trabajo queda definida la tecnología a nivel laboratorio para la producción tanto de dextranas de alto peso molecular así como de las fracciones de interés clínico.

Adicionalmente y a través del ejercicio de escalamiento efectuado, se establecieron los criterios necesarios para la definición de las condiciones del proceso a escala piloto e industrial.

Igualmente y a manera de ejemplo se estimaron los costos de producción de esta importante materia prima.

APENDICE

Simbología utilizada

- μ = velocidad específica de crecimiento
 x^* = concentración de células
 \bar{x}^* = concentración de células promedio
 t = tiempo
 S = concentración de sustrato limitante
 K_s = constante de Monod
 N = velocidad de agitación
 D_i = diámetro interno del impulsor
 v = velocidad inicial; velocidad de desaparición del sustrato por unidad de volumen.
 $V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima
 K_m = constante de Michaelis-Menten
 K_i = constante de inhibición
 V = volumen
 m = masa del sustrato
 m_t = masa total del sustrato
 x = conversión de sacarosa a dextrana
 ρ = densidad
 S_0 = concentración inicial de sustrato
 \underline{P} = productividad

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aiba S., Humphrey A. E. and Millis N. F.; Biochemical Engineering, second edition; University of Tokyo Press, 1973.
- 2) Alsop, R. M.; Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns; Journal of chromatography, vol. 246, No. 2 (1982).
- 3) Alsop, R. M.; Industrial Production of dextrans; Progress in Industrial Microbiology, vol. 18; Ed. M. E. Bushel; Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (1983); págs. 1-42.
- 4) Barker P. E. and Deeble R. E.; British Pat. 1,418,503 (1974).
- 5) Barker P. E., Ellison F. J. and Hatt B. W.; British Pat. 1,502,913 (1978).
- 6) Barker P. E., Ellison F. J. and Hatt B. W.; Industrial Engineering Chemistry, vol. 17, (1978); pág. 302.
- 7) Barker P. E., Hatt B. W. and Williams A. N.; Chromatography, vol. 11, (1978); pág. 487.
- 8) Barker P. E., Hatt B. W. and Vlachogiannis G. J.; Suitability of TSK-gel Toyopearl packing for the gel permeation chromatographic analysis of dextran; Journal of chromatography, vol. 208, (1981); págs. 74-77.
- 9) Basedow A. M.; Polymer Bull. vol. 2, (1980); págs. 337-342.
- 10) Basedow A. M.; Macromol. Chem., vol. 176 (1975); pág. 745.

- 11) Bergey D. H.; Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., (1974); Ed. R. E. Buchanan and Gibbons N. E.; Publ. Williams and Wilkens.
- 12) Charles, A. F. and Farrel L. N.; Preparation and Use of Enzymatic Material from *Pililacinum* to Yield Clinical Dextran; Can Jour. Microbiol., vol 3, (1957); págs. 239-247.
- 13) Chen Y. E. and Kaboli H.; En project. 1045; Eng. Res. Inst., Iowa State University Ames Iowa Final report, (1976); págs. 136-162.
- 14) Colin H. et Belval H.; Sur la constitution du dextrane; Compt. rend. acad. Sci. (Paris), vol. 210, (1940); págs. 517-520.
- 15) Ebert K. H.; Shenk S.; Fermentopolymerization III. Reindarstellung und charakterisierung von Dentransaccharase aus Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F; Naturforschg, 17b, (1962); 732-738.
- 16) Ebert K. H.; Shenk S.; Mechanisms of biopolymer growth: The formation of dextran and levan; Adv. in Enz., vol. 30, (1968); págs. 179.
- 17) Foster F. H.; Process Biochem., vol. 3 (1968); págs. 15-19 y 55-62.
- 18) Goodman A., Weil R. M. and Stern K. G.; On the mechanism of dextran formation, chromatographic studies with C¹⁴-labeled sugars; J. Biol. Chem., vol. 217, (1955); págs. 977-985.
- 19) Itaya K. and Yamamoto T.; Agr. Biol. Chem., vol. 39, (1975); págs. 1187-1192.

- 20) Hellman N. N. and Tsuchiya H. M.; Controlled enzymatic synthesis of dextran; Industrial and Engineering Chemistry, vol. 47 No. 8, (1955); págs. 1593-1597.
- 21) Jeanes A., Wilham C. A. and Miers J. C.; Preparation and characterization of dextran from Leuconostoc mesenteroides; J. Biological Chem.; vol. 176 (1948); págs. 603-614.
- 22) Jeanes A.; Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. 5, (1965), Academic Press; pág. 127.
- 23) Johnson M. K. and Mc Cleskey C. S.; J. Bacteriology, vol. 74, (1957); págs. 22-25.
- 24) Kaboli H. and Reilly P. J.; Biotech and Bioeng., vol 22 (1980); págs. 1055-1069.
- 25) Koepsell H. J. and Tsuchiya H. M.; J. Bacteriol., vol. 63 (1952); págs. 293-295.
- 26) Koepsell H. J. and Tsuchiya H. M.; Enzymatic synthesis of dextran; J. of Boil. Chem., vol. 200 (1952); págs. 793-801.
- 27) Kurt J. and Curt E.; A process for the production of dextran; European patent application, Pat. No. 87,404.
- 28) Lawford C. R., Kligerman A., Williams T.; Biotech. and Bioeng., vol. 21 (1979); págs. 1121-1131.
- 29) Lehninger A. L.; Bioquímica; Ediciones Omega, S. A., tercera reimpression; págs. 162-163 y 989-1000.
- 30) López Munguía C. A.; Production, Purificacion et Immobilisation de la Dextrana-saccharase de Leuconostoc mesenteroi

des; Tesis Doctoral, INSA Toulouse, Francia, (1979).

31) López Munguía C. A. and Monsan P.; Dextran synthesis by immobilized dextransucrase; *Biochimie*, vol. 62 (1980); págs. 323-329.

32) Mc Cabe M. M. and Smith E. E.; The dextran acceptor reaction of dextran sucrose from Streptococcus mutans KI-R; *Carbohydrate Research*, vol. 63 (1978); págs. 223-239.

33) Monsan P.; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 5 (1978); págs. 1-11.

34) Monsan P. and López Munguía C. A.; On the production of dextran by free and immobilized dextran sucrose; *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 23 (1981); págs. 2027-2037.

35) Neely W. B. and Hallmark J.; Dextran sucrose and the role of metal ions in enzyme catalysis; *Nature*, vol. 191 (1961); págs. 385-386.

36) Reese E. T. et al.; *J. Bact.* vol. 100 (1969); pág. 1151.

37) Robyt J. F. and Kimble B. K.; The mechanism of dextransucrose action; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 165 (1974); págs. 634-640.

38) Robyt J. F. and Taniguchi H.; The mechanism of dextran sucrose action; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 174 (1976); págs. 129-135.

39) Robyt J. F. and Walseth T. F.; The mechanism of acceptor reactions of Leuconostoc mesenteroides NRRL-B512F dextran sucrose; *Carbohydrate Research*, vol. 61 (1978); págs. 433-445.

- 40) Robyt J. F. and Walseth T. F.; Carbohydr. Res., vol. 68 (1979); págs. 95-111.
- 41) Rorem E. S.; J. Bact., vol. 70 (1955); págs. 691-707.
- 42) Schneider M. et al.; British Patent Appl. 2,079,290 (1980)
- 43) Smith J. M.; Ingeniería de la Cinética Química; Cia. Editorial Continental, S. A., cuarta impresión (1982); págs. 157-212.
- 44) Sohns V. E., Rogovin S. P., Conway H. F. y Langford C. T.; Pilot-plant Production of Clinical-sized Dextran by Acid Hidrolysis of the Enzymatically Synthesized High Polymer; U. S. Dept. Agr., Bur. Agr. and Ind. Chem., Mimeographed Circ. Ser., AIC; 372; junio (1954).
- 45) Somogyi J.; J. Biol. Chem., vol. 160 (1945); pág. 61.
- 46) Stavely H. E.; Clinical dextran composition; United States Patent Office; Pat. No. 2,708,174, (1955).
- 47) Summer J. B.; Dinitrosalicylic Acid; A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine; J. Biol. Chemistry, vol. 47 (1921); págs. 5-7.
- 48) Tsuchiya H. M. et al.; J. Bacteriol., vol. 64 (1952); pág. 521.
- 49) Tsuchiya H. M., Hellman N. N. and Koepsell H. J.; Factors Affecting Molecular Weight of Enzymatically Synthesized Dextran; J. Am. Chem. Sc., vol. 77 (1954); págs. 2412-2419.
- 50) Wieman R. L.; Preparing clinical dextran; United States Patent Office; Pat. 2,784,143, (1957).

51) Wolff I. A.; Fractionation of dextran products; United States Patent Office; Pat. 2,712,007 (1955).

52) Yost R. W., Ettre L. S. and Conlon R. D.; Practical liquid Chromatography; Perkin-Elmer, (1980).