

2ej - 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**SIMULACION Y MODELADO DEL PROCESO
PARA LA PRODUCCION INDUSTRIAL
DE DEXTRANAS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A
FRANCISCO ALVAREZ MEDINA

**DIRECTOR: M. EN C.
JUAN ALFREDO SALAZAR MONTOYA**

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN	pág. i
INTRODUCCION	ii
OBJETIVOS	x
CAPITULO I. GENERALIDADES.	
1. Antecedentes teóricos.	1
2. Antecedentes históricos.	13
3. Antecedentes técnicos.	21
CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE RESULTADOS.	53
CAPITULO III. DISCUSION Y CONCLUSIONES.	140
BIBLIOGRAFIA.	148
ANEXOS.	
1. Optimización de funciones.	
2. Teoría de decisiones.	
3. Listado de programas.	

SIMBOLOGIA UTILIZADA.

- u = 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_i = 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.
- \underline{x} = conversión de sacarosa a dextrana.
- ρ = densidad.
- S_0 = concentración inicial de sustrato.
- \underline{P} = productividad.

P R E S U M E N

El presente trabajo tuvo como objetivo general el optimizar cada uno de los aspectos técnicos para la implementación de un proceso para la producción industrial de dextranas.

Primeramente, se obtuvieron las condiciones más favorables de operación para la síntesis de dextranas obtenidas por vía enzimática. Se siguió el curso de reacción para la obtención del polímero, sin adición de sustrato ni control de pH para observar las ventajas en el control de los parámetros durante la síntesis de dicho polímero; comparándolo con aquellas fermentaciones que si la tenían.

Las variables que se utilizaron fueron: el volumen y la temperatura del medio de reacción, la concentración de sacarosa, el tipo de extracto de levadura y el pH para estudiar su influencia en la productividad de la síntesis de las dextranas. Las condiciones más favorables de trabajo en el equipo para obtener una máxima productividad de dextranas, dentro de los límites de Peso Molecular que nos importan por ser de interés farmacéutico (40000 - 70000) son:

Temperatura	26°C ± 1°C
Velocidad de agitación	300 rpm
Flujo de aire	2000 cm ³ /min
Concentración de sacarosa	150 g/lit alimentada
Tipo de extracto de levadura	Yestál 400

Se establecieron las condiciones de síntesis y se obtuvo un modelo matemático para el diseño del sistema de reacción.

Se diseñó el proceso en forma global estableciendo el diagrama de flujo para la producción industrial de dicho polímero, incluyendo los equipos necesarios para tal producción. La rentabilidad global de este proceso estuvo determinada por:

- a. Por el tiempo de hidrólisis para la obtención de las fracciones del polímero de interés clínico, que es el tiempo crítico que determina el mínimo para obtener dicha dextrana. Este tiempo fue de 4.5 hrs.
- b. Y el número de kilogramos producidos por mes para que la utilidad obtenida por el costo de elaboración de los productos fuera la máxima.

Dextranas de bajo P.M. 2 486 262 Kgs/mes

Dextranas de alto P.M. 1 836 600 Kgs/mes

- c. El rendimiento global de productos de interés farmacéutico fue del 48.9%.

Se realizaron diferentes simulaciones del proceso de fermentación, elaborando un programa de computadora con el fin de establecer un criterio de escalamiento y tener más información antes de experimentar en el sistema real a escala industrial. Para tal efecto se realizó una fermentación en volumen de 13.5 lts, con las mismas condiciones de proceso que las de volumen 0.5 lts, mencionadas anteriormente; obteniéndose un rendimiento de la enzima parecido, 160 contra 170 unidades de dextransacarasa por mililitro.

Se simuló la fermentación para comprobar el modelo obtenido en el desarrollo de este trabajo y comparándolo con los resultados experimentales se obtuvo un índice de correlación de 0.716.

I N T R O D U C C I O N

A pesar del hecho de que los alimentos son requerimientos básicos del hombre; la Ingeniería en Alimentos como actividad específica, es un desarrollo relativamente reciente.

Históricamente, la Industria de los Alimentos se ha dividido en áreas especializadas; exclusivamente para el manejo, distribución y conservación en estado natural de éstos, o en forma semiprocesada (enlatado, refrigeración, deshidratación). (27)

Los nuevos desarrollos en la Ciencia y la Tecnología de Alimentos se han adaptado al patrón ya establecido como complemento a las formas tradicionales, situación que ha frenado la influencia del énfasis reciente en principios y conocimientos básicos aplicables a Alimentos en general. (27)

Muchos de los procesos desarrollados hasta hace 10 años en el campo de la Ingeniería en Alimentos han sido implementados empíricamente y sus productos finales son ya tradicionales (productos lácteos, embutidos, mermeladas, harinas, pescado y carnes, ahumados, entre otros). Se tratan de procesos complejos que hasta ahora se están empezando a explicar en términos científicos. (4)

El papel que juega la Ingeniería de procesos en el campo de la Ingeniería en Alimentos, como los procesos más recientes: enlatado, esterilización y

congelación, se ajustan al análisis científico, por lo que el equipo y condiciones de proceso que se requieren pueden diseñarse con base en principios de Ingeniería rigurosos. (27)

La premisa fundamental es el conocimiento global que se tenga del proceso como también del control de sus variables y de la exactitud de sus mediciones.

Por tal motivo es la importancia del control de cualquier proceso; con esto, es posible diseñar y controlar con mayor eficiencia las operaciones de la Ingeniería en el procesamiento de alimentos, basándose en el conocimiento más completo de los cambios que ocurren en los alimentos los cuales son sometidos a cualquier proceso y de la representación adecuada entre las relaciones de los parámetros que rigen al mismo.

Por lo que esta ambivalencia hace que mientras más exacta sea la representación de los cambios que ocurren y mejor sea el conocimiento de las variables y sus formas de control, tanto mejor será la predicción y extrapolación a condiciones en el estudio de cualquier proceso en el campo de Alimentos.

A pesar de lo anterior, falta mucho todavía para que el papel del Ingeniero en Alimentos en el procesamiento de éstos, alcance al del Ingeniero Químico en la Industria de Proceso. Tal es parte de los objetivos de este trabajo, la de darle la importancia a la Ingeniería de Procesos en el procesamiento de alimentos; implementando en el campo industrial de una manera sistemática la investigación que profunde el conocimiento y el estudio de las variables

y su representación dentro del proceso global para que se tengan elementos de juicio en cualquier toma de decisión en lo concerniente al mismo.

La Industria de Alimentos está cambiando cada vez más en cuanto a tareas que le asigna el Ingeniero . Hay que esperar que este cambio también se refleje en la Investigación de áreas en la Ingeniería, ya que hasta la fecha no se le ha dado la debida importancia que tiene la Producción Industrial de Alimentos y la implementación de nuevos procesos con diferentes alternativas en campos aún no estudiados completamente, tales como la Biotecnología y la Bioingeniería. Tal debe ser la función social y comercial que tienen los mismos.

La nueva tecnología que ha surgido del uso de la fermentación a escala industrial y de la Biología Molecular, tiene implicaciones directas para la producción y procesamiento de Alimentos y por ende, para la Ingeniería en Alimentos.

La producción de polímeros por síntesis enzimática es un ejemplo de la interrelación entre la Biotecnología y la Ingeniería en Alimentos; y tomando en cuenta que la función del Ingeniero en Alimentos debe ser la de la creación de nuevos procesos tecnológicos y la innovación u optimización de los ya establecidos; el proceso de producción de Dextranas ofrece perspectivas de desarrollo sumamente amplias:

- a. La aplicación comercial de estos polímeros tiene grandes posibilidades; debido a las propiedades físicas tan extremadamente diversas que hacen posible la aplicación en diferentes industrias; como la

de alimentos, farmacéutica, cosmética, aceites y textiles, entre otras. (38)

- b. El control de las variables en el proceso de fermentación es complejo por diferentes razones. La complejidad de este proceso hace que este trabajo de investigación sea una herramienta para aumentar el grado de control de lo que ocurre dentro de un Bioreactor.
- c. A pesar de la complejidad del control de las variables del proceso, el objetivo del estudio de este proceso es el de tener el mejor control sobre la síntesis y las propiedades físicas de este polímero. Esto es posible gracias a que se pueden controlar en forma más precisa los factores que intervienen en la reproducción y crecimiento de los microorganismos, y que a su vez favorecen la producción del tipo de dextranas deseado. Así mismo, la posibilidad de usar diferentes microorganismos, ofrece la ventaja de poder obtener polímeros con propiedades físicas y químicas diferentes.

Todos estos factores determinan la importancia del estudio del proceso para la producción Industrial de Dextranas.

Por tanto, para los propósitos que pretende cubrir este trabajo de investigación, implica que el Ingeniero se involucra en el diseño y la predicción de cualquier proceso de fermentación, además debe de saber resolver problemas especiales asociados con la complejidad, la sensibilidad y la variabilidad de su bioproceso; por tanto debe de tener el conocimiento completo del control de las variables del mismo.

Es importante el establecimiento del modelo del proceso desde el punto de vista de control y la predicción. Además de que la rentabilidad económica del proceso global sólo se asegura en la medida en que se exija un cierto grado de optimización al conjunto. Y esto sólo será posible si se tiene un buen conocimiento del proceso a estudiar. (5)

También se pretende la adaptación de otras disciplinas a la Ingeniería. Como en el caso de este trabajo, las perspectivas que abre la aplicación de la informática para el manejo de variables múltiples y el procesamiento de datos complejos que permitirán el progreso en el campo del monitoreo y predicción; además, consecuentemente las pruebas exhaustivas de modelos y prototipos por simulación computarizada.

El objetivo primordial de este trabajo es poder representar una base de conocimientos en donde se tenga información específica de las relaciones y los hechos involucrados en el dominio del proceso de producción industrial de Dextranas; de una manera adecuada, de tal forma, que después puedan ser utilizados sin ambigüedades o pérdidas de información. Para ello existen diversas formas de representar el conocimiento de manera sistemática y bien definida.

El presente trabajo está dividido en tres partes:

La primera parte comprende el capítulo I, en donde se estudia principalmente los aspectos básicos necesarios para la conceptualización del modelado y la simulación de procesos. Además también comprende una visión general de los procesos de fermentación, que incluyen los antecedentes históricos de

las dextranas y los trabajos de investigación realizados hasta la fecha en la síntesis de dicho polímero; discutiendo los aspectos más importantes que definen las características del sistema sobre el cual se caracterizó el proceso. Se discuten además los aspectos involucrados en la rentabilidad del proceso, para su implementación industrial.

En la segunda parte se presenta la obtención del polímero en el laboratorio y el análisis de resultados; tanto en la obtención del modelo, como en la caracterización del proceso en forma global, la simulación del proceso comparándolo con los resultados experimentales obtenidos; así como la rentabilidad del proceso y los criterios tomados para la implementación de la producción industrial de dicho polímero.

La tercera parte y última, comprende la discusión y el análisis de los resultados experimentales obtenidos y la evaluación de las conclusiones de este trabajo, así como las perspectivas a futuro del mismo.

O B J E T I V O S

General.

Implementar un proceso para la obtención industrial de dextranas; optimizando las condiciones de operación para su síntesis, así como la rentabilidad global de dicho proceso.

Particulares.

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.
6. Desarrollar un control eficiente del proceso de producción de dextranas a los parámetros que determinan su óptima obtención.
7. Establecer los criterios necesarios para la definición de las condiciones del proceso a escala Piloto e Industrial.
8. Establecer con la simulación de este proceso una "prueba de prevención" para comprobar nuevas normas y reglas de decisión con el fin de manejarlo, antes de que se corra el riesgo al experimentar en el sistema real a escala industrial.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. ANTECEDENTES TEORICOS

Los antecedentes teóricos comprenden dos partes el Modelado y la Simulación de procesos, la primera se describe a continuación.

1.1.1. Modelado

a. Importancia del establecimiento de modelos.

La rentabilidad económica de cualquier proceso en forma global sólo se asegurará en la medida en que se exija un cierto grado de optimización al conjunto. Esto sólo será posible si se tiene un muy buen conocimiento del proceso a controlar. (5)

Los modelos matemáticos son útiles en investigación y desarrollo para determinar por ejemplo, los mecanismos de la cinética química, los parámetros de laboratorio o de planta piloto, o para explorar los efectos de condiciones de operación diferentes para estudios de optimización, etc.

Este tipo de modelos son también útiles en el diseño, para calcular el tamaño y arreglo del equipo de procesamiento para mejorar la dinámica, estudiar las interacciones de varias partes del proceso, evaluar estrategias de control, simular arranques, paros, situaciones de emergencia, entre otras.

Los modelos matemáticos son útiles también para resolver problemas de control y de procesamiento, ayudar en el entrenamiento del operador, estudiar los efectos y requisitos de proyectos de expansión.

Es normalmente más barato, seguro y rápido conducir los estudios anteriores sobre un modelo matemático que sobre una unidad de operación.

b. Aspectos básicos.

Un modelo es una representación de un objeto, sistema o idea en alguna forma diferente a la entidad misma. Su propósito es usualmente ayudar a explicar entender o mejorar un sistema.

Puede definirse entonces un modelo como una representación cuantitativa o cualitativa de un sistema. Esta representación debe mostrar las relaciones entre los diversos factores que sean relevantes para el análisis.

Desde el punto de vista científico, un modelo es un medio que se usa para generar conocimientos. Este método es la aplicación de la idea de observar al mundo y procesar esta información por medio de la mente humana con el objeto de extraer información de los datos de los experimentos realizados. Las observaciones se recogen en forma de frases de algún lenguaje elegido para ello.

La construcción de modelos es una de las tareas esenciales de la labor científ-

fica y tecnológica. De hecho, se dice que toda la ciencia no es sino la elaboración de un modelo de la naturaleza.

Los modelos se refieren a los fenómenos, es decir, los cambios espacio-temporales que sufren algunos atributos de interés para el investigador. En estos modelos se tienen entidades tales como espacio, tiempo y atributos, así como distribuciones espaciales de estos últimos en un instante dado, llamadas perfiles y variaciones temporales en estos perfiles.

Como se dijo, un modelo es un relato acerca del fenómeno de interés. El relato consiste en frases, que se relacionan para formar razonamientos. Todo esto requiere de un lenguaje del que formen parte dichas frases y con el que se pueden expresar los razonamientos. Con éste lenguaje se debe poder construir frases sin ambigüedad y construir razonamientos con facilidad; estas dos propiedades constituyen su sintaxis.

Se ha mostrado que un lenguaje muy apropiado para la descripción de modelos, de acuerdo a las características mencionadas, es la matemática.

c. Ventajas del Modelado

El modelado es de importancia en la ingeniería, porque permite estudiar el comportamiento de un sistema bajo diversas condiciones de operación, sin necesidad de construir el sistema y someterlo a las condiciones de operación real.

En ocasiones, se aplica la metodología del modelado al estudio de sistemas reales ya existentes, con el objeto de determinar cual será el futuro estado del sistema. Un ejemplo de esta aplicación es el empleo de modelos en la predicción de la actividad económica de un país. En otras ocasiones estos modelos se emplean para diseñar políticas de control de la actividad económica. En el primer caso resulta clara la necesidad del empleo de un modelo y en el segundo es demasiado costoso y peligroso experimentar con políticas de control sobre el sistema real.

También se emplean los modelos en el proceso de diseño. En estos casos, la construcción de prototipos para las diversas alternativas de diseño combinan do los procesos de modelación y simulación.

d. Objetivos y funciones de los modelos

El modelado, es decir, la construcción de modelos, es una metodología experimental y aplicada que tiene como objetivos:

- i) describir el comportamiento de los sistemas.
- ii) construir teorías o hipótesis que ayuden a la comprensión del comportamiento observado
- iii) usar estas teorías para describir comportamientos futuros

Se reconocen algunos usos comunes de los modelos:

- i) como ayuda para pensar

- ii) como ayuda para comunicarse
- iii) como una herramienta de predicción
- iv) como una ayuda para experimentación

Un modelo puede servir para dos propósitos fundamentales: uno descriptivo, para explicar o entender; y otro descriptivo, para predecir o duplicar las características de un comportamiento dado.

Resumiendo, debe notarse, en estos ejemplos, que la representación del prototipo, es decir, el modelo, cambia de acuerdo con la finalidad a la que se destinan. Entre las finalidades fundamentales que se persiguen al establecer un modelo pueden citarse:

- i) Describir el sistema y sus componentes
- ii) Describir el comportamiento del sistema ante diferentes estímulos
- iii) Visualizar aspectos de confiabilidad
- iv) Evaluar costos y eficiencias
- v) Visualizar tiempo y movimientos

1.1.2. Simulación de Procesos

a. Modelado y Simulación

Los aspectos más importantes del modelado de sistemas se estudiaron en el punto anterior. Hay que recordar que la utilidad de un modelo para el inves-

tigador consiste en la capacidad del modelo para representar el funcionamiento del sistema bajo las condiciones de las operaciones que se esperan en la realidad.

Un modelo formal, se emplea para predecir que va a suceder con determinadas variables en el futuro y bajo condiciones externas al sistema, diferentes a las que se han presentado hasta la fecha.

En cualquiera de los casos es necesario someter el modelo a acciones exteriores, es decir, hay que variar el valor de las variables exógenas al modelo. Esta simulación de los cambios de las variables exógenas, constituye el tema de este capítulo.

Puede decirse que la simulación es la operación del modelo, que se realiza con el fin de obtener información sobre el comportamiento del sistema, bajo las condiciones exteriores que se espera entre el prototipo. (59)

En resumen, puede decirse que la simulación consiste en operar el modelo de sistema durante un determinado tiempo, en forma análoga a como operaría el prototipo.

b. Definición de la Simulación

La simulación se define como una técnica numérica empleada para realizar experimentos con ciertos tipos de modelos matemáticos que describen el compor-

tamiento de un sistema complejo, en una computadora digital y durante períodos prolongados. El punto inicial de cualquier experimento de simulación en computadoras es un modelo del sistema que se va a simular; es decir, se supone que ya se ha formulado el modelo y que sus parámetros se definieron también. La principal diferencia entre un experimento de simulación y uno "real" es que, en primer caso, el experimento se lleva a cabo con un modelo del sistema real en lugar de hacerlo con el sistema propiamente dicho. (59)

c. El porque de la simulación

Para entender las razones que legitiman la simulación en computadoras como medio de análisis para modelos de sistemas económicos y de ingeniería se debe señalar una similitud obvia, pero muy importante, entre la simulación en computadora y varias técnicas analíticas normales tales como el cálculo diferencial, la programación matemática y el cálculo de variaciones. En general, la razón principal para usar cualquiera de estos medios de análisis, es la búsqueda de conocimientos científicos relacionados con el comportamiento de un sistema dado. Cuando se aplica a sistemas, el método científico sigue el procedimiento conocido de cuatro etapas: 1) la observación de sistemas, 2) la formulación de un modelo matemático que trate de explicar las observaciones del sistema, 3) la predicción del comportamiento del sistema tomando como base el modelo, utilizando deducciones matemáticas o lógicas, es decir, mediante la obtención de soluciones al modelo y 4) la realización de experimentos para comprobar la validez de dicho modelo. (57)

La simulación en computadoras se convierte en un medio esencial para analizar sistemas cuando no se puede llevar a cabo uno o más de los cuatro pasos del método científico. En otras palabras, la simulación puede hacer que sea posible realizar un tipo de cuasi experimento con sistemas de difícil realización y/o experimentación. (25)

Para estudiar primero la etapa de observación del método científico, con frecuencia será imposible o extremadamente costoso, observar el comportamiento real del sistema estudiado. Por ejemplo, es posible que un proceso no cuente con ciertos datos históricos.

Sin embargo se cuenta con la suficiente información para formular una hipótesis "significativa" respecto a las distribuciones de probabilidad de algunas de estas variables con respecto al tiempo o sobre los cálculos de sus tendencias con respecto al tiempo. En este caso, se puede utilizar una computadora para generar datos (pseudobservaciones) para el sistema de que se trate, basándose en las distribuciones de probabilidad supuestas o sus tendencias con respecto al tiempo. El investigador puede utilizar las pseudobservaciones para formular, manipular y probar modelos que describan el comportamiento del sistema como un todo. Esto es, simplemente se sustituyen los datos generados con la computadora en lugar de las observaciones reales del sistema.

Para estar seguros, en el segundo paso del método científico, se buscará evitar por completo la formulación de modelos matemáticos que describan el comportamiento de un sistema complejo, basándose exclusivamente en datos

simulados. No obstante, se puede atribuir una mayor seguridad a los modelos que se formularon con la ayuda de los datos recabados en observaciones científicas, complementadas por los datos simulados (en caso de carecer de éstos), a condición de que el modelo se someta a una comprobación estadística extensiva en el cuarto paso del método científico.

Con todo, el tercer paso de este método es el que proporciona la mayoría de las razones para utilizar la simulación en computadora como un medio de análisis. Aunque se puede formular un modelo matemático para describir un sistema que funcione en condiciones de incertidumbre, quizá no sea posible obtener una solución al modelo utilizando las técnicas analíticas comunes.

Los modelos de computadoras pueden hacerse tan complejos y tan realistas como lo permitan las teorías, ya que son innecesarias las soluciones analíticas de ellos. Se a cual fuere el grado de complejidad que tenga la formulación del modelo, las técnicas de simulación permiten encontrar sus consecuencias. Por tanto, las teorías se pueden vaciar en un modelo preciso sin distorsionar el significado encerrado en las teorías y se pueden determinar las descripciones del mundo que implican dichas teorías. (22)

Por último, puede ser imposible o muy costoso realizar experimentos para comprobar la validez de los modelos matemáticos que describen el comportamiento de un sistema. Evidentemente, este problema es sólo un reflejo del primero que se vió relacionado con la aplicación del método científico. En ambos casos no hay datos suficientes. En el primero, los datos disponibles para

formular hipótesis sobre el sistema eran insuficientes. Sin embargo, en el cuarto paso del método científico, el problema consiste en obtener datos numéricos para verificar el modelo matemático y sus soluciones.

En otras palabras, la simulación proporciona un medio para descubrir los efectos de las reglas de decisión alternativas sobre el comportamiento de cualquier evento de los límites de un experimento de laboratorio minuciosamente comprobado. Por supuesto, se puede argüir que se puede hacer lo mismo con técnicas analíticas más tradicionales; pero con la simulación en computadora se puede experimentar con más variables, más reglas de decisión, con modelos más complejos y modelos que sean muy similares al comportamiento real, todo esto se puede hacer a velocidades que hasta ahora no se habían alcanzado.

Aunque la razón principal para escoger la simulación en computadoras puede ser su capacidad para contrarrestar las dificultades antes mencionadas en la aplicación del método científico, existen otras que justifican el uso de la simulación. Es evidente que la mayoría de estas razones no se relacionan con la exposición anterior; pero de ninguna manera se excluyen mutuamente.

d. Objetivos en la simulación de sistemas y procesos (56)

- i) La simulación permite el estudio y la experimentación con instalaciones internas complejas de un sistema dado, ya sea que se trate de una compañía, una industria, un sistema económico o cualquier sistema de éstas.

- ii) Mediante la simulación se puede estudiar los efectos de ciertos cambios de información, organización y ambientales en el funcionamiento de un sistema, haciendo alteraciones en el modelo de dicho sistema y observando los efectos que los cambios tienen en su comportamiento.
- iii) La observación minuciosa del sistema simulado puede llevar a una mejor comprensión de dicho sistema y a hacer sugerencias que lo perfeccionen y que de otra manera no se podría obtener.
- iv) La simulación se puede emplear como dispositivo pedagógico para proporcionar a estudiantes y practicantes habilidades básicas en análisis teóricos, estadísticos y toma de decisiones.
- v) La experiencia en el diseño de un modelo de simulación en computadora puede ser más valiosa que la simulación propiamente dicha. Los conocimientos obtenidos al diseñar un estudio de simulación sugieren a menudo cambios en el sistema simulado. Los efectos de estos cambios se pueden comprobar después mediante la simulación, antes de aplicarlos al sistema real.
- vi) La simulación de sistemas complejos puede ayudar a incrementar los conocimientos sobre que variables son más importantes que otras dentro del sistema y su forma de interacción.
- vii) La simulación se puede utilizar para experimentar con situaciones nuevas sobre las que se tengan pocos datos o ninguno a fin de estar preparados para lo que pueda suceder.
- viii) La simulación puede servir como una "prueba de prevención" para comprobar nuevas normas y reglas de decisión con el fin de manejar un sistema, antes de que se corra el riesgo al experimentar en el sistema real.

- ix) Para ciertos tipos de problemas estocásticos, la secuencia de los sucesos puede ser de vital importancia. Es posible que la información sobre los valores y los momentos esperados no sea suficiente para describir el proceso. En estos casos los métodos de Monte Carlo pueden constituir la única forma satisfactoria de proporcionar la información requerida. (25)
- x) Es posible efectuar simulaciones tipo Monte Carlo para verificar las soluciones analíticas. (25)

1.2. ANTECEDENTES HISTORICOS

1.2.1. Polímeros e Hidrocoloides

Existe una clase de compuestos importantes comercial e industrialmente, llamados genéricamente gomas, que al disolverse o dispersarse en agua producen un efecto espesante y en algunos casos gelificante. En general estos compuestos son polímeros de carbohidratos y por lo tanto están formados por cadenas largas de alto peso molecular. (37)

Se han desarrollado un gran número de aplicaciones industriales para polímeros tradicionalmente extraídos de tejidos vegetales; semillas, frutos, árboles, algas y tejidos animales.

Las propiedades físicas tan extremadamente diversas de los polímeros de carbohidratos han sido aprovechadas en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosméticos, aceites y textiles entre otras. (37)

Los polímeros naturales han demostrado ser útiles en las distintas industrias donde tienen aplicación. Sin embargo, su extracción a partir de fuentes naturales ha presentado varios problemas, de entre los cuales destacan: (20)

1. Diferencias en la estructura de los polímeros obtenidos de una misma fuente debido a cambios en el proceso de su biosíntesis dentro del vegetal, y degradación química durante su extracción y procesamiento.

2. Variabilidad en las fuentes de suministro debido a condiciones de clima y factores económicos.

3. Difícil control en las propiedades físicas de los polímeros, lo cual provoca, que por ejemplo su habilidad para formar geles y dilatarse no sea reproducible aún bajo las mismas condiciones.

Para eliminar estas desventajas se ha recurrido a la producción de polímeros de carbohidratos por síntesis química. Esta fuente alternativa ha demostrado tener éxito ya que se han evitado los problemas inherentes al control constante de suministros, consistencia de propiedades y control en las propiedades físicas para un polímero deseado. (2)

Sin embargo, la gran limitante en este terreno ha sido la producción de polímeros potencialmente tóxicos y en algunos casos comprobadamente nocivos para la salud del ser humano. (3)

Existe entonces otra alternativa; la producción de polímeros de carbohidratos por fermentación microbiana.

Esta alternativa no es de ningún modo nueva, data de veinticinco años y ha tenido éxito debido a que ofrece una vía más controlable. Aunque esta vía no está tan bien definida como la de una síntesis puramente química, es superior a la extracción de polímeros a partir de fuentes vegetales y animales ya que se puede tener un mejor control sobre la síntesis y las propiedades

físicas del polímero. (2)

Esto último es posible gracias a que se pueden controlar en forma más precisa los factores que intervienen en la reproducción y crecimiento de los microorganismos, y que a su vez favorecen la producción del polímero deseado. Asimismo, la posibilidad de usar diferentes microorganismos ofrece la ventaja de poder obtener polímeros con propiedades físicas y químicas diferentes.

A pesar de tener más de veinticinco años de existencia, la industria de producción de polímeros por fermentación tiene amplias perspectivas de producción y mercado para nuevos polímeros.

1.2.2. Dextranas. Origen e Historia

El origen de las Dextranas se remonta al siglo pasado cuando aparecieron como compuestos contaminantes en la industria de la caña de azúcar.

Debido a la alta viscosidad del jugo contaminado se presentaban problemas de obstrucción de las tuberías y equipo de filtración durante el proceso. Asimismo, la cristalización del azúcar se obstaculizaba debido a la presencia de estos polímeros. (38)

Hasta ese momento nadie había imaginado que su presencia fuera causada por la invasión de microorganismos en el jugo de caña, y mucho menos se sabía qué tipos de éstos eran los responsables de tales problemas.

Fué hasta 1847 cuando Karl Scheibler (24), les asignó a éstos polímeros la fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ y les llamó "Dextranas" debido a su similitud con el almidón y las dextrinas. Un poco después en 1878, Ph. Van Tieghem descubrió que ciertas bacterias del género *Leuconostoc* eran las responsables de la formación de Dextranas en el jugo de caña, y fué el primero en afirmar que la sacarosa presente en el jugo era el punto de partida para la formación del polímero.

En 1930 G.J. Hucker y C.S. Pederson(24), clasificaron en Familia, Tribu, Género, y Especie a los microorganismos responsables de la producción de Dextranas. Las principales bacterias productoras de este polímero pertenecen a la Familia; *Lactobacilaceae*, Tribu; *Streptococceae*, Género; *Leuconostoc*, Especies; *mesenteroides* y *destranicum*.

Mucho tiempo después, se demostró que existen más de noventa y seis cepas distintas de microorganismos capaces de producir Dextranas (Jeanes et. al).(38) Entre las bacterias que producen estos polímeros están: *Leuconostoc mesenteroides* (más de setenta cepas distintas), *Leuconostoc destranicum*, *Betabacterium verniforme*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus bovis*.

Es obvio que las propiedades estructurales y las condiciones de cultivo varían de un microorganismo a otro cubriendo un amplio rango de variación.(3)

No obstante esto todas las Dextranas tienen una propiedad común; todas son homopolímeros de glucosa y en casi todas ellas el enlace predominante entre monómeros es del tipo 1-6 glucosídico.(34)

Las diferencias básicas entre polímeros se refieren a su solubilidad en agua y a la proporción que existe entre el enlace glucosídico α 1-6 con respecto a otros tipos de enlaces glucosídicos; α 1-3 y α 1-4 principalmente, que también pueden estar presentes en la cadena del polímero.

Entre 1937 y 1940 se hicieron los primeros estudios sobre la síntesis de Dextranas a nivel laboratorio. Fué entonces que se descubrió que estos polímeros podían usarse como substitutos del plasma sanguíneo. (15)

Aunque inicialmente cada país utilizó microorganismos diferentes, al inicio de 1952 prácticamente todas las empresas utilizaban la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 utilizada por los Estados Unidos. (67)

1.2.3. Aplicación y usos de las Dextranas

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

Con respecto 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 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.

A continuación se enlistan algunos usos:

a. De la Dextrana Nativa

En alimentos:

- Estabilizador y espesante 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

Otros usos:

- 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

b. De las Dextranas Fraccionadas

-Sustituto o expansor del volúmen del plasma sanguíneo

-Mejorador del flujo sanguíneo

-Complejo hierro-dextrana

-Dextran-hemoglobina

-Dextran-sulfato con anticoagulante

c. Otros

Dextranas activadas:

.Oxidación o polialdehído-dextrana con periodatos

.Preparación de azica-dextrana

.Activación por cianatos orgánicos a imido carbonato de dextrana

.Preparación de bromo-hidroxi-dextrana vía bromo propil epóxido

Las dextranas de peso molecular 70,000 fue 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. Asimismo sucede con el de 40,000 que se utiliza como mejorador del flujo sanguíneo.(23)

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. (15)

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. (15)

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. (24)

1.3. ANTECEDENTES TECNICOS

1.3.1. Fuentes de obtención de las Dextranas

a. Síntesis enzimática de las Dextranas

La síntesis de las Dextranas se lleva a cabo a través de la acción de una enzima llamada genéricamente Dextranasa, sobre el disacárido sacarosa.

Dicha enzima se encuentra en el medio de fermentación disociada de las bacterias en crecimiento. De hecho a través del crecimiento bacteriano se obtiene la enzima como producto de la fermentación. (3)

Para la producción de Dextranas se puede recurrir a varios métodos: (2,3)

1. Producción del polímero conjuntamente con la enzima durante el crecimiento del microorganismo.
2. Producción de la enzima y posterior producción del polímero en presencia del microorganismo.
3. Producción de la enzima, separación del microorganismo y producción posterior del polímero en el medio fluido donde originalmente se produjo la enzima.

El primer método fue el primero en usarse para producir el polímero y era el método convencional. Sin embargo, tiene varias desventajas ya que el crecimiento de las bacterias, la producción de la enzima y la síntesis del polímero se llevan a cabo bajo un mismo tipo de condiciones del medio de fermentación. Puesto que las condiciones cambian durante el curso de la misma, son sólo

transitoriamente óptimas para cualquiera de las tres etapas.

El segundo método permite la producción del polímero bajo condiciones de mayor control que el anterior y es industrialmente factible.

El tercer método es el más conveniente ya que permite obtener un polímero más puro y con características más controladas debido a que, previo a su producción, puede purificarse y concentrarse la enzima.

Se ha obtenido una gran cantidad de dextranas sintetizadas por bacterias de los géneros Streptococcus, Streptobacterium mesenteroides y dextranicum, tribu Streptococcaceae, familia Lactobacillaceae. Las dextranas pueden diferenciarse de los diferentes tipos de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$, $\alpha(1 \rightarrow 2)$, $\alpha(1 \rightarrow 3)$ y $\alpha(1 \rightarrow 4)$, así como por rotación específica, viscosidad intrínseca, solubilidad en agua y naturaleza del producto sólido, principalmente. En la Tabla 1.1 se muestra la composición de las dextranas de los diversos microorganismos capaces de sintetizarlas.(23)

Industrialmente se ha trabajado con varias cepas de Leuconostoc mesenteroides y en particular con la NRRL-B512F por su capacidad de producir dextrana conteniendo 95% de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$ y sólo 5% de enlaces de ramificación $\alpha(1 \rightarrow 3)$.(23)

- b. Fermentaciones y características del medio de cultivo para la producción enzimática

Microorganismo	% de residuos glucopiranosidos			
	isomaltosa $\alpha(1+6)$	maltosa $\alpha(1+4)$	nigerosa $\alpha(1+3)$	Kojibiosa $\alpha(1+2)$
Leuconostoc mesenteroides				
NRRL-B-512	95	-	5	-
NRRL-B-742S	64	8	28	-
NRRL-B-1299L	49	-	19	32
Streptococcus mutants				
OMZ 176	16	-	84	-
Ingbritt A	37.5	-	62.5	-
Streptococcus sanguis				
804	52	-	48	-
Complejo Tibi	90	1.5	8.5	-

Tabla 1.1 Composición de las dextranas producidas por diferentes microorganismos
López, 1979 (48)

Tsuchiya (70) descubrió los efectos de ciertos factores en el medio de cultivo sobre la producción de dextranasa de Leuconostoc mesenteroides. En primera instancia confirmó que la sacarosa es esencial para la producción enzimática. El organismo puede crecer en glucosa, fructuosa o maltosa contenidos en el medio, pero sin inducción de la dextranasa. 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 adecuados de dextrana con 0.25% de sólidos de remejo del maíz como medio de cultivo; sin embargo, al aumentarse 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 como se muestra en la Gráfica 1.1 a pesar de que a este pH la enzima es inactivada rápidamente a 25°C. Los iones NH_4^+ reducen el porcentaje de dextranasa, prefiriéndose 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 dextranasa)*. Hasta hace poco estas condiciones se consideraban como las óptimas para la producción de la dextranasa, sin embargo, los trabajos realizados por Schneider (32) y por López y Monsán (49) resultaron en niveles más elevados de dextranasa. En fermentaciones

* Véase sección 1.3.2 inciso k.

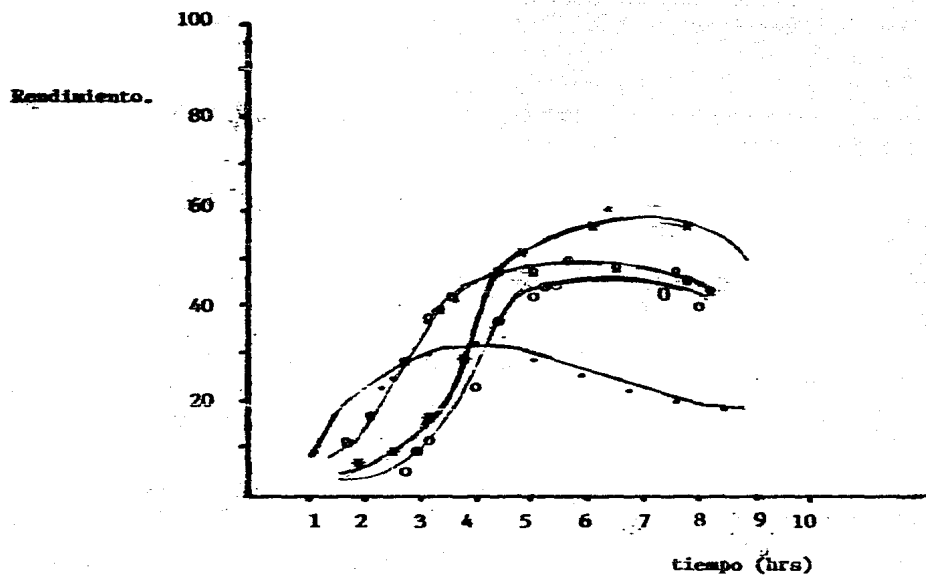


GRAFICO 1.1

Efecto del pH sobre los rendimientos
 Condiciones:

● pH = 4.1

□ pH = 4.4

* pH = 6.7

○ pH = 6.9

(Tsuchiya, 1952)

a gran escala basadas en el método que lleva su nombre, Scheneider(32) alcanzó a nivel laboratorio, un rendimiento de 300 UDS/ml, López y Monsan (49) 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.

1.3.2 Optimización del proceso de síntesis

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

a. El microorganismo

Leuconostoc mesenteroides (NRRL-B512F) forma parte 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. (38)

El crecimiento depende de un carbohidrato apropiado que es fermentado por

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). (2)

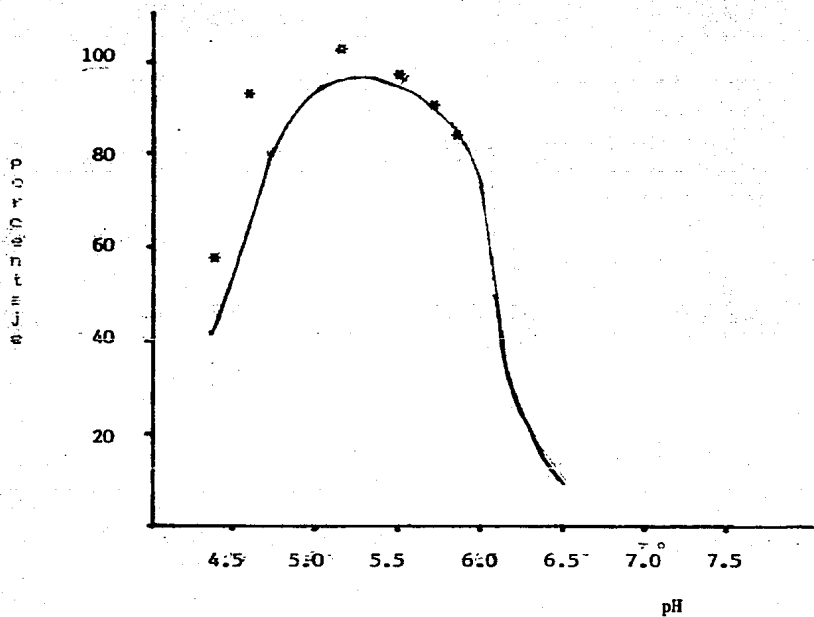
b. pH del medio de fermentación

Para establecer las condiciones óptimas de un pH en la producción de la enzima es necesario conocer la influencia del pH en la producción, actividad y estabilidad enzimática. Koepsell(44) 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 sin sustrato. 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 (2) se compara con los resultados obtenidos por Kaboli(40) como se muestra en la gráfica 1.2.

c. Temperatura



GRÁFICA 1.2

Dependencia de la actividad óptica con el pH. Se actividad α_D pH en solución de sacarosa 5 % p/v y 25 °C.
 Fuente: Alsea (1983), y Kaboli (1980).

La regulación de la temperatura durante la fermentación es también un parámetro crítico e independiente del pH, Koepsell (43) 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(10) 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 (3), sin embargo, resulta demasiado alto para una máxima producción enzimática. En la Gráfica 1.3 se representan las diferentes producciones obtenidas por Alsop(3) a 19, 23 y 27°C.

d. Aireación

Según Alsop(2), en el medio de cultivo del proceso de fermentación convencional no se requiere aireación. Foster (29) estableció que la aireación da un menor rendimiento en dextrana, sin embargo Koepsell (44) y Tsuchiya (70) notificaron que los niveles enzimáticos fueron más elevados en frascos agitados que en estáticos y Johnson(40) cuantificó los valores de crecimiento de diferentes cepas de Leuconostoc mesenteroides obteniendo resultados similares bajo las mismas condiciones.

Alsop(3) realizó el estudio del grado de aireación sobre las fermentaciones de producción enzimática.

De la Gráfica 1.4 Alsop concluyó que:

1. Con oxígeno puro y bióxido de carbono saturado el crecimiento concluye

rápídamente.

2. Con 0% de CO₂ y aireación del 50% se incrementa el crecimiento bacteriano.

e. Fuentes de Carbono

Las cepas de Leuconostoc mesenteroides utilizan un gran número de carbohidratos(8), 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 dextrana

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 (61). Alsoop⁽³⁾ 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 posteriormente la sacarosa fuera añadida para inducir la producción enzimática. Ninguno de estos experimentos fueron exitosos. Para un 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(61). Esto fue 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 (49) añadió 20 g/lh de sacarosa en la fase de crecimiento para maximizar el rendimiento enzimático. Los resultados de este experimento aparecen en la Gráfica 1.5.

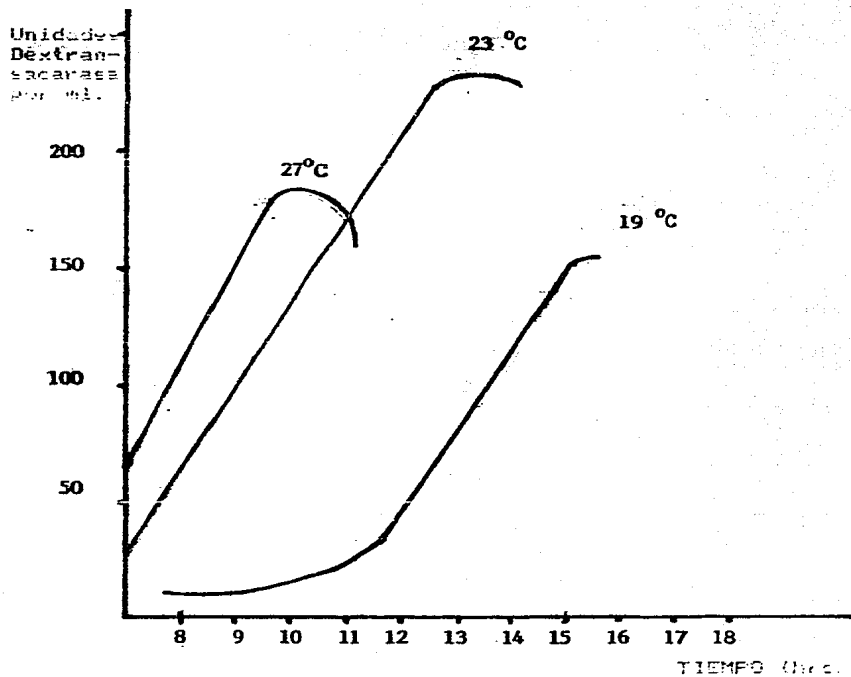
Si los niveles de sacarosa alcanzan el valor cero en cualquier instante durante la fermentación, la producción enzimática se ve considerablemente afectada. Lawford (1979) reportó una discontinuidad similar en un lote de actividad enzimática dentro de un sistema intermitente y aunque observó una rápida recuperación en la actividad de la dextranasa, sus rendimientos fueron bajos (6-7 UDS/ml).

Se muestra en la Gráfica 1.6 la variación de la actividad enzimática en función de la productividad celular (D.O. 599 nm) según Alsop(3) . 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.

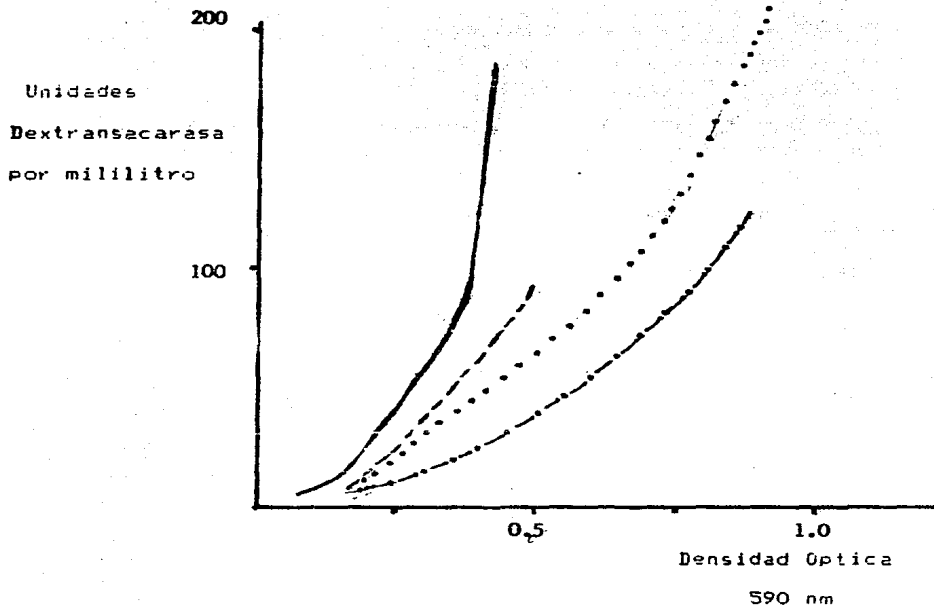
Dicho autor ha confirmado recientemente que el porcentaje de la enzima es proporcional a la concentración de sacarosa presente.

f. Fuentes de Nitrógeno y Factores de Crecimiento

Normalmente las fuentes de nitrógeno que se han utilizado para el crecimiento



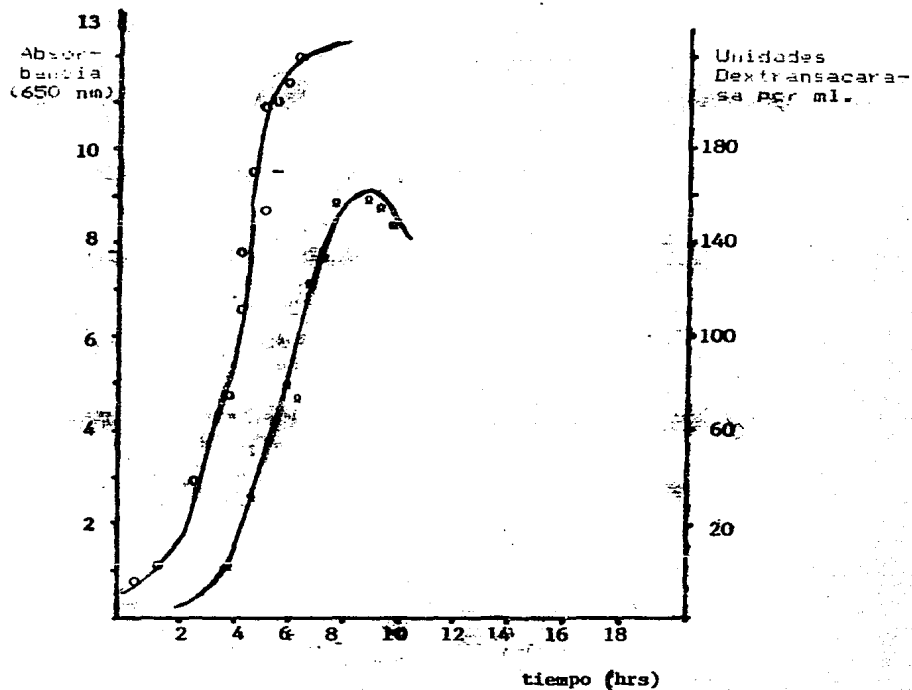
GRAFICA 1.3 Producción de enzima vs. tiempo a diversas temperaturas. pH = 6.7 (Alson, 1983).



GRAFICA 1.4

Aireación de la fermentación
 Rendimiento de enzima vs. crecimiento
 bacteriano. Condiciones:

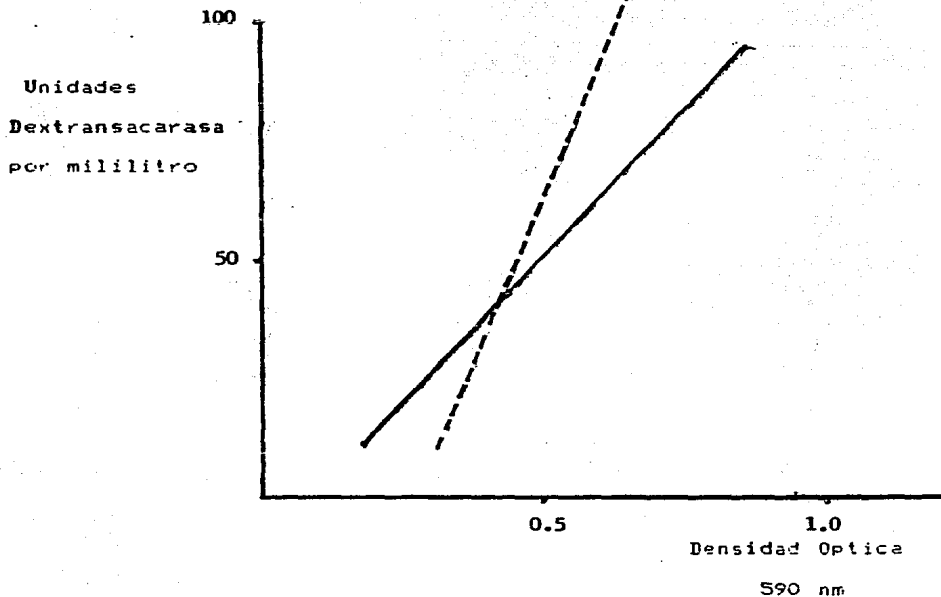
- O₂
- - - - CO₂
- con aireación
- . - . - sin aireación



GRAFICA 1.5

Producción de dextran-sacarasa por cultivo de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512.

Fuentes de carbono: Sacarosa 20 g/l con adición continua de una solución de sacarosa de 1 Kg/l a razón de 20 g/h.
(A. López 1979, 1980).



GRAFICA 1.6

Productividad celular en dos valores de adición de sacarosa. Rendimiento de enzima vs. crecimiento bacteriano Condiciones:

— 20 g/l de sacarosa al inicio de la fermentación.

- - - 5g/l de sacarosa al inicio de la fermentación y 15 g/l durante la misma.

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 (16) .

El nitrógeno en forma de iones NH_4^+ parece tener un efecto adverso en la producción de la enzima (69).

Alsop (3) 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 del medio fresco, no mejoró el crecimiento, concluyendo que la limitación de biomasa es causa de razones fisiológicas.

g. Fosfatos

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 (63) 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 dextran sacarasa.

h. 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 fue el primero en utilizarla (44). En años recientes se ha hecho hincapié en la importancia del calcio en la preparación y acción de la dextran sacarasa. Itaya (36) 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. ~~Otro~~ resultados negativos con otros iones. Se concluyó que la dextran sacarasa es una alcalino-térreo metalo-enzima. Robyt (62) reportó que la producción de dextran sacarasa 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 (39) y Tsuchiya (70) y considerablemente bajos respecto a los obtenidos por Schneider (32) en sus recientes trabajos donde no adicionó calcio a sus fermentaciones.

Kaboli (40) reportó que la estabilidad de la dextransacarasa purificada puede ser significativamente mejorada por la adición de Ca^{2+} . A pH 4.5 y $T = 27.5^{\circ}\text{C}$ aproximadamente el 70% de la actividad se perdió en soluciones carentes de calcio en 5 horas. La adición de Ca^{2+} en concentración de 50 mM reduce esta pérdida a 25%. Monsan (54) estableció que la presencia de 0.05% de CaCl_2 estabiliza las soluciones enzimáticas. A. López (49) demostró que el medio de fermentación preparado con 0.005% de CaCl_2 no presenta ninguna modificación 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 (38) demostró que la enzima es irreversiblemente desnaturalizada por incubación prolongada en ausencia de Ca^{2+} . En todos estos estudios es necesario verificar la naturaleza del sistema amortiguador en que se encuentra la enzima, ya que en citratos, el calcio puede acomplejarse.

i. La enzima

La dextransacarasa (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 figura 1.4. se representa la reacción global en la que interviene dicha enzima.

Se considera una glicoproteína en cuya fracción carbohidrato está constituida principalmente por D-manosa (49). 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 (46).

Los valores de K_m reportados para la sacarosa están dentro del intervalo de 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 (32).

j. Mecanismos de acción catalítica

Mecanismos de polimerización

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

El equipo de Robyt en la Universidad del Estado de Iowa (61, 62,7) ha publicado una serie de trabajos que demuestran el mecanismo de acción catalítica de la dextransacarasa. 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 dos grupos catalíticos equivalentes x_1 y x_2 . Inicialmente los dos grupos atacan a la sacarosa dando dos complejos glucosídicos tal como se muestra en la figura 1.2.

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

Terminación de la cadena

Robyt y Taniguchi (62) demostraron que la síntesis de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 3)$ de la dextrana de Leuconostoc mesenteroides NRRL. B512F ocurre cuando el $-C_3H_2OH$ de las moléculas de dextrana libre atacan nucleofílicamente al C_1 del grupo glucosil y/o al del grupo dextranosil desplazándolos del complejo.

k. Unidades de actividad enzimática

Koepsell, Tsuchiya y colaboradores (70) establecieron las condiciones de producción de la dextranasacarasa, posteriormente Jeanes (39) las replicó. Una unidad de actividad dextranasacarasa (UDS) fue 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 de acetatos a pH de 5.2. La determinación de fructosa se realizó por el método Somogyi (68) para azúcares reductores.

Se han sugerido unidades alternativas. Lawford (46) 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 .

Robyt y Walseth (64) 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 UDS.

Kaboli y Rally (40) 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 Robyt 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.

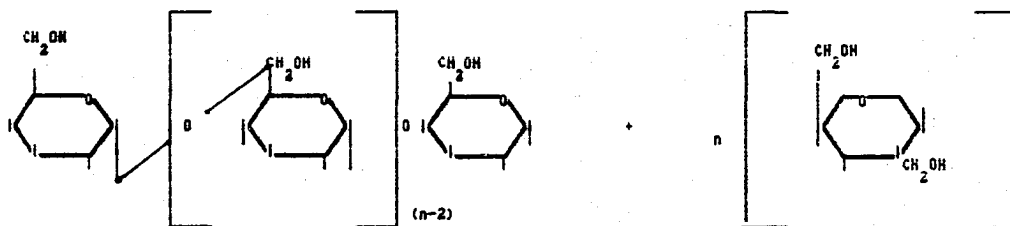
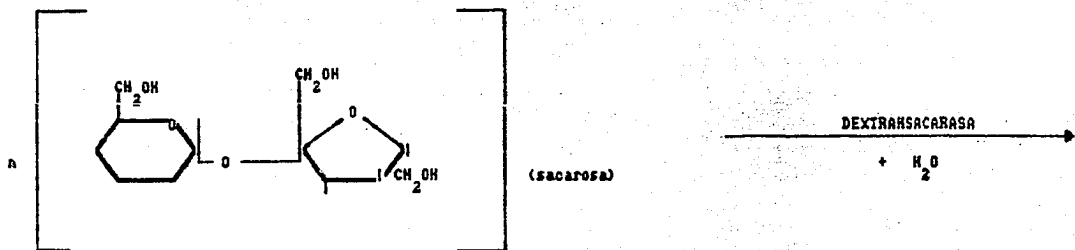


FIGURA 1.4 Reaccion global de sintesis de dextrans por
 acoion de la dextransacarasa.

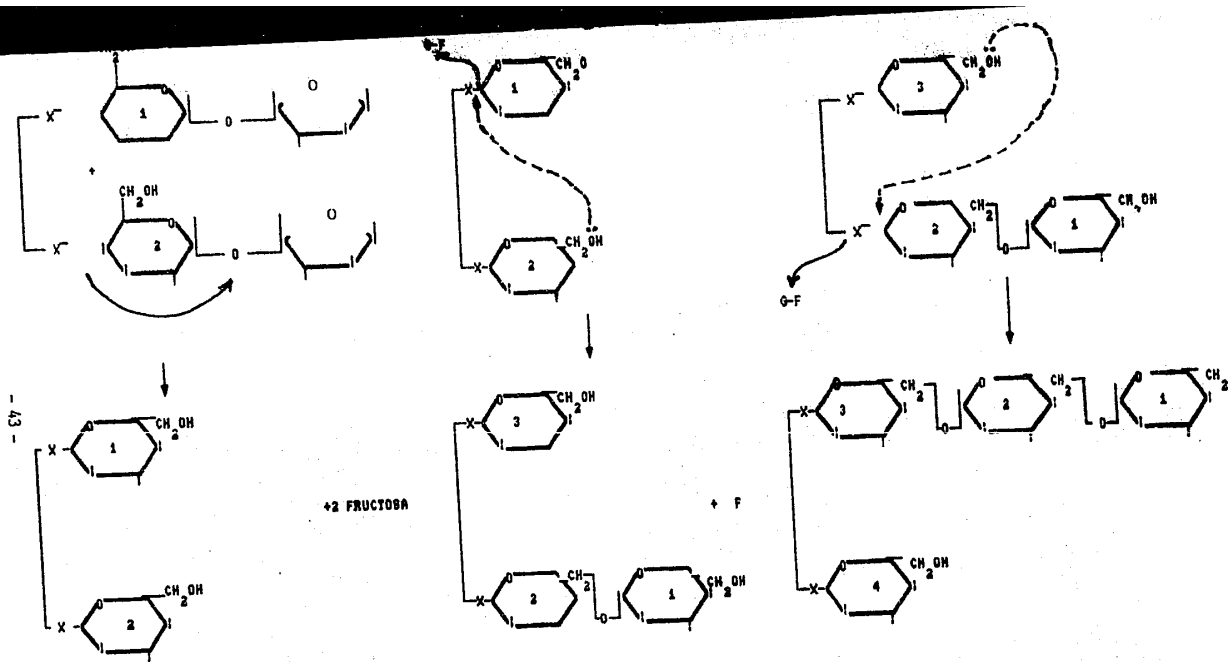


FIGURA 1.5. Mecanismo de acción de la dextransucrasa.

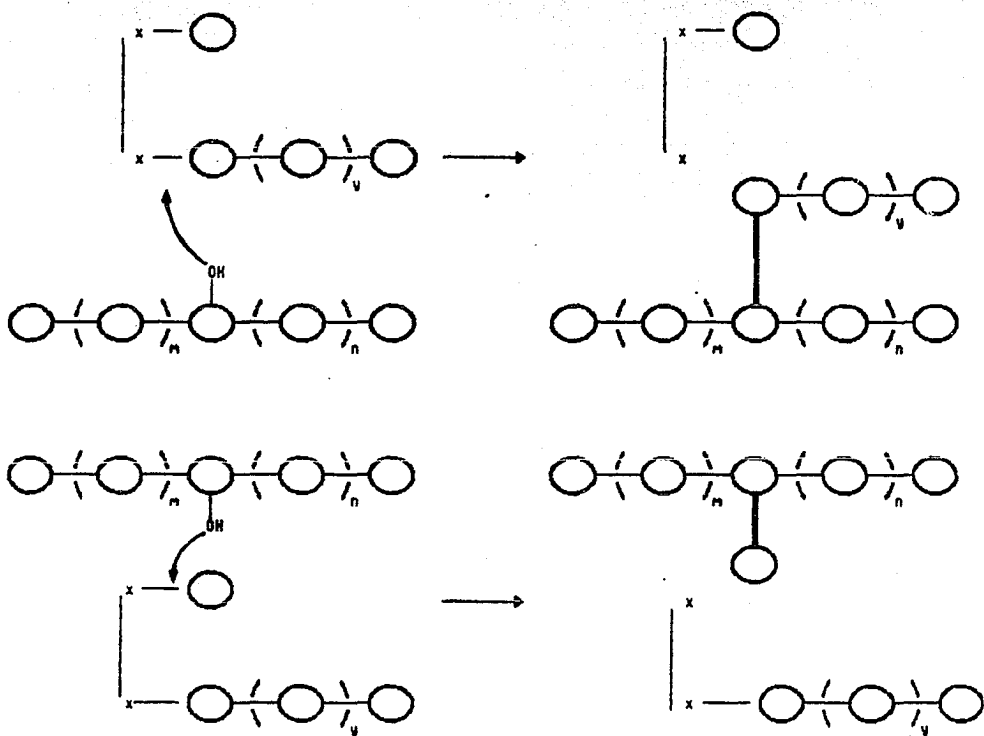


FIGURA 1.6. Formación de enlaces $\alpha(1-3)$ en la reacción de terminación de la cadena de dextrana.

1.3.3. OBTENCION DE LAS DEXTRANAS CON PESOS MOLECULARES DE INTERES INDUSTRIAL

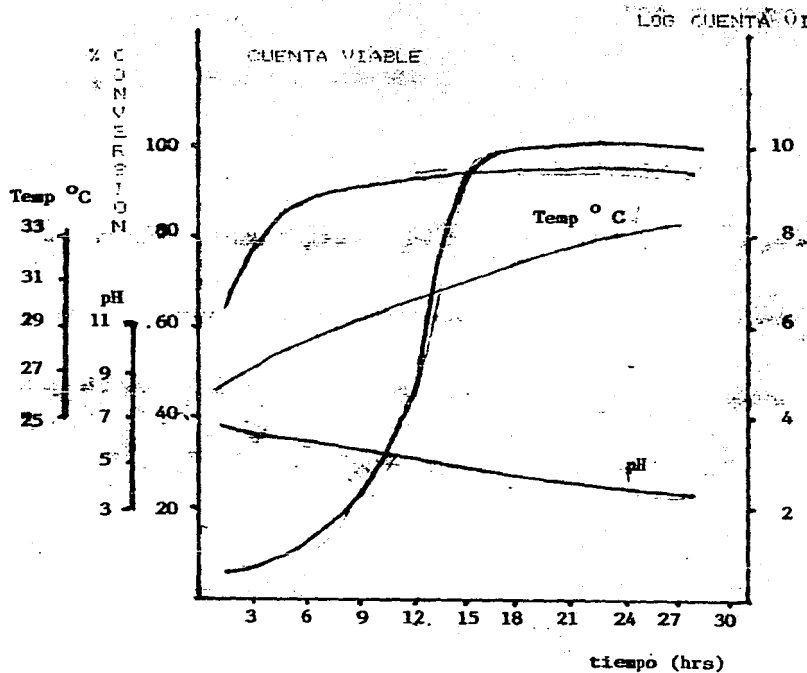
Existen dos métodos para producir dextrana nativa: (3)

1. Directo. La dextrana es producida en el mismo seno del crecimiento bacteriano y de la producción enzimática. En gráfica 1.7 se ejemplifica lo obtenido por Alsop. (3)
2. Indirecto. Como la enzima es extracelular en varias especies de bacterias antes mecioadas, puede ser aislada para sintetizar el polímero en ausencia del microorganismo gráfica 1.8, según Alsop.(3)

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.

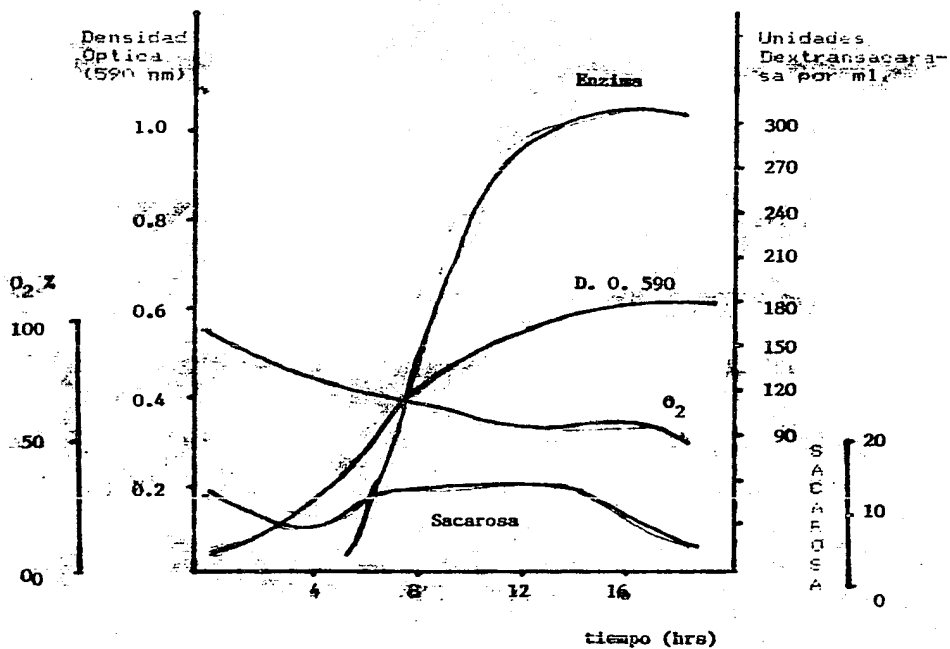
Se ha propuesto con base en varias investigaciones sobre la producción satisfactoria de dextrana clínica que la cepa NRRL-B512F, desde los puntos de vista técnico y económico, es la más útil y relevante.

La secuencia para producir dextrana clínica es como sigue:



GRAFICA 1.7

Cambios en los parámetros de fermentación durante la producción convencional de dextranas. (Alsep, 1983)



GRAFICA 1.8

Condiciones óptimas de fermentación intermitente para la producción de dextranosa (el pH y la temperatura se conservaron constantes: 6.7 y 23°C (respectivamente) (Aisop, 1963).

- i) Fermentación
 - a) Crecimiento celular
 - b) Producción enzimática
 - c) Producción de dextrana nativa (en presencia o ausencia de microorganismos.
- ii) Hidrólisis
- iii) Fraccionamiento
- iv) Formulación de las dosis farmacéuticas

i) Fermentación

La primera parte de esta secuencia para producir dextrana clínica se trató en el punto 1.3.1. en la sección b, en donde se enumeraron las características de la fermentación para la producción de dextranas.

ii) Hidrólisis

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

- 1a. Ácida. La hidrólisis ácida parece ser el método más atractivo, debido a que no precisa instalación compleja y se puede regular fácilmente. Colin y Belval (20) describieron la hidrólisis parcial de la dextrana con ácido y la precipitación del producto hidrolizado con alcohol.

Sohns et al. (66) 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°C.

2a. 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 está clasificada en endógenas y exógenas. La acción de las dextranasas sobre la dextrana ha sido muy estudiada. Charles y Farrell(13) 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(3) 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(8), 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, $\alpha(1 \rightarrow 6)$ y $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 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.

3a. Ultrasonicas. Esta hidrólisis ha sido estudiada por numerosos investigadores. En particular, Basedow (8) 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.

iii) Fraccionamiento

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 el fraccionamiento de las dextranas a escala industrial la ultrafiltración seguida de una cromatografía (7,8) . Barker y

y colaboradores (7) 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 el fraccionamiento con solventes a escala industrial. (6)

iv) Formulación 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 la Estados Unidos de Norteamérica (USOP). (67)

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 estar 25,000 a 75,000, 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 mililitros de solución(66) Stavely, autor de la primera patente antes mencionada, la dextrana clínica de otras preparaciones, esencialmente con base en el porcentaje de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$ en el polímero que alcanza un valor de 95%, el resto son enlaces diferentes, por ejemplo $\alpha(1 \rightarrow 3)$.

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 es ajustado a un valor de 9.5 con NaOH antes de la esterilización, aparecía después de ésta, un color café en la solución que no podía ser eliminado con filtración ni con centrifugación. Wieman, 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 II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

PREPARACION DE LAS DEXTRANAS EN EL LABORATORIO

En la siguiente sección se describirá el procedimiento seguido para la síntesis del polímero. Las técnicas analíticas usadas en algunas etapas, se citan en su desarrollo. La composición del medio de cultivo usado para la obtención de la enzima y el procedimiento de síntesis siguen los métodos usados por Jeanes. (39)

Se describen en la segunda parte de esta sección, desde las condiciones de obtención de la enzima hasta las condiciones de obtención del polímero; para poder así concluir caracterizando al proceso en forma global.

2.1. MATERIAL Y EQUIPO

2.1.1. Bacteria y cultivos microbianos

- a) Bacteria empleada: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F, cepa perteneciente al Departamento de Alimentos de la División de Posgrado, de la Facultad de Química de la UNAM; mantenida en forma liofilizada en ampollitas de 5 mililitros.
- b) Medio de cultivo. Se prepararon 3200 mililitros de un medio de cultivo cuya composición se muestra en la tabla 2.1. Se prepararon 200 ml., para usarlos en la propagación del microorganismo y posteriormente inocular los 3000 ml. restantes para obtener la enzima.

El cloruro de sodio, que en el medio de cultivo de la tabla 2.1. pertenece a los elementos traza introducidos al 0.001%, no fue incluido en la formulación debido a que el extracto de levadura contiene altas cantidades del mismo según se muestra en la tabla 2.2.

COMPONENTES	CANTIDAD
	%
Sacarosa	2.000
Extracto de levadura	2.000
Fosfato dibásico de potasio, K_2HPO_4	2.000
Sulfato de magnesio, $MgSO_4$	0.020
Sulfato de fierro (II), $FeSO_4$	0.001
Sulfato de manganeso (II), $MnSO_4$	0.001

Jeanes (1965) (39).

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo tradicional usado para la producción de la enzima Dextranasa.

EXTRACTO DE LEVADURA	% Cl^- (base seca)
Bioxón	3.0
Yestál-400	4.0

Jeanes (1965) (39).

Tabla 2.2. Contenido de NaCl de los extractos de levadura disponibles.

2.1.2. Sustancias

a) Grado técnico.

- Extracto de levadura - Yestal 400. Arancia, Ingredientes Especiales, S.A. de C.V.
- Alcohol etílico 96° G.L.
- Fosfato dibásico de potasio, K_2HPO_4 . Cosmocei, S.A.
- Cloruro de Sodio, NaCl

b) Grado reactivo

- | | |
|--|---|
| - Sulfato de Magnesio, $Mg SO_4$ | Lab. Merck |
| - Sulfato de manganeso, $Mn SO_4$ | Lab. J.T. Baker |
| - Sulfato ferroso, $Fe SO_4$ | Lab. J.T. Baker |
| - Cloruro de Calcio, $Ca Cl_2$ | Lab. J.T. Baker |
| - Acido fosfórico, H_3PO_4 | Lab. Merck |
| - Acido Sulfurico, H_2SO_4 | Lab. J.T. Baker |
| - Hidróxido de Sodio, NaOH | Lab. J.T. Baker |
| - Dextrana utilizada como materia prima para la elaboración de hierro-dextrana | Fisons de México, S.A. |
| - Fructosa, $C_6H_{12}O_6$ | Lab. Darmstadt |
| - Glucosa, $C_6H_{12}O_6$ | Lab. Darmstadt |
| - Etilen Glicol | Lab. Merck |
| - Azida de Sodio, NaN_3 | Lab. Reasol |
| - Dextranas. De pesos moleculares: 10^4 , 4×10^4 , 7×10^4 y 2×10^6 , azul de dextrana | Pharmacia Fine Chemicals, AB Uppsala, Suecia. |

2.1.3. Equipos

- Fermentador. Microferm-Fermentor. New Brunswick Scientific, Co. Inc., New Brunswick, New Jersey, U.S.A. con capacidad de 1,4,7,14 litros.
- Potenci6metro Digital. An6logo Sargent-Welch Modelo I.P.
- Centrifuga. Beckman 1500 con rotor para 6 vasos
- Espectrofot6metro Digital Perkin-Elmer Hitachi 200. De uno y dos haces.
- Autoclave
- Incubadora
- Ba6o de agua con termostato
- Cromat6grafo APLIC. Beckman Modelo 332
- Parrilla de calentamiento.

2.2 OBTENCION DE LA ENZIMA DEXTRANSACARASA

El pH del medio de cultivo utilizado fue 7.1. Después de medio el pH, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 15 psi durante 20 minutos.

Una vez esterilizado se inocularon los 200 ml. de medio con la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 la cual fué usada en forma de ampollita, con el microorganismo liofilizado. Los 200 ml. del medio, contenidos en un matraz Erlenmeyer, ya inoculados se incubaron en un baño con agitación recíproca durante 24 horas a 25°C. La agitación se mantuvo a setenta golpes por minuto.

Terminada la propagación se llevó a cabo en un fermentador de laboratorio, previamente esterilizado (MICROFERM-FERMENTOR), con control automático para mantener constante la temperatura del medio de fermentación, filtro para aire, rotámetro, tacómetro análogo y motor de velocidad variable para agitación mecánica.

La agitación mecánica se realizó mediante un agitador de tipo de hojas con acoplamiento al motor a través de flecha. En la parte superior del vaso de fermentación se encuentran los puertos de muestreo, entrada de aire, medición de oxígeno disuelto, venteo y serpentín de control de temperatura.

El procedimiento anterior se muestra en la figura 7.1. que es el diagrama de flujo para la obtención de la enzima cruda.

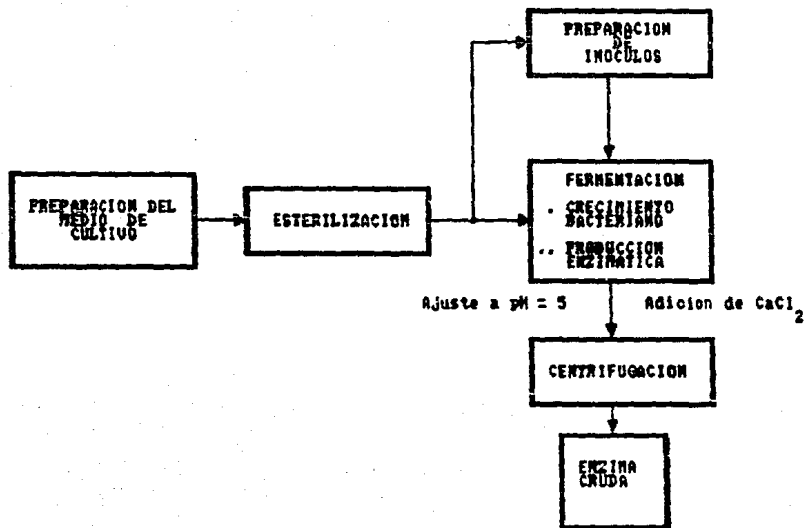


FIGURA 7.1 Diagrama de flujo para la obtencion de la enzima cruda.

2.2.1. Condiciones convencionales de fermentación

Se experimentaron dos variaciones:

- a. Para la obtención de la enzima se realizó una fermentación convencional; controlando sólo la temperatura, se permitía que la bacteria se consumiera la sacarosa inicialmente implementada en el medio de cultivo, esquematizándose las variaciones en el crecimiento y en el pH; los resultados se observan en la gráfica 2.1. esto es con el fin de evaluar las condiciones convencionales de la fermentación.
- b. Para la obtención del polímero y enzima se realizó una fermentación alimentada; partiendo con el mismo porcentaje de sacarosa que en la fermentación convencional, se probó la adición intermitente de sacarosa controlando el pH y la temperatura. Paralelamente se siguió la evolución del crecimiento. Con esta variación se evaluarán las fermentaciones programadas con volúmenes del medio de 4 y 13.5 lt. Los resultados se observan en la gráfica correspondiente.

El crecimiento bacteriano se detectó por Turbimetría en un Spectronic 20 a 600 nm. utilizando diferentes diluciones según la cantidad de biomasa presente, desde 1/100, en particular, al final de las fermentaciones con adición de sacarosa.

Los vasos de fermentación son intercambiables y en volúmenes de 3,7, 9 y 14 litros, con baffles para evitar la formación de vórtices.

Las condiciones de fermentación fueron las siguientes:

Temperatura	$26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Velocidad de agitación	300 rpm
Flujo de aire	$2000 \text{ cm}^3/\text{min}$ (equivalentes a 0.66 vvm.)
Volumen del medio	3000 ml.
Sac ₀	2% w/v

El curso de la fermentación fue seguido a través de mediciones de pH del medio de fermentación y densidad óptica para seguir el crecimiento del microorganismo. Para efectuar estas mediciones se tomaron muestras a intervalos de 1 hora. Los primeros cuarenta mililitros de cada muestra fueron descartados para eliminar el volumen del medio que queda en el sifón de muestreo y de esta forma tomar una muestra del medio de fermentación.

Para la medición de la densidad óptica la muestra fue diluida once veces. El pH se midió en un medidor de pH análogo Sargent-Welch modelo IP. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro digital Perkin-Elmer Hitachi 200, en el rango de espectro visible a 650 nm.

El punto final de la fermentación fué tomado en el momento en que los microorganismos alcanzaron la fase estacionaria y el pH fue cercano a 4.0. La fermentación duró aproximadamente siete horas. La variación de la densidad óptica y el pH con respecto al tiempo pueden verse en la gráfica 2.1.

Inmediatamente después de concluida la fermentación, el pH fué ajustado a

5.0 con hidróxido de sodio 5N con objeto de evitar la pérdida de la actividad enzimática. Se agregaron 0.5 g./lt. de cloruro de calcio anhidro para estabilizar la enzima y 0.04% de azida de sodio para evitar la contaminación por otros microorganismos.

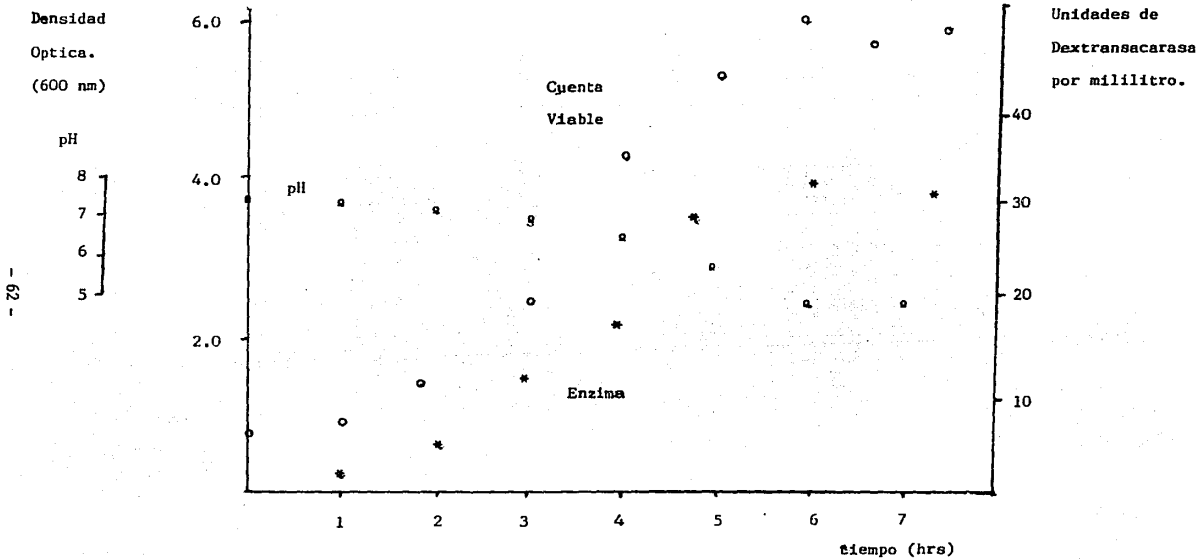
Una vez hecho lo anterior las bacterias se separaron del medio por centrifugación durante una hora y media a 3 500 rpm. La centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga Beckman 1500 con rotor para seis vasos.

El sobrenadante que contiene a la enzima, la cual de aquí en adelante será denominada como "enzima cruda", se almacenó a 4°C hasta el momento de su posterior utilización en la síntesis del polímero.

2.2.2. Optimización de la Producción de la Enzima

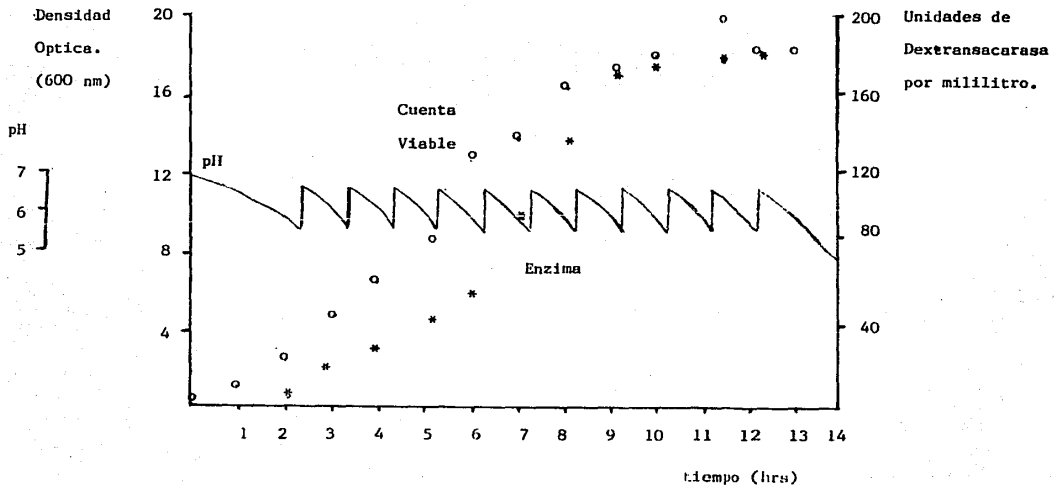
En el presente trabajo, tomando como referencia los resultados obtenidos por López y Monsan (49) en fermentación alimentada (gráfica 1.5), se efectuó una fermentación en volumen de 0.5 lt con regulación de pH partiendo con una concentración de sacarosa del 2 %. Iniciando la fase de crecimiento se adicionó en forma intermitente 1 % en peso de azúcar estándar, una vez cada hora con respecto al volumen de fermentación. Este porcentaje va de acuerdo a lo reportado por Scheneider (38) sobre el consumo de sacarosa por Leuconostoc Mesenteroides NRRL-B512F que es de 10-11 g/lt.

Los resultados de este experimento se reportan en la gráfica 2.2. en donde se observa que la producción de enzima alcanza 170 UDS/ml.



Gráfica 2.1. Fermentación convencional en volumen 3.0 lts

T = 27 - 28 ° C



Gráfica 2.2. Fermentación alimentada en volumen de 0.5 lts con control de pH. T = 27 - 28 ° C

2.3. SINTESIS DEL POLIMERO

El uso que se les da a las dextranas está estrechamente relacionado con su peso molecular y la distribución del mismo. Dependiendo de estos factores las dextranas pueden ser usadas en forma nativa y/o como hidrolizadas.

El término Dextranas nativas se refiere al polímero tal y como se obtiene de la síntesis enzimática. El término dextranas hidrolizadas se refiere a los polímeros, de menor peso molecular, que se obtienen por hidrólisis ácida de las Dextranas nativas.

Mientras que la distribución de pesos moleculares de las Dextranas hidrolizadas puede estar entre un rango de cien mil hasta nueve millones, el de las Dextranas nativas puede ser de ciento veinticinco a doscientos cincuenta millones. En forma hidrolizada, en rangos de 25 000 a 75 000 encuentran su mayor aplicación en el área de la medicina.

2.3.1. Determinación de la Actividad Enzimática

Antes de efectuar la síntesis del polímero, bajo las diferentes condiciones de reacción, se midió la actividad enzimática del sobrenadante.

La medición de la actividad enzimática está basada en la determinación de la velocidad inicial de producción de fructosa, usando algún método adecuado para determinar el poder reductor de esta última conforme va produciéndose, en función del tiempo de reacción entre la enzima y la sacarosa.

Revisando el mecanismo de reacción de la dextranasa (figura 1.5), 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 ácido dinitrosalicílico (DNS), por lo tanto la velocidad inicial es proporcional a la cantidad de fructosa liberada. Fue utilizado dicho método, y las condiciones para efectuar la determinación fueron las reportadas por Jeanes.

a) Determinación de azúcares reductores por el método DNS.

El método se basa en la determinación colorimétrica de la cantidad de ácido dinitro-amino salicílico producido por reducción del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) en solución alcalina.

Reactivos.

- Reactivo DNS. Disolver en agua destilada, 16 g. de NaOH, 300 g. de tartrato doble de sodio y potasio y 10 g. de ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS). Llevar el volumen a 1 000 ml. en el matraz volumétrico. El orden de disolución de los reactivos debe ser el señalado. El NaOH y el tartrato doble deben de estar completamente disueltos antes de agregar el DNS.

Este reactivo es muy estable, pero debe de mantenerse protegido de la luz.

- Fructosa. Preparar una solución de fructosa conteniendo 2 mg/ml., con esta solución se construye la curva estándar.

Procedimiento del Método DNS.

Agregar 1 ml. de la solución problema, conteniendo menos de 2 mg/ml de azúcares reductores, en un tubo de ensaye. Se agrega 1 ml. de reactivo DNS y se agita. Se tapa el tubo y se coloca en un baño María durante cinco minutos exactamente.

Una vez transcurrido dicho tiempo se saca el tubo del baño María y se coloca en un baño de hielo hasta que alcance la temperatura ambiente. Se diluyen con 10 ml. de agua destilada y se deja reposar 30 min. para permitir el desarrollo total del color.

Paralelamente al tratamiento de la muestra se desarrolla un blanco de reactivo. Este se hace colocando 1 ml. de agua destilada en lugar de la muestra y siguiendo el mismo procedimiento que para esta última. Una vez desarrollado el color, se mide la absorbancia en el espectro visible a 450 nm. Calibrar a cero de absorbancia con el blanco de reactivo.

La concentración de azúcares reductores, expresada como mg de fructosa por ml., se encuentra por referencia a una curva estándar construida previamente.

b) Determinación de la actividad enzimática de la Dextranasa

El método se basa en la determinación del poder reductor de la fructosa producida durante la reacción de la enzima con la sacarosa. El poder reductor

se determina con el método DNS.

Reactivos.

- Solución tamponada de sacarosa al 60% 10 ml. de buffer acetato 3 M (pH = 5.4) y 60 g. de sacarosa se disuelven en agua destilada y se llevan a 100 ml. El pH final deberá ser de 5.2.
- Reactivo DNS.
- Enzima cruda o purificada. Si la solución de enzima tiene más de 40 unidades de enzima por ml., preparar una dilución exacta con agua destilada para obtener la solución de ensayo.

Procedimiento.

Se colocan en una gradilla varios tubos de ensaye (generalmente seis o siete) debidamente numerados. Uno de ellos será el blanco de enzima. A cada uno de los tubos se les agrega 1 ml. de reactivo DNS y 0.5 ml de agua destilada y se agitan.

Se agregan 2 ml de la solución tamponada de sacarosa al tubo de ensaye de 25 mm. x 160 mm. Se coloca el tubo en un baño de agua a 30°C. Se añaden a este tubo lo más rápido posible, 10 ml. de la solución de enzima atemperada a 30°C. Inmediatamente después de agregados los 10 ml. de enzima se empieza a registrar el tiempo en el cronómetro

Se toman 0.5 ml. de reacción lo más rápido posible después de haber

arrancado el cronómetro, de tal forma que se tenga un registro de tiempo lo más cercano posible a cero, y se añaden a uno de los tubos que contienen el reactivo DNS y el agua destilada.

El tubo se agita y se coloca en el baño María durante cinco minutos exactos. Pasado este tiempo el tubo se saca y se coloca en el baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se añaden 10 ml de agua destilada, se deja reposar 30 min. y se mide absorbancia en el espectro visible a 540 nm. La absorbancia se calibra a cero con el blanco de reactivo. (Ver método DNS).

Paralelamente se desarrolla un blanco de enzima. Se efectúa el mismo procedimiento con los demás tubos, tomando muestras del medio de reacción a intervalos de tiempo lo más cercanos posibles a cero al inicio de la reacción y a intervalos lo más grandes conforme ésta avanza.

Una vez hecho lo anterior, se construye una gráfica Absorbancia contra tiempo.

La actividad enzimática se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{\text{UDS}}{\text{ml}} = \left[\frac{Z}{X} \right] \left[\frac{M_s}{M_f} \right] [F] \left[\frac{V_s}{V_e} \right]$$

donde:

UDS = Unidades de Dextransacarasa.

(una unidad de Dextransacarasa se define como la cantidad de enzima que convertirá 1 mg. de sacarosa en Dextrana en 1 hr., liberando 0.52 mg. de fructosa bajo las condiciones de ensayo).

Z = Pendiente de la curva absorbancia contra tiempo.

X = Pendiente de la curva absorbancia contra concentración de fructosa.

Ms = Peso molecular de la sacarosa.

Mf = Peso molecular de la fructosa.

F = Factor de dilución.

Vs = Volumen de solución.

Ve = Volumen de enzima.

El volumen de la muestra fué de 0.5 ml. y no de 1.0 ml. como lo indica la técnica por, dos razones:

- 1a. 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.
- 2a. En el caso de concentraciones enzimáticas elevadas, las lecturas del espectrofotómetro rebasarían los límites de confiabilidad.

La actividad enzimática se calcula entonces, 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. de 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/lt).

2.3.2. Medición del curso de reacción.

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

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

donde:

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

$\left[\text{Sac} \right]_1$ = Concentración de Dextrana transformada a sacarosa
en el tiempo 1.

$\left[\text{Fru} \right]_1$ (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.

Usando estos métodos la actividad enzimática de la enzima cruda fué igual a 7 unidades de Dextranasa por mililitro. Una unidad de Dextranasa (UDS) se define como la cantidad de enzima que convierte 1 mg. de sacarosa en Dextrana en una hora, bajo las condiciones de ensayo, liberando 0.52 mg. de fructosa. (37)

La actividad enzimática obtenida estuvo por abajo del valor reportado en la literatura para las mismas condiciones de fermentación. Dicho valor está entre 20 - 30 UDS/ml. (38) El hecho de que el valor obtenido sea casi tres veces menor quizá se deba al tiempo que estuvo sujeta la enzima a un pH de 4.0 durante su obtención, según se observa en la gráfica 2.1.

La enzima es muy poco estable a pH mayores o menores a 5.0 por lo tanto pierde actividad relativamente rápido a pH distinto del mencionado.

No obstante esto, el que la enzima tenga mayor o menor actividad solo repercute en el tiempo que tardará en sintetizar el polímero y al parecer no tiene

influencia sobre las características finales del mismo. (38)

2.3.3. Condiciones de reacción para la síntesis enzimática del polímero

Una vez conocida la actividad enzimática de la Dextranasa cruda se procedió a sintetizar el polímero. Para ello el volumen de medio líquido conteniendo la enzima se dividió en diferentes números de porciones; siendo éstas y las condiciones de reacción las mostradas en la Tabla 2.3.

Según se observa en dicha tabla el número de condiciones de síntesis fué de ocho. Las únicas variables usadas fueron el volumen del medio de reacción, la concentración inicial de sacarosa y el tipo de extracto de levadura.

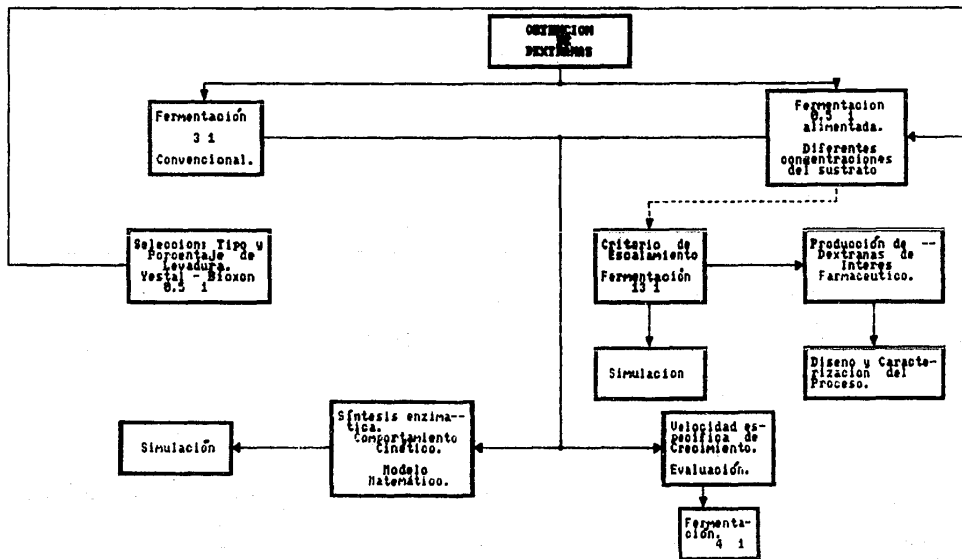
Las últimas tres experimentaciones fueron replanteamientos que se explican durante el desarrollo de este trabajo, pero se incluyen para tener la visión general del trabajo experimental realizado.

Las distintas condiciones de síntesis permiten varias posibilidades de comparación. Para una misma concentración inicial de sustrato se ensayaron tres volúmenes de reacción diferentes. Para cuatro distintas concentraciones iniciales de sustrato, dos volúmenes de reacción diferentes. Para un mismo volumen de reacción, dos diferentes tipos de extracto de levadura.

2.3.4. Procedimiento de obtención del polímero

Para la obtención del polímero se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

PRODUCCION INDUSTRIAL DE DEXTRANAS
 Diagrama de Flujo del Trabajo Experimental.



Volumen del medio de reacción. (ml)	Temperatura del medio de reacción. (°C) ^a	Concentración inicial de sacarosa. (gr)	Tipo de extracto	pH	UDS/ml
*500	26°	150	Yestál ^b	Control	
*500	26°	150	Bioxón ^c	'	
500	26°	660	Yestál	'	
500	26°	150	'	'	
500	26°	250	'	'	
500	26°	400	'	'	
3 000	27°	2 % sin adición	'	Sin Control	30
4 000	26°	150	'	Control	140
13 500	26°	150	'	'	170

Niveles de Variación.

a. + 1°C

b. 1 - 3 % peso

c. 2 - 5 % peso

d. 7.0 - 5.5

* Realizadas por (50).

Tabla 2.3. Condiciones de reacción para la síntesis de Dextranas. Trabajo Experimental.

Preparación de inóculos.

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

- Volumen de fermentación, 0.5 lt Una ampolleta conteniendo a la bacteria liofilizada, se puso en contacto con 50 ml. de medio fresco, posteriormente se incubó 16 hrs a 30°C, necesarias para la hidratación y el máximo crecimiento de bacterias activas.
- Volumen de fermentación, 4.0 lt Se procedió de igual manera variando el volumen de medio (400 ml.) y el tiempo de incubación (24 hrs).
- Volumen de fermentación, 13.5 lt Se propagó el inóculo debido a la magnitud del volumen. Se tomaron 50 ml. de inóculo destinado a 0.5 lt de fermentación, se virtieron en 1.35 lt y se incubó durante otras 16 hrs.

Fermentación de 3 lt

Como se mencionó, la primera experimentación realizada a este nivel fué para estudiar el crecimiento de la bacteria; por lo que se cuantificó la actividad enzimática final alcanzada bajo las siguientes condiciones de fermentación:

T (°C) = 26
rpm = 300
Sac_o = 2 % w/v

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

Los resultados se muestran en la gráfica 2.1.; donde se observa que se alcanza una actividad enzimática de 30 UDS/ml.

Para evitar agregar la sacarosa en forma de solución y diluir de esta forma la enzima provocando una disminución en su actividad, se agregó la sacarosa directamente en forma de cristales a la enzima cruda. Las muestras se colocaron en un baño de agua con agitación recíprocante. La agitación se mantuvo a sesenta golpes por minuto durante todo el tiempo de síntesis.

El curso de las reacciones fue seguido mediante la determinación del poder reductor del medio de reacción, expresado como mg de fructosa/ml de acuerdo a la expresión propuesta por Hehre (45); y mencionada anteriormente.

El poder reductor del medio de reacción en función del tiempo se determinó usando el método del DNS citado anteriormente. Dicho poder reductor fué corregido tomando en cuenta el poder reductor original de la enzima cruda.

Así mismo, en base a la reacción citada se calcularon los porcentajes teóricos de conversión de sacarosa usando para ello el valor de concentración inicial de sacarosa, y la concentración de fructosa producida en función del tiempo dada por el método DNS.

Los valores de porcentaje de conversión en función del tiempo para las distintas condiciones de síntesis se muestran en cada una de las gráficas. El punto final de las reacciones se determinó tomando en cuenta el momento en el cual

el porcentaje de conversión fue máximo y no cambió posteriormente con el tiempo.

2.3.5. Resultados Obtenidos.

Los resultados obtenidos de las síntesis con volúmenes del medio de reacción de 3.0 lt y 0.5 lt, se muestran en las gráficas 2.1 y 2.2 respectivamente. Donde se puede observar que para la primera se alcanza una actividad enzimática de 30 UDS/ml en comparación a 170 UDS/ml obtenida en la segunda síntesis mencionada.

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

Para la evaluación de las velocidades de crecimiento, se recurrió a la evaluación puntual, estimándose de la siguiente manera:

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

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

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: (53)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Ec. 2.0

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

$$S \gg K_s$$

La ecuación 2.0 quedaría simplificada de la siguiente forma:

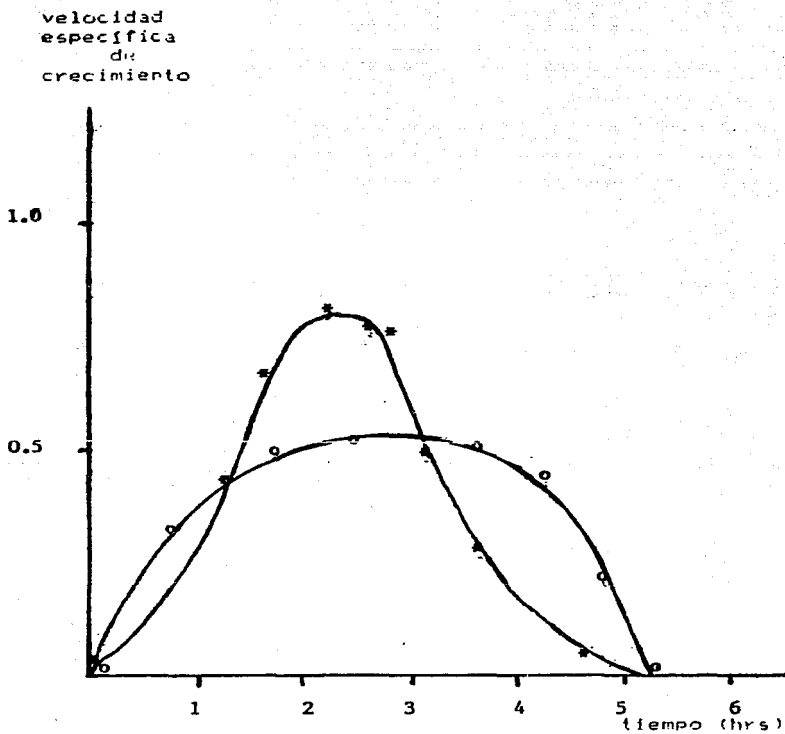
$$\mu = \mu_{\max}$$

De cualquier forma la evaluación puntual de la velocidad de crecimiento se estimó tomando intervalos discretos de tiempo y considerando de la ecuación 2.0 como:

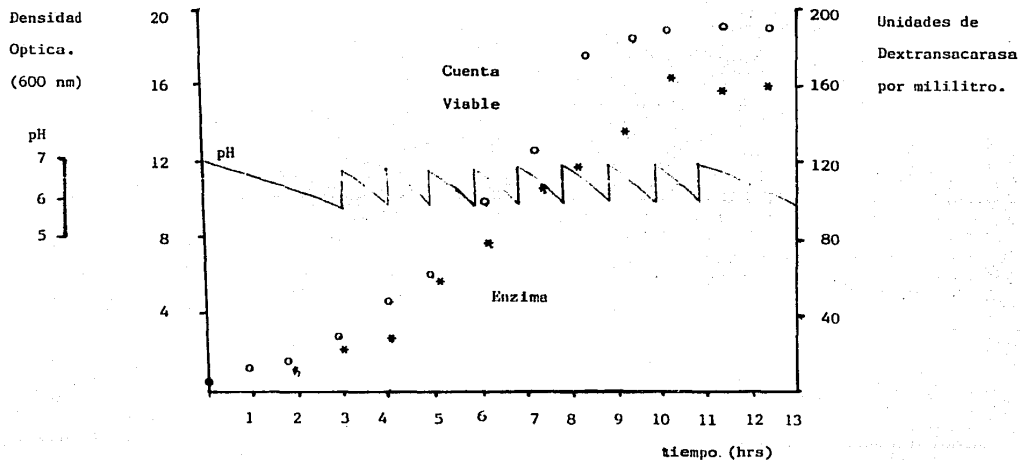
$$\mu = \frac{1}{x} \frac{x}{t}$$

En la gráfica 2.3 se describe el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento a lo largo de las fermentaciones de 0.5 y 3 lt. De esta figura se puede observar el inicio de la fermentación es muy similar alcanzándose sin embargo, una mayor velocidad de crecimiento para el cultivo de 0.5 lt. Esta situación puede deberse a limitaciones en el suministro de oxígeno, por deficiencias ya sea en la aireación o en la agitación.

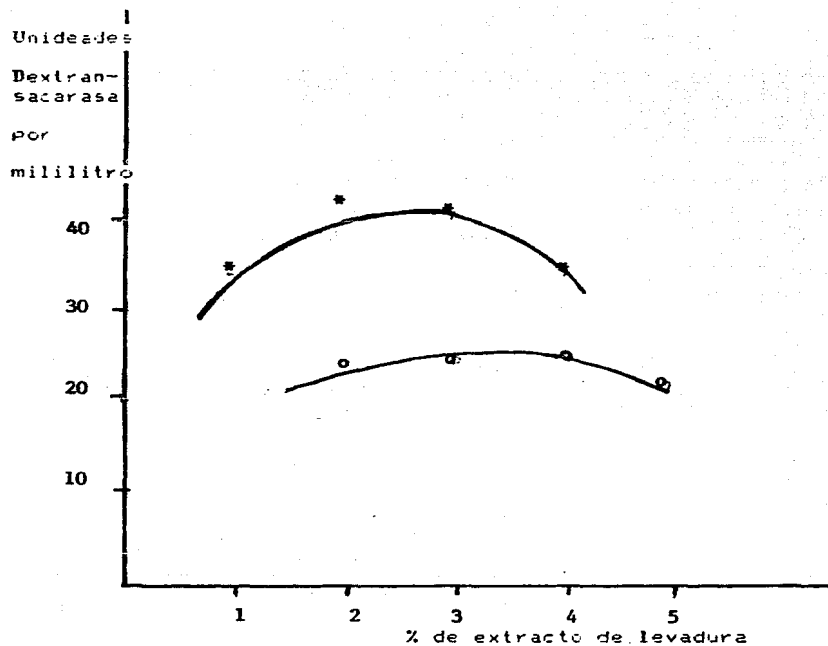
Sin embargo, se decidió efectuar en aproximadamente el mismo volumen (4 lt), el sistema de fermentación alimentado bajo las mismas condiciones del proceso. Los resultados se muestran en la gráfica 2.5 donde se alcanza una producción de dextransacarasa de aproximadamente 140 UDS/ml.



GRAFICA 2.3: Comparación de la velocidad específica de crecimiento en los volúmenes de fermentación 0.5 l (* — *) y 3.0 l (o — o).



Gráfica 2.5. Fermentación alimentada en volumen de 4.0 lts con control de pH. T = 26 - 27 ° C



GRAFICA 2.6. Selección del tipo y porcentaje óptimos del extracto de levadura.

2.3.6. Influencia del tipo de Levadura

Se estudió también la influencia del tipo de extracto de levadura efectuando fermentaciones a diferentes concentraciones. Los resultados de este estudio se muestran en la gráfica 2.6 de donde se presenta un valor óptimo para el extracto de levadura YESTAL-400 de 2%. En la misma gráfica 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 medio de cultivo destinados a análisis microbiológicos, resultó de menor eficacia en la producción de dextranasa. En la tabla 2.1 se resumió la composición del medio de cultivo empleado.

2.3.7. Producción de Dextranas de interés Farmacéutico

A partir de la Dextrana nativa obtenida de la fermentación 0.5 l , se obtuvieron productos de interés farmacéutico, mediante una hidrólisis con ácido sulfúrico y un posterior fraccionamiento con alcohol etílico. En la gráfica 2.2 se pueden observar las condiciones que se siguieron para la obtención de la fracción clínica de las dextranas.

Se siguió el método de Sohns et al (66), para hidrolizar la dextrana nativa. Consistente en someter a una solución de dextrana nativa precipitada y redisuelta al 5-6 % p/p, a 80°C y aun pH de 1.0; ajustado con H₂SO₄, durante 6 horas.

Dicho método se describe a continuación:

Precipitación de la dextrana nativa (previa al tratamiento hidrolítico). Se revisó lo reportado por H.M. Tsuchiya (70) como se presenta en la gráfica 2.7. y se observa que hasta aproximadamente el 46% de etanol, 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.

También se revisó el trabajo experimental realizado por López (49) de la Precipitación de las dextranas hidrolizadas y se modificó la segunda fase del método Sohns et al.(66) ya que se utilizó etanol y no metanol. Las curvas de precipitación de los patrones 70 000, 40 000 y 10 000 de peso Molecular de Dextrana así como la de la dextrana destinada a la producción de hierro dextrana (Fisons, S.A.), se trazaron en dicho trabajo. En la gráfica 2.8 se muestran las curvas de precipitación (% de dextrana precipitada vs. % de etanol v/v) a diferentes concentraciones iniciales de dextrana y en la figura 2.3 se representa en forma de diagrama de flujo, el método Sohns et al. (66).

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. Esto se ilustra en la tabla 2.3.

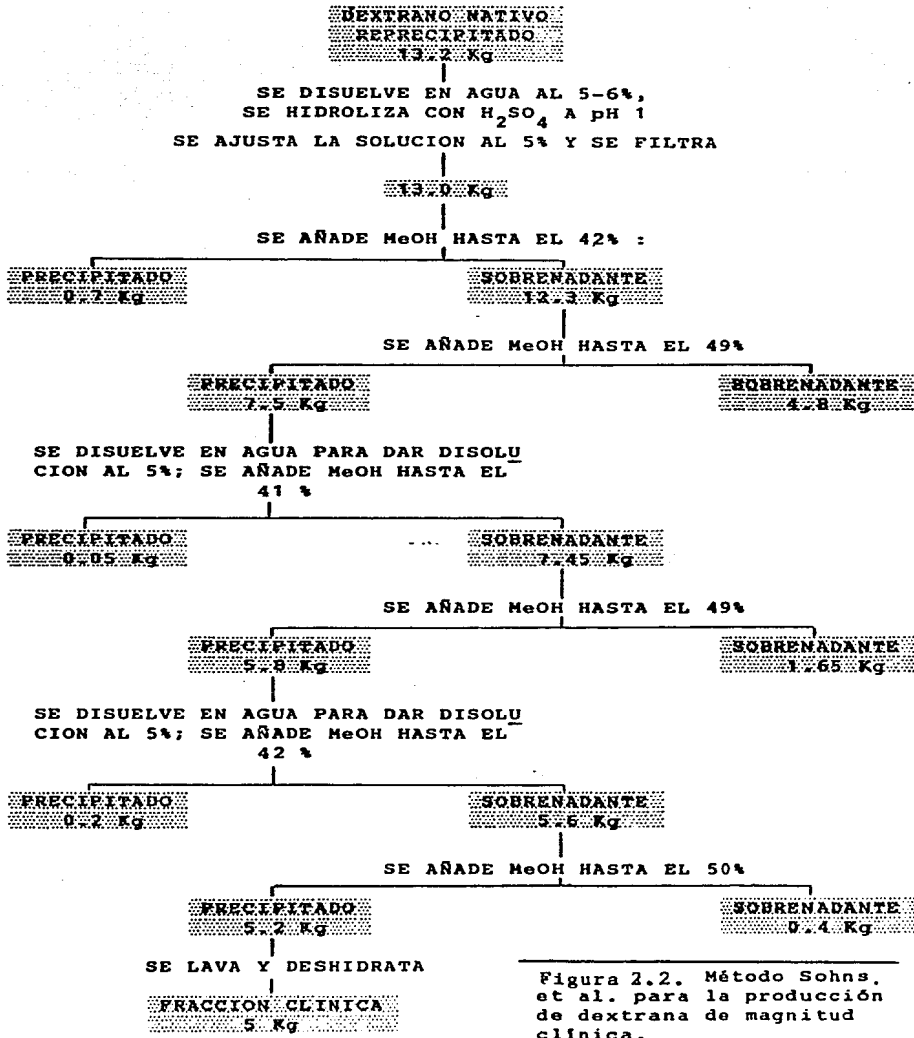


Figura 2.2. Método Sohns,
 et al. para la producción
 de dextrana de magnitud
 clínica.

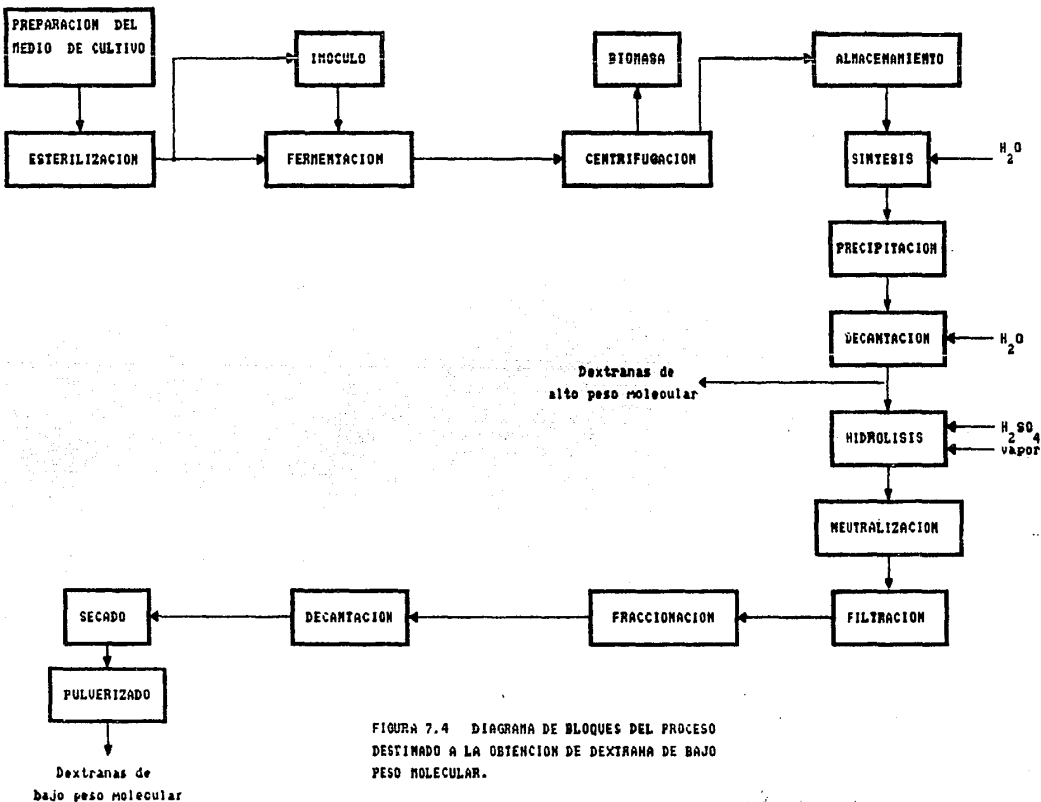
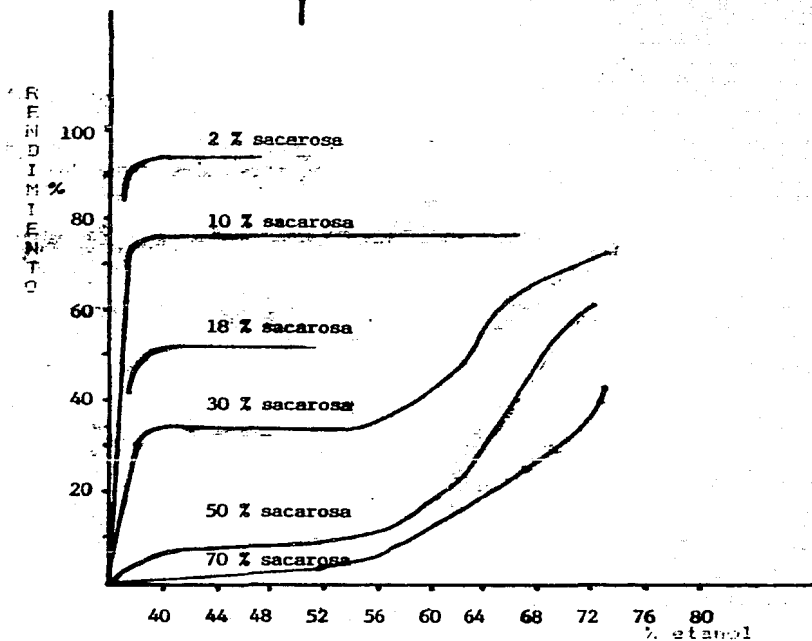


FIGURA 7.4 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO DESTINADO A LA OBTENCION DE DEXTRANA DE BAJO PESO MOLECULAR.

Dextranas de alto peso molecular

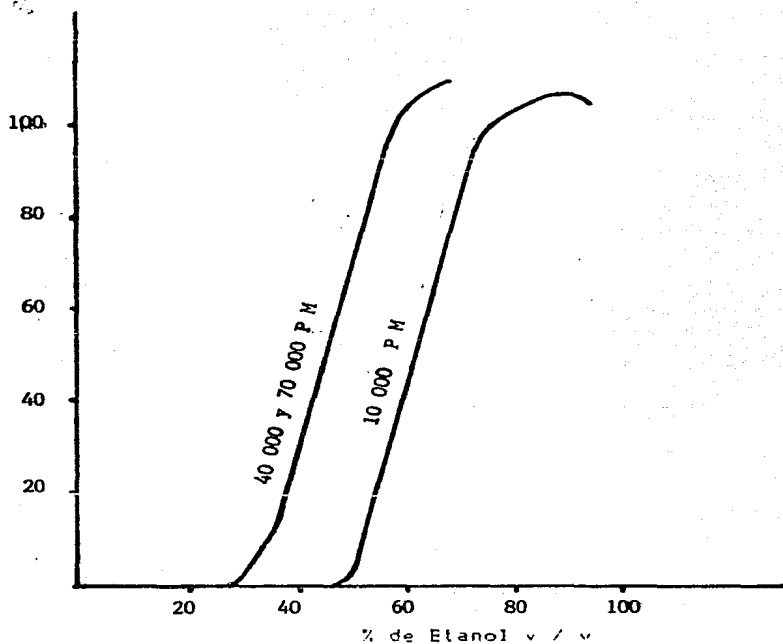
Dextranas de bajo peso molecular



GRAFICA 2.7.

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

Dextrana
Precipitada

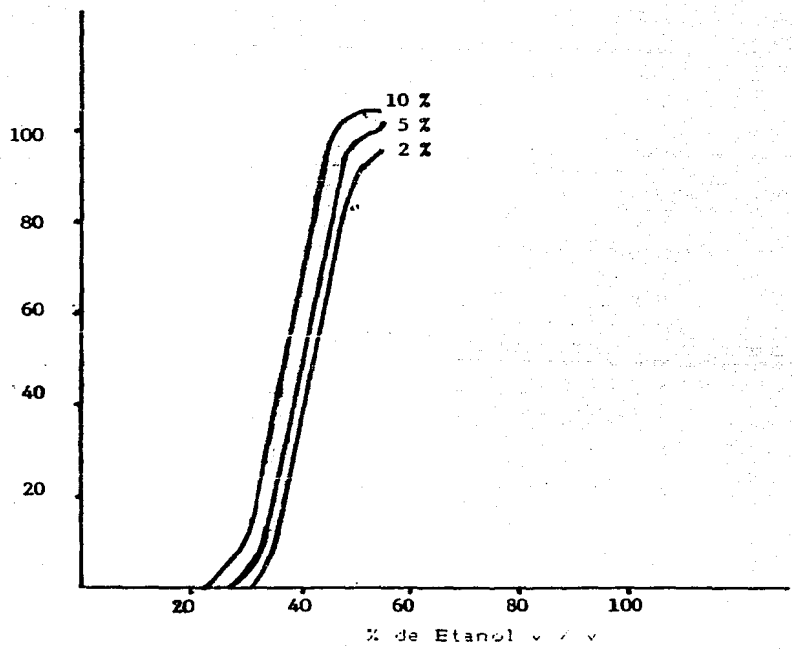


GRAFICA 2.8

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

López (1979) (32)

%
Dextrana
Precipitada



GRAFICA 2.9

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 de dextrana.
T = 19 C

López (1979) (32)

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 efectuó la 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.

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

	Actividad Enzimática en la reacción (UDS/ml)	Dilución (1/x)	Tiempo de reacción*	Sacarosa** (gr/lit)	$P = \frac{S_0}{t}$
Caso 1	20	1/8	9.79	1,200	122
Caso 2	40	1/4	4.90	600	122
Caso 3	80	1/2	2.45	300	122
Caso 4	160	1	1.23	150	122

- 06 -

* Según modelo de inhibición.

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

Selección de la concentración enzimática para
la síntesis de dextrana nativa en base a la
productividad P, tiempo de reacción y pureza
del líquido enzimático.

Dextrana nativa
precipitada y redissuelta al
7.1% (73.1 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 redissuelve en agua
al volumen original
Se añade EtOH hasta
el 40%

Sobrenadante

Precipitado

Se lava
y
deshidrata

Fración 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

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

Precipitado

Se lava
y
deshidrata

Fración clínica
40,000
18.0 g

Destinado a la síntesis
de Fe-dextrana

Sobrenadante

Se la producción de:

Dextranas de magnitud clínica a partir
del producto nativo reprecipitado..
(Tratamiento para un litro)

Concentración inicial de
dextranas nativas = 6-8 %

T (°C) = 80

pH = 1

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

2.3.8. Cromatografía líquida de alta presión.

La técnica está descrita posteriormente en la sección 2.3.9; y en la gráfica 2.10., se muestran los diagramas de elución de los estándares de pesos moleculares de las Dextranas de 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 gráfica 2.11.

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 4 y 5 horas, estando estos límites fuera de lo óptimo, es decir, a las 4 horas, los productos 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 precipitación 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 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 gráfica 2.12. El balance de Materiales de este proceso se presenta en la sección de Conclusiones.

2.3.9. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Se desarrolló una técnica para el análisis y cuantificación de las dextranas hidrolizadas y fraccionadas.

Para ello se usó el método de cromatografía de permeación en gel (GPC). Se requirieron dos columnas conectadas en serie cuyas características se enlistan en la tabla 2.4.

Procedimiento.

Las dextranas patrones, la glucosa y el azul de dextrana (éstos últimos utilizados para la determinación de los límites de exclusión) se disolvieron en agua con 0.02 % de azida de sodio al 2% p/v. La concentración de las muestras fué del 2 %.

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 correspondientes.

Previamente al fraccionamiento del polímero la columna fué lavada con 200 ml. de eluyente a un flujo constante de 9 ml por hora, una vez lavada la columna se procedió a calibrarla con objeto de determinar el volumen muerto, V_0 . Para ello se usó Dextrana azul cuyo peso molecular promedio M_w , reportado por el fabricante (determinado por el método de dispersión de luz) fué de dos millones.

Se fraccionaron 0.5 ml. de una solución al 0.5% de Dextrana azul, el flujo se mantuvo a 7 ml/hr. Las fracciones, en porciones de 1.5 ml., se recolectaron usando un colector automático de fracciones colocado a la salida de la columna de cromatografía.

A cada una de las fracciones recolectadas se les midió absorbancia a 650

nm. El cero de ésta se ajustó con el eluyente. El perfil de elución correspondiente se observa en la gráfica 2.10. El volúmen muerto fué de 15.9 ml.

Resultados obtenidos.

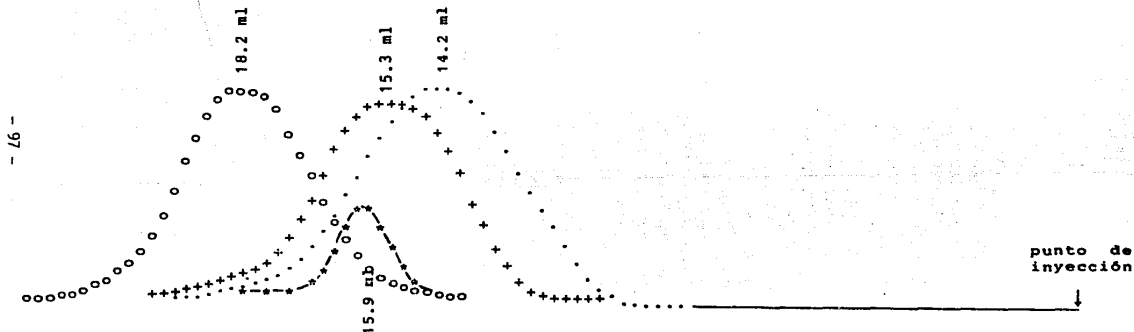
Según se observa en la gráfica la distribución de pesos moleculares fue bimodal; existió una moda estrecha de alto peso molecular y una moda relativamente amplia de bajo peso molecular. Es precisamente la moda estrecha la que tiene el peso molecular promedio reportado por el fabricante. De este modo observamos que aún cuando el fabricante reporta un peso molecular de dos millones existe una fracción muy amplia que tiene menores pesos moleculares.

Una vez obtenido el volumen muerto, V_0 , de la columna se procedió a cuantificar las Dextranas. Se recolectaron fracciones de 1.5 ml., usando el colector automático. Para determinar las fracciones en las que el tiempo de hidrólisis, obtenían las dextranas de interés farmacéutico; se tomaron muestras cada 30 minutos.

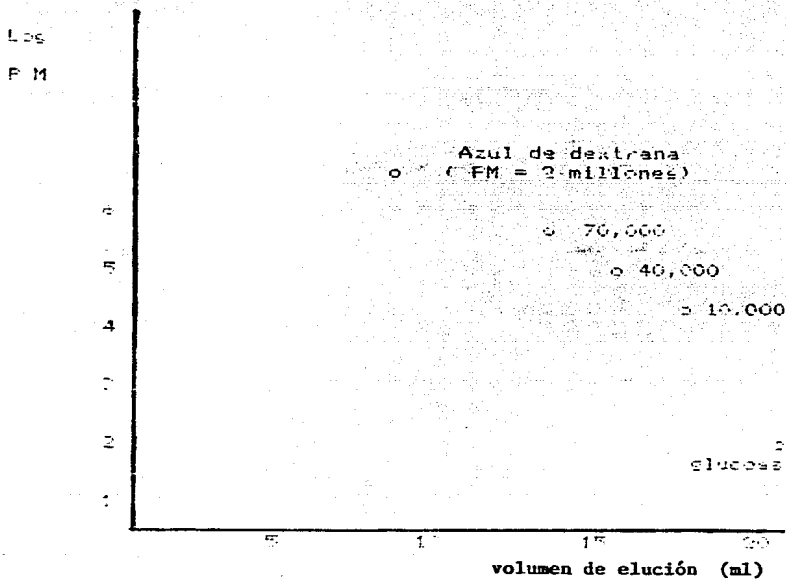
Denominación	Spherogel	
	TSK-5000 PW	TSK-3000 SW
Lugar en la conexión en serie	1°	2°
Diámetro por Longitud (mm x mm)	7.5 x 300	7.5 x 300
Tamaño de partícula	17 um	10 um
Límite de exclusión	7×10^6	1.5×10^5
Número de platos teóricos	10,000	

Características de las columnas utilizadas
en el análisis por cromatografía líquida
de alta presión.

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)

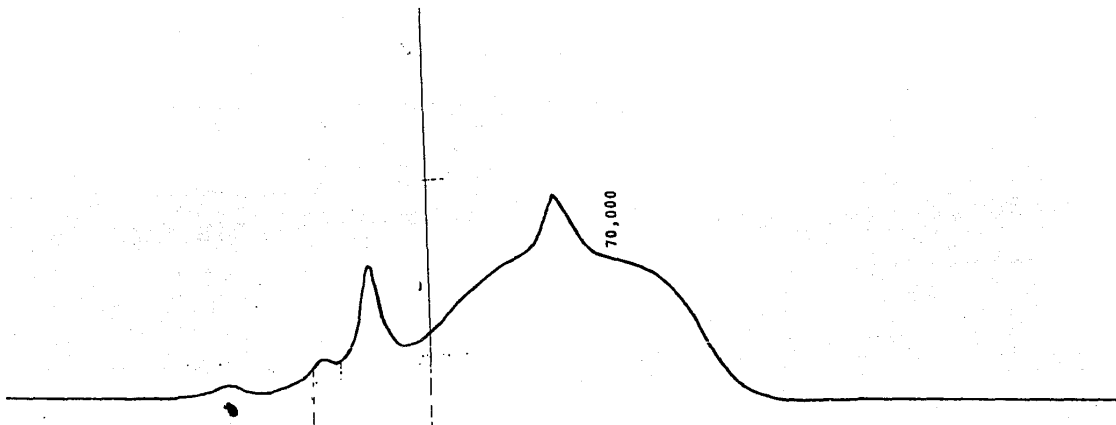


Gráfica 2.11. Diagramas de elución de los estándares de Pesos Moleculares 10,000 (ooo), 40,000 (+++), 70,000 (...) y de la dextrana destinada a la fabricación de Fe-dextrana (Fisons de Mexico, S. A.) (*-*-*).

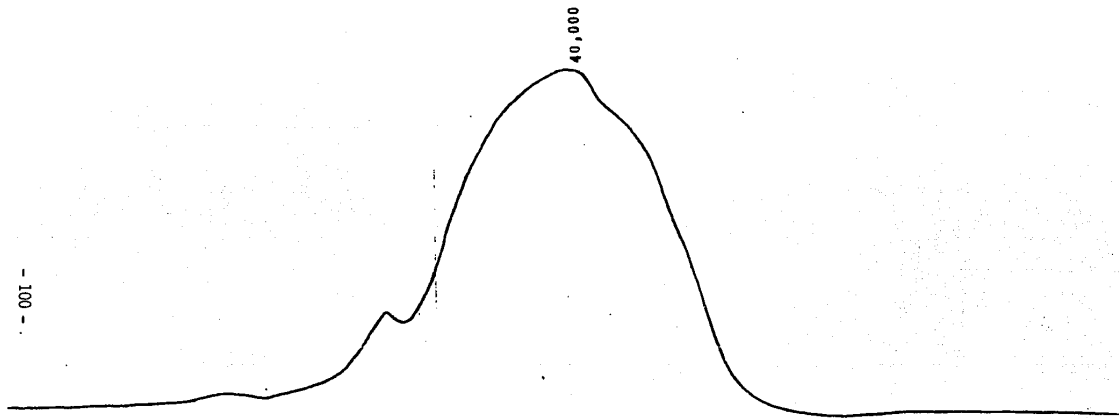


GRAFICA 2.12 Relación entre el peso molecular y el volumen de elución.

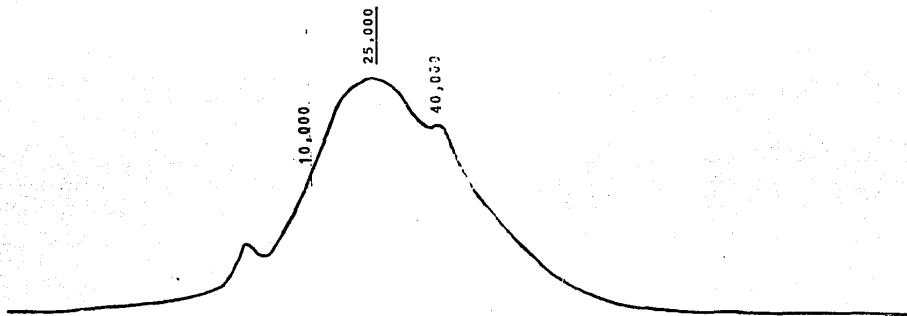
Los límites de exclusión están dados por el azul de dextrana (volumen muerto) y por la glucosa - (volumen total).



GRAFICA 2.11 a Diagrama de elución de la fracción
que precipita del 23 al 40% de EtOH
después de 4.5 hrs. de hidrólisis.
(Muestra A)



GRAFICA 2.11 b Diagrama de elución de la fracción
que precipita del 40 al 50% de EtOH
después de 4.5 hrs. de hidrólisis.
(Muestra B)



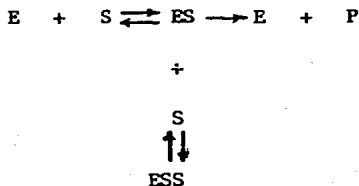
GRAFICA 2.11. ¹¹ _c Diagrama de elución de la fracción que sedimenta del sobrenadante con 50 % de EtOH después de haber separado la fracción que precipita en el intervalo 40-50% de EtOH.
(Muestra C)

2.4. SINTESIS ENZIMATICA

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

Se observó que sólo obedece el modelo de Michaelis-Menten en zonas de baja concentración de sustrato, estando sujetas a un proceso de inhibición, a concentraciones superiores al 10% . Estos resultados se presentan en la gráfica 2.13.

Ante esta situación se postuló (47) un modelo que incluyese dicha inhibición considerando que su mecanismo es de los modelos ya establecidos en la cinética enzimática:



El modelo correspondiente resulta ser:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_m + S + K_i S^2} \quad \text{Ec. 2.1}$$

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 ($K_i S/V_{\max} \rightarrow 0$):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} \quad \text{Ec. 2.2.}$$

De donde se obtiene el valor de $K_m = 5.12 \text{ g l}^{-1}$ y el de $V_{\max} = 0.4859 \text{ g l}^{-1}$ (gráfica 2.14)

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

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_i S}{V_{\max}} \quad \text{Ec. 2.3.}$$

De donde un valor de $K_i = 2.118 \times 10^{-3} \text{ l. g}^{-1}$ fué calculado (gráfica 2.15).

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.

En las fermentaciones 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:

$$vV \Delta t = m \Delta x \quad \text{Ec. 2.4.}$$

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 $t \rightarrow 0$, la ecuación 2.4 adquiere la forma:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{vV}{m} \quad \text{Ec. 2.5}$$

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

Para operaciones isotérmicas, v depende sólo de la composición 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 2.5 para dt e integrando formalmente se obtiene que:

$$t = m \int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{vV} = \frac{m}{mV} \int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{v} \quad \text{Ec. 2.6}$$

En 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 m_t 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 2.6 puede ser escrita en términos de la concentración. Si S_0 es la concentración inicial y es igual a m/V , la ecuación adquiere la siguiente forma:

$$t = S_0 \int_0^x \frac{dx}{v} = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{v} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Definiendo $v = -dS/dt$ como la velocidad de desaparición del sustrato, en este caso sacarosa, se puede integrar la ecuación 2.1 reorganizándola inicialmente de la siguiente manera:

$$v_{\text{máx}} dt = \frac{K_m + S + K_i S^2}{S} dS \quad \text{Ec. 2.8.}$$

Si los límites son $S = |\text{Sacarosa}|$ en el tiempo t y

$S_0 = |\text{Sacarosa}|$ al inicio de la reacción

Se tiene finalmente que:

$$V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} t = K_m \ln \frac{S_0}{S} + (S_0 - S) + \frac{K_i}{2} (S_0^2 - S^2) \quad \text{Ec. 2.9}$$

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

$$x = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad \text{Ec. 2.10}$$

Donde $S = S_0 (1 - x)$

Al sustituir S en la ecuación 2.9 se obtiene la siguiente igualdad:

$$V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} t = K_m \ln (1 - x)^{-1} + S_0 x + K_i S_0^2 (2x - x^2) \quad \text{Ec. 2.11}$$

$$\frac{\text{a}}{\text{b}}$$

Observando la ecuación anterior, 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 gráfica 2.16 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 experimentales).

Determinación experimental de valores de K_m y $V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$

Es muy complicado determinar K_m y $V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ a partir de la gráfica 2.13, dado que como los puntos experimentales están dispersos, resulta difícil dibujar una hipérbola correcta. Además de que no es posible suministrar suficiente

sustrato para alcanzar la $V_{\text{máx}}$ o para medir las bajas velocidades iniciales que se obtienen con concentraciones pequeñas de sustrato. Sin embargo, si se modifica la ecuación de Michaelis-Menten para obtener una representación en línea recta, se superan estas dificultades.

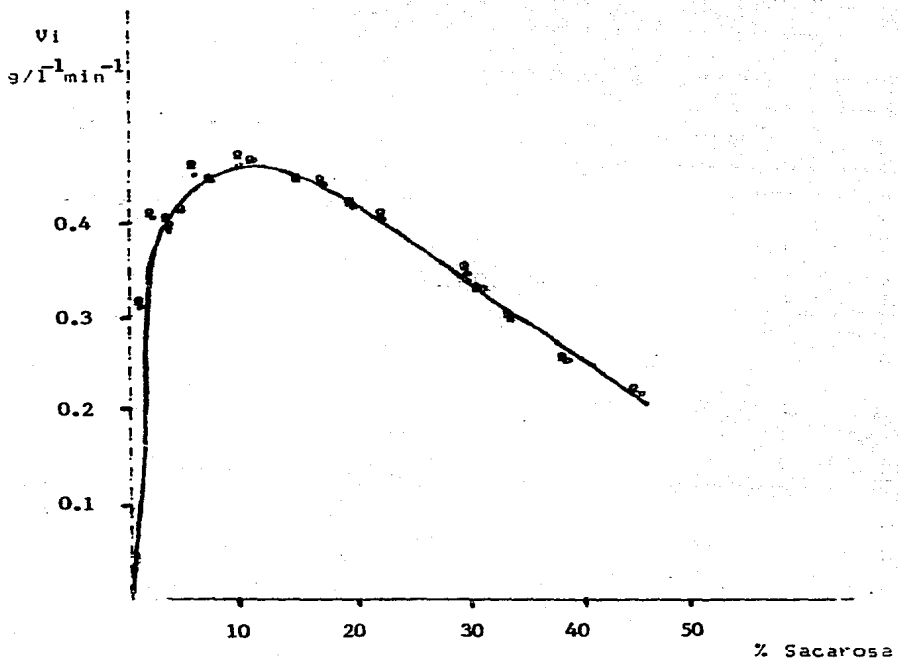
Método de Lineweaver Burk. Este método de representación de los datos parte del hecho de que la inversa de la ecuación de una hipérbola rectangular es la ecuación de una línea recta. Así, la inversa de la ecuación de Michaelis-Menten es:

$$\frac{1}{v} = \frac{(S)}{V_{\text{máx}} (S)} + \frac{K_m}{V_{\text{máx}} (S)}$$

que por reordenamiento se convierte en la ecuación de Lineweaver-Burk,

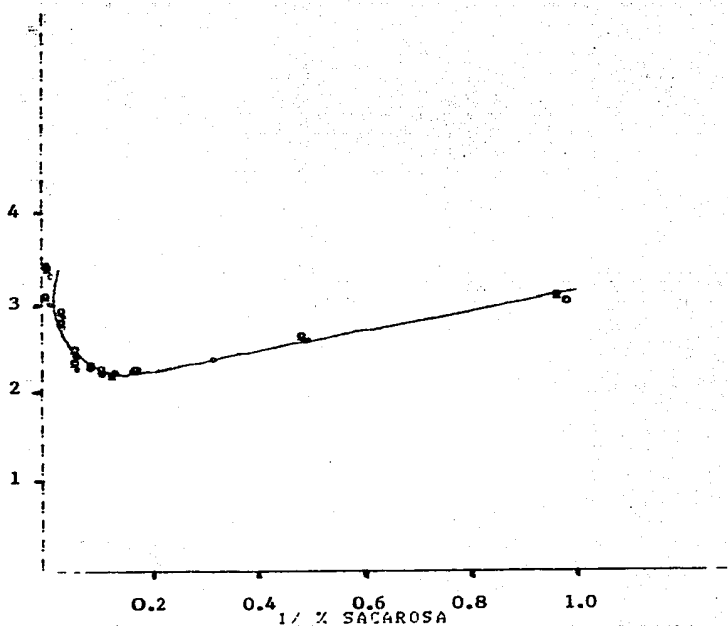
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

Por tanto, si se representa $1/v$ en función de $1/(S)$, se obtiene una línea recta cuya pendiente es $K_m/V_{\text{máx}}$ y la ordenada en el origen es $1/V_{\text{máx}}$. La extrapolación de la recta en el eje x negativo da $-1/K_m$, que sirve para calcular K_m , gráfica 2.14.

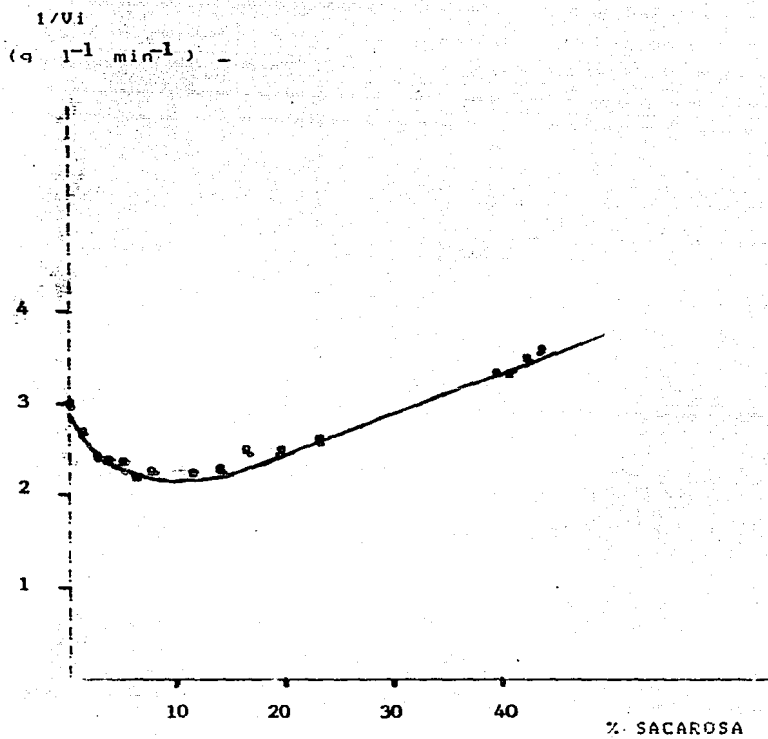


GRAFICA 2.13. Estudio cinético de la dextranasa.

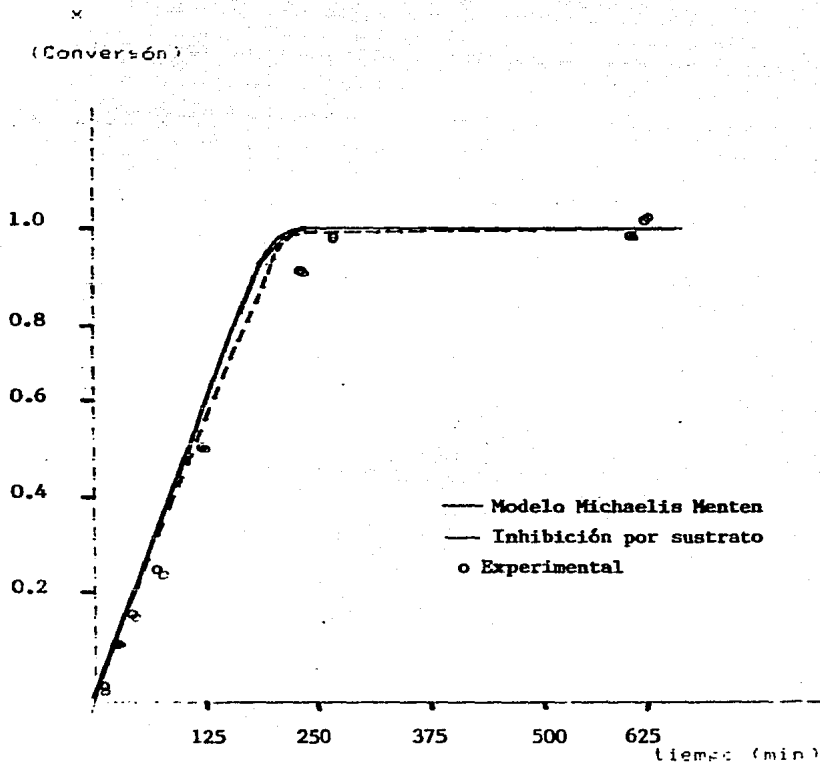
$1/v_i$
(g l⁻¹ min⁻¹)⁻¹



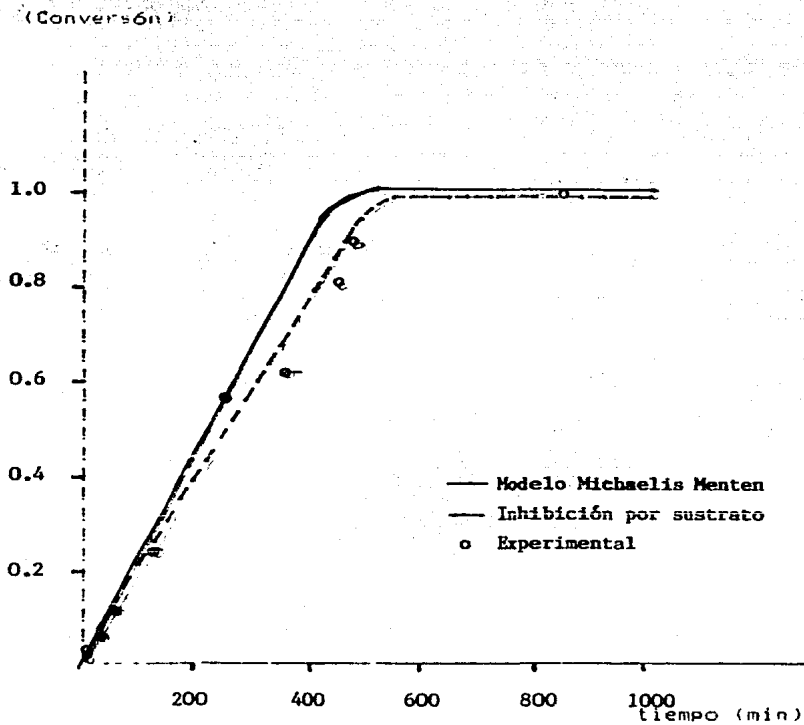
GRAFICA 2.14. Obtención de K_m y V_{max} .



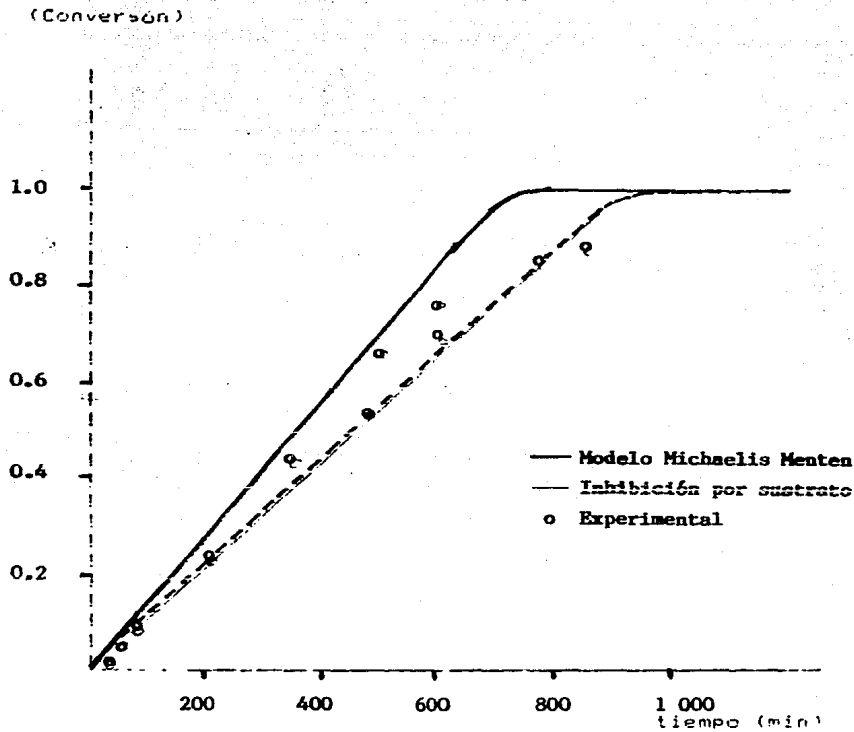
GRÁFICA 2.15. Obtención de K_i .



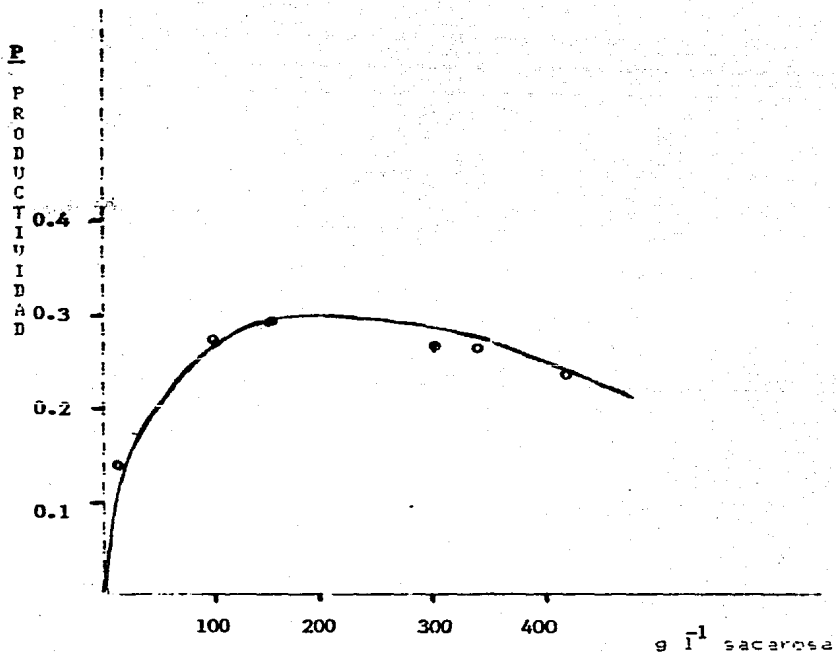
GRAFICA 2.16. Comparación de los datos experimentales con la predicción teórica de los modelos de Michaelis Menten y de inhibición por exceso de sustrato para una concentración inicial de sacarosa de 60 g/l.



GRAFICA 2.17. Comparación de los datos experimentales con la predicción teórica de los modelos de Michaelis Menter y de inhibición por exceso de sustrato para una concentración inicial de sacarosa de 150 g/l.



GRAFICA 2.18. Comparación de los datos 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.



GRAFICA 2.19

Comparación experimental de la concentración de sacarosa necesaria para una máxima productividad.

- 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

$$b) N_2 = \frac{N_1^3 D_{i1}^2}{D_{i2}^2} \quad \frac{1}{3} = N_1 \frac{D_{i1}^{2/3}}{D_{i2}}$$

$$c) P_2 = P_1 \frac{N_2^3 D_{i2}^5}{N_1^3 D_{i1}^5} = \frac{D_{i2}^3}{D_{i1}}$$

El fermentador disponible con capacidad de 14 lt 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 13.5 lt se muestran en la gráfica 2.20. 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 litros es sin embargo recomendable para este tipo de procesos.

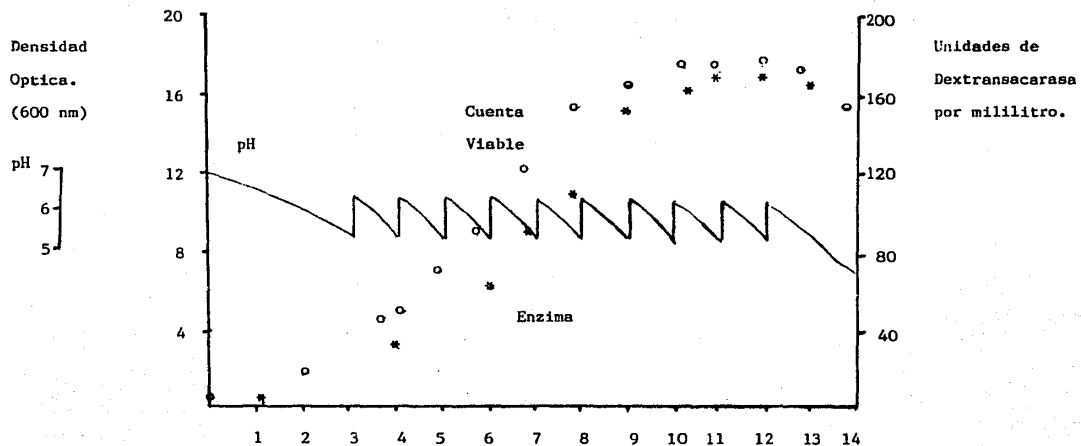
2.5.1. Resumen de Escalamiento

El obstáculo principal para el avance de la biotecnología es el de el escalamiento de procesos de laboratorio para su uso industrial. Hablar de escalamiento significa avanzar del fermentador típico de laboratorio de 50 litros a biorreactores industriales con volúmenes mayores en capacidad. Para lograr esto, se necesitan nuevos procesos y equipos, como son, fermentadores, instrumentos de prueba de control y métodos para la recuperación de productos; que aseguren que los productos y procesos de la biotecnología no sean más costosos que los de tecnologías competidoras.

Como hasta ahora esta parte del trabajo hemos visto, del exámen de los mecanismos y de los productos de este bioproceso se pueden entender mejor los proble-

mas asociados con el escalamiento. El mecanismo de producción de cada producto tiene diferentes requerimientos biológicos y presentan diferentes opciones genéticas para el mejoramiento de su eficiencia.

Definidos ya los parámetros del mecanismo de producción, se le desarrolla para su uso a escala comercial. Esto incluye el diseño de métodos de preparación del sustrato, del bioreactor, de los sistemas de control, de técnicas de recuperación del producto final, de formas de tratamiento de residuos y desperdicios; que ya hemos visto hasta aquí, y finalmente del escalamiento del proceso junto con los criterios de selección.



Gráfica 2.20. Fermentación alimentada en volumen de 13.5 lts
con control de pH. T = 26 - 27 ° C

2.6. DISEÑO Y CARACTERIZACION DEL PROCESO

En la figura 2.4 se representa el diagrama de bloques del proceso a nivel laboratorio para la obtención de las fracciones clínicas de peso molecular 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:

1ª semana Proceso de fermentación para la producción de 10 500 l de sobrenadante de fermentación con actividad de 160 UDS/ml.

2ª semana Reacción con 3 500 l de enzima en un volumen total de 14 000

1 al 15% de sacarosa para producir 1 ton de dextrana de alto peso molecular.

3ª semana Reacción en las mismas condiciones para producir 1 ton de dextrana e hidrolizarla para obtener 236 Kg de P.M.= 70 000, y

4ª semana Igual a la tercera.

En la Figura 2.5 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 2.4 se enlista el balance de costos mensual 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:

$$\$/\text{Kg dextrana nativa} = \frac{1/3 \$ \text{ fermentación} + 1/3 \$ \text{ síntesis}}{1\ 000\ \text{Kg}}$$

$$\$/\text{Kg f}_{70\ 000} = \frac{1/3 \$ \text{ fermentación} + 1/3 \$ \text{ síntesis} + 1/2 \$ \text{ hidrólisis}}{452\ \text{Kg}} = 5225.64$$

$$\$/\text{Kg f}_{40\ 000} = \frac{1/3 \text{ fermentación} + 1/3 \$ \text{ síntesis} + 1/2 \$ \text{ hidrólisis}}{506\ \text{Kg}} = 4\ 902.48$$

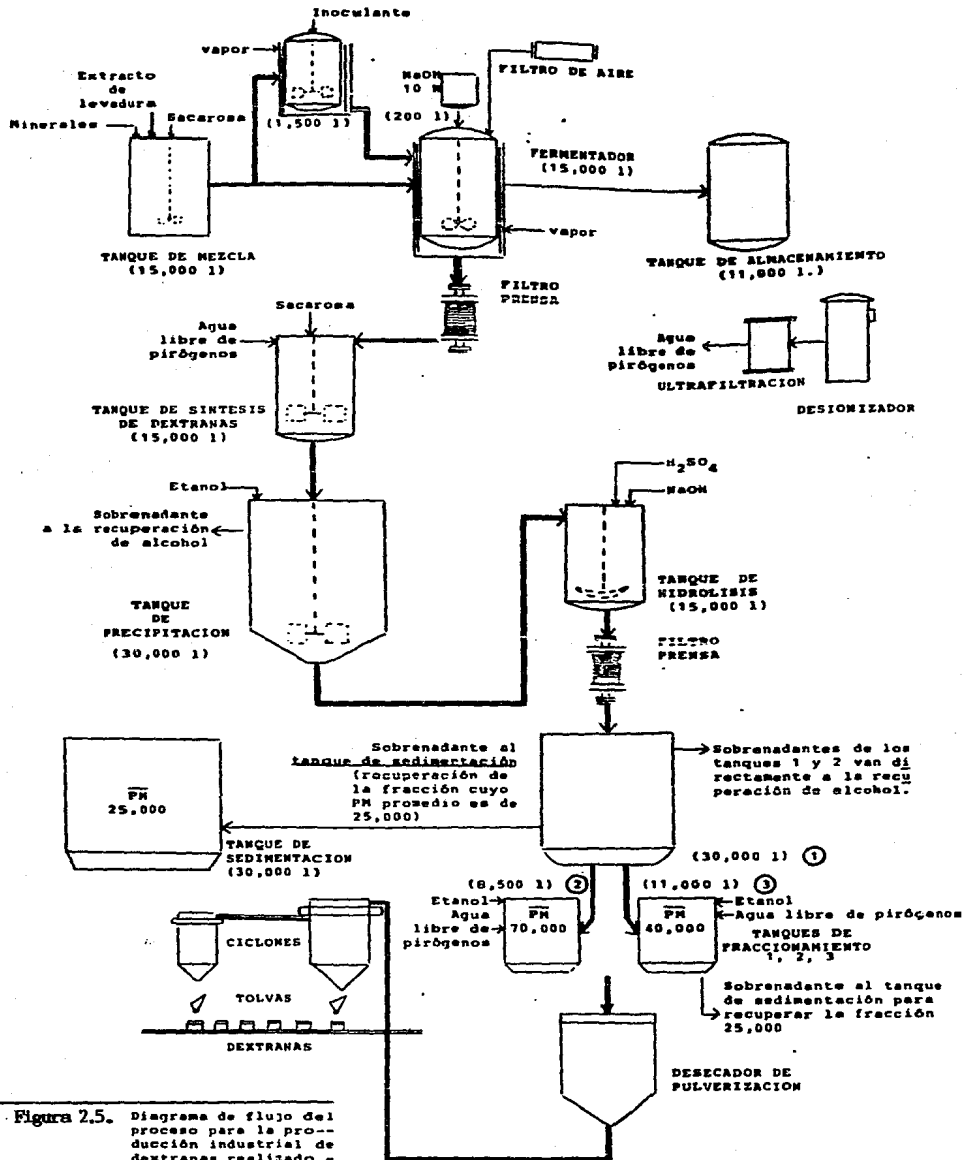


Figura 2.5. Diagrama de flujo del proceso para la producción industrial de dextranas realizado en base a las condiciones y resultados a nivel laboratorio. (50)

SUSTANCIA	CANTIDAD REQUERIDA MENSUAL Kg.	COSTO POR UNIDAD (Grados Industriales) (Agosto de 1987) (\$ (incluido IVA)	COSTO EN EL PROCESO (\$)
Sacarosa (azúcar estándar)	7,283.11	496,302.62/ton	3'614,572.80
Extracto de Levadura	212.00	7'555,669.80/ton	1'601,802.20
K ₂ HPO ₄	212.00	4'919,245.30/ton	1'404,288.00
MgSO ₄	2.12	546.41/kg	1,158.40
FeSO ₄	0.10	377.72/kg	37.72
MnSO ₄	0.10	2,720.00/kg	272.01
CaCl ₂	5.27	5,593.23/kg	29,476.36
NaOH	350.80	1'391,039.90/ton	487,976.83
H ₂ SO ₄ (Conc.)	362.29	188,001.10/ton	68,094.00
Alcohol Etilico	100,076.24*	1,283.40	<u>se recupera</u>
			\$ 7'207,687.40

* litros.

Balance de Costos mensual de materias primas necesarias para
producir 1 ton de dextrana nativa, 472 kg de fracción
70,000 y 506 kg de fracción 40,000.

\$/Kg de dextrana nativa = 2 245.58

2.6.1. Rentabilidad. Factibilidad del Proceso

En cualquier fase de investigación es necesario tomar decisiones sobre el aprovechamiento óptimo de los recursos disponibles. En las fases de diseño, construcción y operación estos recursos limitados se transforman en recursos de mayor valor.

Tanto durante el diseño como durante la operación del sistema debe tenderse a un aprovechamiento óptimo de los recursos, es decir, deben minimizarse el costo de insumos y maximizarse el valor del producto. Esta transformación de un conjunto de recursos en otro grupo de mayor valor debe realizarse no solamente de acuerdo con las leyes físicas que gobiernan al proceso de transformación, sino también tomando en cuenta factores económicos, de ahí la importancia de esta sección.

En resumen, cuando nos enfrentamos a un problema de análisis o de diseño, se tienen que tomar en cuenta los factores siguientes:

1. Las leyes físicas o de otra índole que gobiernan la transformación de insumos en productos, como hemos estudiado hasta aquí.
2. El valor asociado a los insumos, o sea, a los recursos empleados por el sistema.
3. El valor de los productos generados por el sistema.

Para tomar esta decisión, respecto a la asignación más adecuada de recursos, es necesario conocer el modelo que relaciona los insumos con el producto. Este modelo se conoce con el nombre de función de producción. El problema de optimización consiste en maximizar el incremento de valor, sujeto a las restricciones de la función de producción.

Para optimizar y determinar la factibilidad de este proceso se determinó utilizar el Método Simplex (Véase anexo 1) por las siguientes razones:

- i. Es un proceso nuevo que no se cuentan con antecedentes históricos.
Lo que implica las siguientes consideraciones que se pueden limitar.
- ii. La demanda del producto aumenta con el tiempo.
- iii. La capacidad de producción se puede ampliar.
- iv. Los inventarios se pueden acumular o reducir.
- v. El método no se ve afectado por cambios tecnológicos e inflación.

Por lo cual el modelo únicamente determina el óptimo de productos a producir exclusivamente para que sea rentable el proceso.

Diseño Experimental

Asignación Óptima de Recursos Limitados

Descripción del Problema

En una planta industrial de fermentación, se cuentan con los siguientes equipos:

A. Tanque de Preparación del Medio de Cultivo

B. Esterilizadora

C. Fermentador (Tanque de Reacción)

D. Tanque de Precipitación

E. Tanque de Hidrólisis

F. Centrífuga

G. Tanques de Fraccionamiento

H. Secador por Aspersión

I. Pulverizador

En dicha planta industrial se pueden manufacturar productos:

a. Biomasa

1

b. Dextranas de bajo peso molecular 2

c. Dextranas de alto peso molecular 3

El tiempo (horas) empleado por cada máquina para el acabado del producto, el número de horas efectivas de trabajo de cada equipo y la utilidad neta obtenida por la venta de cada producto terminado están dadas en la siguiente tabla:

Tipo de Equipo	(hrs) Tiempo útil de Trabajo al mes	P R O D U C T O S		
		1	2	3
A Medio Cultivo	125	24	24	24
B Esterilizador	150	16	16	16
C Fermentador	600	14	14	14
D Precipitación	492	2	2	2
E Hidrólisis	585	5	5	5
F Centrífuga	418	3	3	3
G Fraccionamiento	375	-	3	3
H Secador	492	-	6	6
I Pulverizador	492	-	2	2
Porcentaje que se obtiene del costo de producto	Utilidad Unitaria (\$)	35	90	100

Condiciones de Operación y Limitaciones

Para que la producción sea rentable se requiere que el número de artículos Kg/elaborados sea mayor de 1 200 por mes.

Determine el número de Artículos de cada tipo que se deben producir en el mes para que, la ganancia obtenida sea máxima.

Hay que considerar que todos los productos elaborados son vendidos.

Nota: Rentabilidad en términos de unidades producidas por unidad de costo.

Solución:

El Modelo Matemático del problema planteado es:

$$\text{Max } Z = 35 X_1 + 90 X_2 + 100 X_3$$

Restricciones:

$$24 X_1 + 24 X_2 + 24 X_3 \leq 125$$

$$16 X_1 + 16 X_2 + 16 X_3 \leq 150$$

$$14 X_1 + 14 X_2 + 14 X_3 \leq 600$$

$$2 X_1 + 2 X_2 + 2 X_3 \leq 585$$

$$5 X_1 + 5 X_2 + 5 X_3 \leq 492$$

$$3 X_1 + 3 X_2 + 3 X_3 \leq 418$$

$$3 \quad 3 \leq 375$$

$$6 \leq 375$$

$$2 \leq 492$$

$$X_1 + X_2 + X_3 \geq 12000$$

Condiciones de No Negatividad

$$X_i \geq 0, \quad i = 1, 2, 3, 4$$

**** SALIDA DEL PROGRAMA ****

Toma de Decisiones bajo condiciones de incertidumbre.

a. Criterio Max-Min

El valor óptimo es: 0.50 $A_4 - R_1$

b. Criterio Max-Max:

El valor óptimo es: 1.0 $A_1 - R_1$

c. Criterio de Hurwicz:

El valor óptimo es: 0.93 $A_1 - R_2 = 0.5$

d. Criterio de Arrepentimiento:

El valor óptimo es: 0.80 $A_2 - R_2$

e. Criterio de Laplace:

El valor óptimo es: 0.80 $A_2 - R_2$

R
E
S
U
L
T
A
D
O
S

A L T E R N A T I V A S

	16.5	12.0	10.0	8.0	Tiempo de Fermentación (hrs)
12,000	1.00	0.92	0.74	0.50	
15,000	0.93	0.80	0.65	0.48	
22,000	0.79	0.64	0.59	0.42	

Kgs/mes producidos.

Tabla 2.4. Matriz de Alternativas - Resultados

Los valores mostrados en esta figura corresponden al valor presente de cada combinación alternativa-resultado; calculado de acuerdo con:

El rendimiento y tiempo de fermentación están tomados de la fermentación retroalimentada en volumen de 4.0 l con control de pH; Gráfica 2.9. Multiplicados por la relación de aumento en la producción mensual, calculado a partir del método Simplex.

Para decidir cual criterio elegir entre varias posibles alternativas, reducidas a sólo tres; se puede determinar si lo colocamos en función de un sólo atributo:

- a. Por rendimiento y Calidad: $A_1 - R_1$

b. Por Rentabilidad Global del Proceso: $A_1 - R_2$

c. Por Criterio bajo Condiciones de Incertidumbre: $A_2 - R_2$

**** SALIDA DEL PROGRAMA ****

Optimización de la Producción de Dextranas.

Método Simplex.

******* Los valores que optimizan la función son :

X_4	0.15326E+04
X_8	0.22896E+04
X_1	0.18742E+04

Valor de la función que se está optimizando:

0.493643E+06

2.7. SIMULACION DEL PROCESO.

De acuerdo con el objetivo general planteado en este trabajo, para la realización de diferentes tipos de simulaciones en este proceso; y considerando que no se tienen los suficientes datos históricos para poder validar los resultados que se pudieran obtener de dichas simulaciones, se diseñó una experimentación de simulación de tal forma que diera validez al programa utilizado, comparando los resultados obtenidos con estas simulaciones y los resultados experimentales de este trabajo.

Para tal efecto se realizaron:

- a. Estudio cinético de la dextransacarasa (gráfica 2.22), en donde se evalúa la desviación que se tienen con los datos experimentales obtenidos en este trabajo. El índice de correlación es de 0.793, el más cercano obtenido con los valores de las constantes cinéticas obtenidas en este trabajo.

Se muestra esta comparación gráficamente (gráfica 2.24).

- b. Se efectúa una simulación del proceso para obtener la máxima concentración de sacarosa en función de su productividad.

Para esto se evaluó el modelo obtenido en la experimentación de este trabajo y que se muestra en el Capítulo de conclusiones. Los resultados se observan en la gráfica 2.23.

El índice de correlación obtenido con los datos experimentales fue de 0.843.

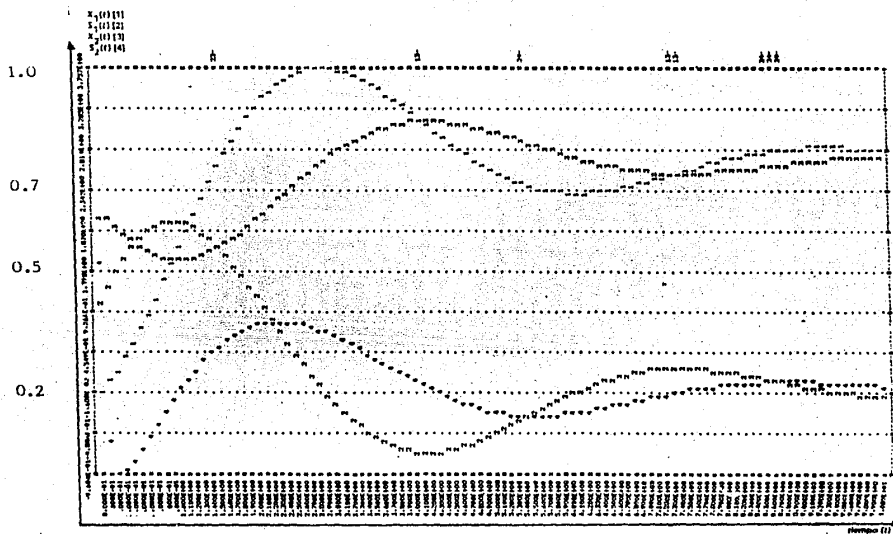
z

Por último se simuló el proceso de síntesis de dextranas evaluando la

velocidad específica de crecimiento, variando diferentes volúmenes de reacción. En la gráfica 2.21 se muestran los resultados obtenidos con el programa utilizado; además del volumen de 400 lts., que fue el que obtuvo la mínima velocidad con el máximo rendimiento.

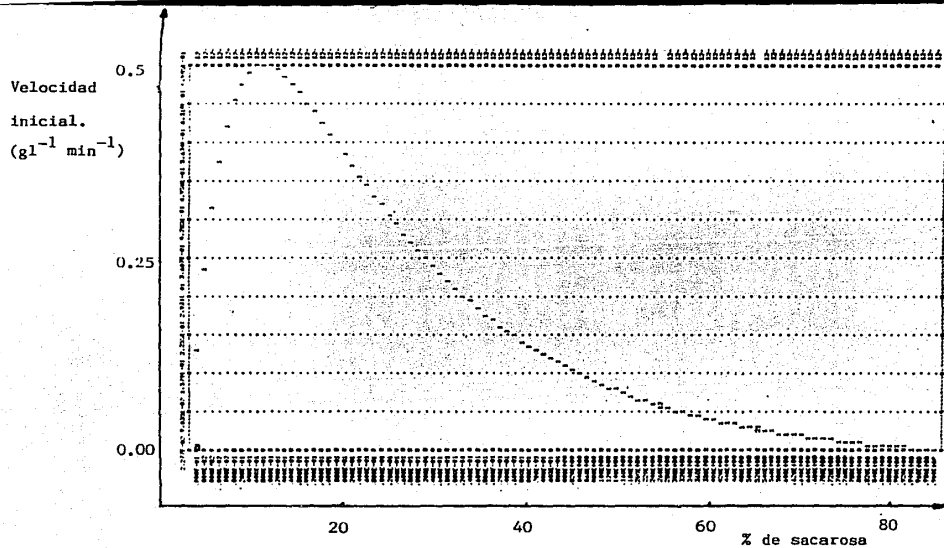
Los resultados, conclusiones y recomendaciones generales están incluidas en el capítulo siguiente.

velocidad
específica
de
crecimiento



Gráfica 2.21. Simulación de la velocidad específica de crecimiento a diferentes volúmenes de fermentación.

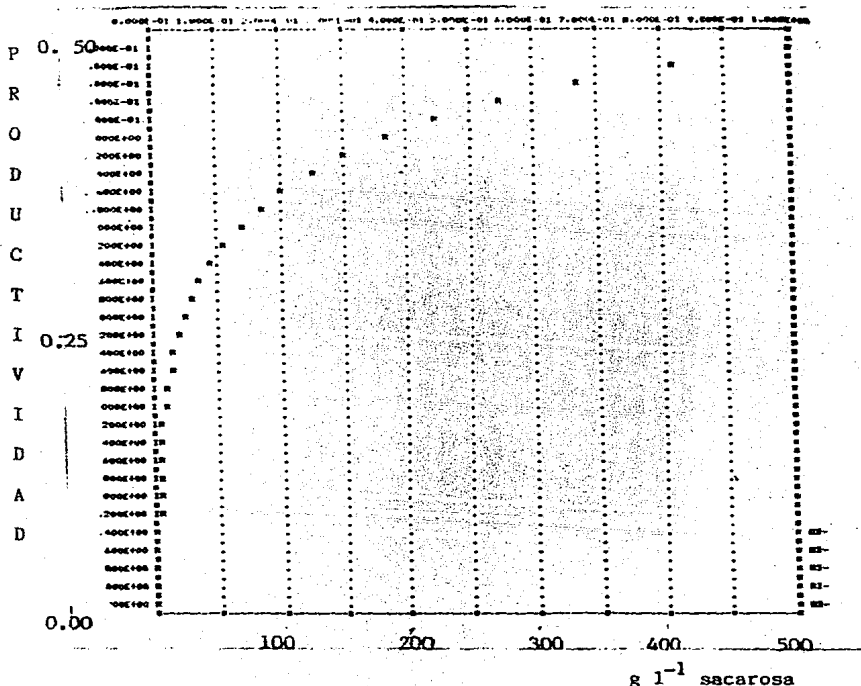
2 2 2	0.5 lts	1 1 1	400.0 lts
' ' '	3.0 lts	3 3 3	14.0 lts



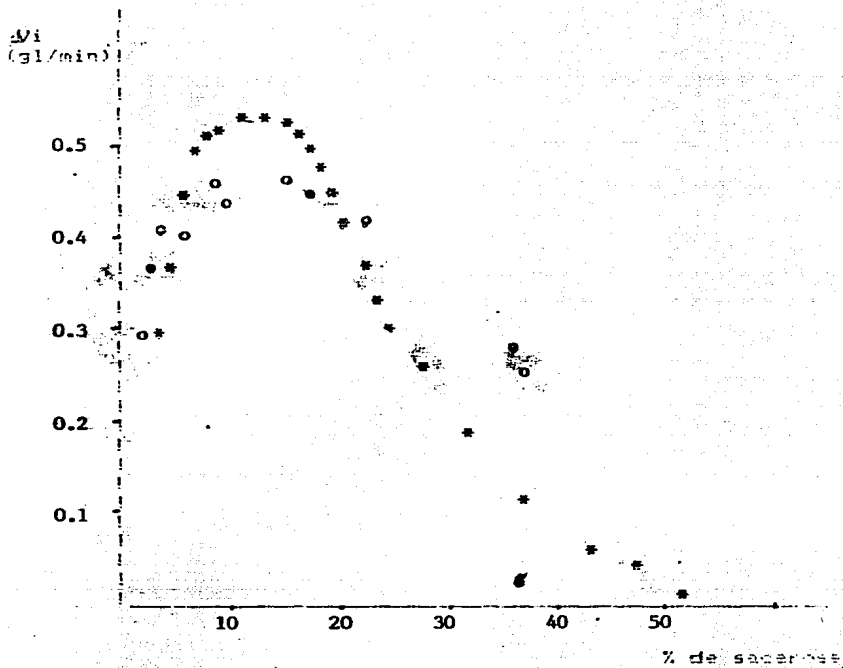
Gráfica 2.22. Simulación del estudio cinético de la dextranasa.

GRAFICA DE LA FUNCION

$$S_0 \left[P_{m\acute{a}x} = \frac{T_m V_{m\acute{a}x} + K_m \ln(1-x)^{-1}}{k_i \frac{2x - x^2}{2}} \right]$$



Gráfica 2.23. Simulación para obtener la concentración necesaria para la obtención máxima de sacarosa.



GRAFICA 2:24.

Estudio Cinetico de la Dextransacarasa.

o - o Real.

* - Simulada.

Indice de correlacion = 0.788

CONCLUSIONES

A. CINETICA

De las gráficas 2.14, 2.15, 2.16 y del análisis de éstas, 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. Sólo se logra 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:

$$P = \frac{\text{dextranas producidas}}{\text{tiempo invertido en la producción}}$$

$$P = \frac{S_0}{t_{\text{muertos}} + t_{\text{reacción}}} \quad \text{C-1}$$

Debe existir un óptimo para el cual:

$$\frac{dP}{dS_0} = 0 \quad \text{C-2}$$

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

$$P = \frac{S_0 x V_{m\acute{a}x}}{t_{\text{muertos}} V_{m\acute{a}x} + K_m \ln(1-x)^{-1} + S_0 x + \frac{K_i S_0^2}{2} (2x-x^2)} \quad \text{C-3}$$

Derivando esta expresi3n con respecto a S_0 y despejando el valor de concentraci3n inicial, se obtiene:

$$S_0 \Big|_{P_{m\acute{a}x}} = \sqrt{\frac{t_{\text{muertos}} V_{m\acute{a}x} + K_m \ln(1-x)^{-1}}{\frac{K_i}{2} (2x - x^2)}} \quad \text{C-4}$$

Al sustituir los datos obtenidos para los parámetros cinéticos, considerando que los tiempos muertos (lavado, vaciado y otros) son mínimos y para una conversi3n del 0.99, esta ecuaci3n 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 ecuaci3n C-3 se sustituyeron los tiempos de reacci3n necesarios para alcanzar la máxima conversi3n provenientes de las corridas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato. En la gráfica 2.17 puede constatarse, que en efecto, una concentraci3n inicial de 150 g/l. resulta en una máxima productividad.

B. FERMENTACION

Del diagrama de flujo de la figura 2.3 con un tratamiento para un litro se tienen las siguientes conclusiones:

1. 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.
2. 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.
3. El 19.7% es obtenido como dextrana de peso molecular entre 10 000 y 40 000.
4. El rendimiento global en productos de interés farmacéutico, resulta ser entonces del 48.9%.
5. Las distribuciones son en lo general adecuadas para la formulación de los productos.
6. El rendimiento es superior a los reportados en la literatura (Sohns y Rogovin, 1954, referencia 66), obtuvieron 38% de la fracción 70 000 y 0% de la fracción 40 000 de P.M.
7. El extracto de la 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.

8. En lo referente a la fermentación retroalimentada, al escalar el proceso a un volumen de 14 litros, se alcanzaron iguales niveles enzimáticos que 0.5 l. (160 vs. 170 UDS/ml).

Al comparar estos resultados con los reportados por López (1980), para la fermentación retroalimentada en 3 litros, se encuentra que prácticamente son los mismos (160, 170 UDS/ml vs. 180 UDS/ml).

C. SINTESIS ENZIMATICA.

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.

D. PRODUCCION DE DEXTRANAS DE INTERES FARMACEUTICO

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 en peso molecular.

El tiempo necesario para el análisis de una muestra utilizando esta

técnica no rebasa 20 minutos, comparando con el tiempo que se alcanza en los análisis en GPC.

2. Trabajando con las mismas condiciones de temperaturas 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.

E. DISEÑO Y CARACTERIZACION 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 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 procesos a escala Piloto e Industrial.

Igualmente a manera de ejemplo se estimaron los costos de producción de esta importante materia prima, los cuales son los siguientes:

a) Costo de materias primas requeridas en el proceso:

Necesarios para producir	Obtención	C o s t o	Comercial
1000 Kgs Dextrana Nativa	\$2,245,000		\$11,898,500
472 Kgs de Dextrana Fracción 70 000	\$2,466,483		\$11,396,406
506 Kgs de Dextrana Fracción 40 000	\$2,480,412		\$10,461,396

- b) Por lo que existe una diferencia del 534% de costo de producción y del costo comercial, por lo que aún restando la depreciación del equipo e instalaciones (200%) hace que la producción industrial de Dextranas sea factible, necesaria y competitiva en el mercado interno mexicano.
- c) De el número de Kgs mensuales a producir, para que el proceso sea rentable (Tabla 2.5) se observa una capacidad total de la planta del 53.1% por lo que se puede soportar un aumento en la demanda sin una nueva inversión en equipo.

G. SIMULACION Y ESCALAMIENTO

1. De los diferentes métodos de validación en el área de simulación, el método gráfico es el más comunmente utilizado en la validación de la misma. En las gráfica 2.24 se muestran la comparación de los resultados experimentales obtenidos con los resultados de simulación del programa. El índice de correlación, que nos sirve para tener un valor comparativo a la variación explicada, nos muestra una relación cercana a los datos experimentales.
2. Cumpliendo con el objetivo de la simulación; las anteriores gráficas se pueden utilizar para experimentar con situaciones nuevas de las cuales se tienen pocos datos; además de que se pudieron verificar las soluciones analíticas obtenidas en este trabajo de investigación. Gráfica 2.22 y 2.23.
3. Con el fin anterior se realizó la gráfica 2.21 para establecer un criterio de escalamiento, por lo que se simuló la velocidad específica de crecimiento a diferentes volúmenes de fermentación. De tal gráfica, después de varias corridas de simulación se decidió escalar el proceso a 400 litros de volumen del fermentador.

4. Todos los problemas de escalamiento que se pudieran presentar en este proceso se magnifican una vez que se avanza del procesamiento por lotes al procesamiento continuo. Este último caracteriza a la industria petroquímica y acoplado a sistemas de control computarizado, permite economías de escala importantes en la producción masiva de productos de bajo valor agregado. En cambio, el procesamiento por lotes, en donde un solo lote de material se procesa de principio a fin, domina la biotecnología actual y constituye su principal liga con la biotecnología tradicional. Además, de que a gran escala, para la producción de altos volúmenes de productos de bajo valor, el procesamiento por lotes no es ni económicamente ni técnicamente viable. En otras palabras, si se va a poder competir con la industria química en general, la biotecnología tiene que adoptar el procesamiento continuo. Hay ejemplos exitosos de procesos de fermentación continua a escala comercial, especialmente en la industria cervecera y en la producción de proteína unicelular. Pero todavía no constituyen suficientemente bases para la generalización del procesamiento continuo sencillamente porque hasta ahora la complejidad del proceso ha impedido el desarrollo de técnicas de control y de recuperación del producto que pueden ajustarse a los parámetros económicos estrictos que se tienen que fijar para hacer comercialmente viable la biotecnología a gran escala

La recomendación fundamental es: en la industria química las condiciones y los costos de procesamiento se diseñan y se calculan a partir del modelaje computarizado y de la predicción teórica. Para la biotecnología, en cambio, el modelaje computarizado apenas empieza a rendir resultados. Predomina el empirismo en el diseño de bioprocesos y en el cálculo de sus costos.

Una situación, en fin, que caracteriza a las tecnologías radicalmente nuevas. Los logros de laboratorio han demostrado que el potencial de la biotecnología es inmensa. Falta atacar y dominar los problemas de escalamiento. Las compañías que empiezan con esto, ahora, serán aquellas que , quizá en una década más, obtengan beneficios considerables.

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

- 1) Aiba S., Humphrey A. E. and Millis N. F.; Biochemical Engineering, 2nd 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) Alvarez Gallegos Joaquín., Introducción a Sistemas Dinámicos: Un enfoque Geométrico. CINVESTAV, Depto. de Ingeniería Eléctrica. Vol. No. 6 1985.
- 5) Alvarez Gallegos Joaquín. Modelado de Procesos de Fermentación, de destilación. CINVESTAV. Depto de Ingeniería Eléctrica. Vol. No. 5, 1985.
pág. I-1 - III-18.
- 6) Barker P. E., Ellison F.J. and Hatt B. W.; British Pat. 1,502,913 (1978).
- 7) Barker P.E., Hatt B. W. and Williams A.N.; Chromatography, Vol. 11, (1978); págs 587.
- 8) Barker P. E., Hatt B. W. and Vlanchoyiannis G.J.; "Suitability of TSK-gel Toyopearl packing for the gel permaton chromatographic analysis of dextran". — Journal of chromatography. — Vol 208, (1981) págs 74-77.
- 9) Bechhofer, R. E.,Dunnett, C.W., y Sobe, M; A Two-Sample Multiple Decision Procedure for Ranking Means of Normal Populations with a Common Unknown Variance; Biometrika, XLI (1954), págs. 170-176.
- 10) Bergey D.H.; Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., Ed. R.E. Buchanan and Gibbons N.E.; Publ. Williams and Wilkens. (1974).

- 11) Bordni, Ch. P.; Simulation of Information and Decision Systems in the Firm. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, Inc., 1963.
- 12) Bos, G.E.P., Wilson, K.B.; "On the Experimental Attainment of Optimum Conditions". Journal of the Royal Statistical Society V, XIII (1951), págs. 1-45.
- 13) Burdick, D.S., Naylor, T.H. The Use of Response Surface Methods to Design of Computer Simulation Experiments with Models of Business and Economic Systems; T.H. Naylor, ed Durham, C.N.: Duke University Press, 1969.
- 14) Burdick, D.S.; Naylor T.H.: Design of Computer Simulation Experiments for Industrial Systems. Communications of the ACM, IX (1966), págs. 329-339.
- 15) 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.
- 16) Chen Y.E. and Kaboli H.; En project. 1045; Eng. Res. Inst., Iowa State University Ames Iowa Final Report, (1976) págs. 136-162.
- 17) Chernoff, H.; "Sequential Design of Experiments". Annals of Mathematical Statistics, XXX (september, 1959) págs. 775-770.
- 18) Cochran, W.G. y Cox, G.M.; Experimental Designs. New York : John Wiley & Sons, 1957.
- 19) Cohen, K.J. y Cyert, R.M.; "Computer Models in Dynamics Economics". The Quarterly Journal of Economics, LXXV (february 1961) págs 112-127.
- 20) Colin H. et Belval H.; Sur la Constitution du Dextrane; Compt. rend. acad. Sci. (Paris), Vol.210, (1940) págs. 517-520.
- 21) Conway, R.W.; Some Tactical Problems in Digital Simulation. Management Science, X (october 1963), págs 47-61.

- 22) Dahl, O.J. Myhrhaug, B. y Nygaard, K.; "Some Features of the SIMULA 67 Language". Proceedings of the Second Conference on Applications of Simulation, New York (december,1968) págs. 2-4.
- 23) Ebert, K.H.; Shenk S.; "fermentopolymerization III Reindarstellung und charakterisierung von Dentransaccharase aus Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F"; Naturfoschg, 17b, (1962); págs. 732-738.
- 24) Ebert K.H.; Shebk S.; "Machanisms of Biopolymer growth; The formation of dextran and levan"; Adv. in Enz., Vol. 30 (1968) págs 732-738.
- 25) Evans, M.; Computer Simulation of Nonlinear Econometric Models. The Designs of Computer Simulation Experiments, T.H. Naylor (ed), Durham, C.N Duke University Press, 1969.
- 26) Edwards V y Wilke C.; "Mathematical representation of batch culture data". Biotechnology and Bioengineering; Vol. X, 1968.
- 27) Edwards V.; "The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics". Biotechnology and Bioengineering; vol. XII, 1970.
- 28) Enlace. Revista Científica, Técnica y Educativa. El Campo de la Ingeniería en Alimentos. Julio-agosto de 1985. pág 5 - 9.
- 29) Eroshin V. K. et al.; "Influence of pH and temperature on the substrate yield coefficient of yeast growt in a chemostat". Biotechnology and Bicengineering; Vol. XVIII, 1976.
- 30) Feigenbaum, A.V.; Control Total de Calidad. Compañía Editorial Continental, S.A., 1973.
- 31) Fishman, G.S. y Kiviat, P.J.; "The Analysis of Simulation-Generated" Time Series. Management Science, XIII (march 1967) págs 525-557.
- 32) Foster F.H.; Process Biochem. Vol. 3 (1968); págs. 15-19 y 55-62.
- 33) Fredrickson, A., Megee, R. y Tsuchiya H.; "Mathematical models for fermentation process". Advances in Applied Microbiology. Vol. 13, 1970.

- 34) Gross, D. y Ray, J.L.; "A General Purpose Forecast Simulator". Management Science. XI (april,1965), págs 119-135.
- 35) Goodman A., Weil R.M. y Stern K.G. ; "On the Mechanism of Dextran Formation, Chromatography Studies with c^{14} -labeled Sugars". J. Biol. Chem., Vol. 217, (1955); págs. 977-985.
- 36) Itaya K. and Yamamoto T.; Agr. Biol. Chem. Vol. 39 (1975) págs 1187-1192
- 37) Hellman N.N. and Tsuchiya H.M.: "Controlled Enzymatic Synthesis of Dextran". Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 47 No.8 (1955); págs. 1593-1597.
- 38) 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.
- 39) Jeanes A.; Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 5, (1965), Academic Press; pág 127.
- 40) Kaboli H. and Reilly P.J.; Biotech. and Bioeng. Vol. 22 (1980) págs 1055-1069.
- 41) King, E.P. y Smith, R.N.; "Simulation of an Industrial Environment. Proceedings of the IBM Scientific Computing Symposium on Simulation Models and Gaming. With Plains", N.Y.: IBM 1966.
- 42) Kiepatrick, E.G.; Quality Control for Managers and Engineers. J. Wiley & Sons, Inc.; 1970.
- 43) Koepsell H.J. and Tsuchiya H.M.; J. Bacteriol. Vol 63 (1952) págs 293 295
- 44) Koepsell H.J. and Tsuchiya H.M."Enzimatic Synthesis of Dextran". J. of Biol. Chem., Vol. 200 (1952); págs 793-801.
- 45) Kono T. y Asai T.; "Kinetics of Fermentation Processes". Biotechnology and Bioengineering. Vol. XII 1969.
- 46) Kurt J. and Curt E.; A Process for the Production of Dextran; European patent application, Pat. No. 87,404.

- 47) Lehniger A. L.; Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. 3a. reimpresión, págs 162-163 y 989-1000.
- 48) López Munguía C.A.; Production, Purification et Immobilisation de la Dextrana-saccharase de Leuconostoc mesenteroides; Tesis Doctoral, INSA Toulouse, Francia, (1979).
- 49) López Munguía C.A. and Monsan P.; Dextran Synthesis by Immobilized Dextran sucrose; Biochimie. Vol. 62 (1980) págs 323-329.
- 50) Martínez Espíndola, Jorge. "Desarrollo de un proceso para la producción Industrial de Dextranas. Tesis para Obtener el Título de Ingeniero Bioquímico.
- 51) Mc Cabe M.M. and Smith E.E. "The Dextran Acceptor Reaction of Dextran Sucrase from Streptococcus mutans KI-R ". Carbohydrate Research. Vol 63 (1978); págs. 223-239.
- 52) Moo-Young M. "Economics of SCP production". Process Biochemistry. May 1977.
- 53) Monod J. "The growth of bacterial cultures". Annual Review of Microbiology. Vol. III, 1949.
- 54) Monsan P. and López Munguía C.A. "On the Production of Dextran by Free and Immobilized Dextran Sucrose". Biotechnology and Bioengineering.
- 55) Naylor, T.H., Balintfy, Joseph L., Burdick, D.S y Chu, Kong. Computer Simulation Techniques. N.Y. : Jonh Wiley & Sons, 1966.
- 56) Naylor, T.H. Burdick D.S. y Sasser, W. Earl. "Computer Simulation Experiments with Economics Systems: The Problem of Experimental Design".
- 57) Naylor, T.H. y Finger, J.M.; "Verification of Computer Simulation Models" Management Science. XIV (october 1967) págs. 92-101.
- 58) Naylor, T.H., Wertz, Kenneth Ywonacott, T.; "Methods for Analyzing Data from Computer Simulation Experiments; Communication of the ACM," X (november 1967), págs. 703-710.

- 59) Neely W.B. and Hallmark J; "Dextran Sucrase and the Role Of Metal Ions in Enzyme Catalysis ". Nature. Vol. 191 (1961) págs 385-386.
- 60) Robyt J.F. and Kimble B.K.; "The Mechanism of dextran sucrase action" Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 165 (1974) págs 634-640.
- 61) Robyt J.F. and Taniguchi H.; "The Mechanism of Dextran Sucrase Action". Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol 174 (1976); págs. 129-135.
- 62) Robyt J.F. and Walseth T.F.; "The mechanism of acceptor reations of Leuconostoc mesenteroides NRRL-B512F dextran sucrase". Carbohydrate Research. Vol. 61 (1978) págs 443-445.
- 63) Robyt J.F. and Walseth T.F. Carbohidr. Research. Vol. 68 (1979); págs 95-111.
- 64) Smith J.M.; Ingeniería de la Cinética Química. Cía. Editorial Continental S.A. 4a. impresión (1982) págs 157-212.
- 65) 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).
- 66) Stavely H.E.; "Clinical Dextran Composition" United States Patent Office; Pat. No. 2,708,174, (1955).
- 67) 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.
- 68) Tecante Coronel Alberto. Caracterización Reológica de las Dextranas. Tesis de Licenciatura de la Carrera de Ing. en Alimentos. México, 1983. pág.18 - 123.
- 69) 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.

- 70) Vilchis Villaseñor, C.H.; "Gráficas de Control". Sistemas de Calidad.
No. 33, Ene-Feb 1978.
- 71) Vilchis Villaseñor, C.H. "Gráficas de Control". Sistemas de Calidad.
no. 34, Mar-Abr, 1978.
- 72) Wieman R.L.; Preparing Clinical Dextran; United States Patent Office;
Pat. 2,784,143.
- 73) Wolff I.A.; " Fractionation of Dextran Products"; United States Patent
Office; Pat. 2,712,007, (1955).
- 74) Yost R.W. Ettore L.S. And Conlon R.D.; Practical Liquid Chromatography.
Perkin-Elmer, (1980).

ANEXO I

OPTIMIZACION

1. APLICACIONES

En diversas situaciones, para la toma de decisiones relacionadas con el uso eficiente de una serie de recursos o asignación óptima de recursos limitados, es necesario construir un Modelo Matemático; como se planteó la necesidad en los capítulos anteriores.

En diversos problemas de Ingeniería y aplicaciones socio-económicas, como son los de diseño, planeación de sistemas y asignación de recursos, es necesario determinar el valor mínimo o máximo de una función. El valor de una función puede representar el costo de un diseño o de un sistema o el beneficio de una determinada política de asignación de recursos, entre otras funciones.

La función por optimizar (maximizar o minimizar) recibe el nombre de función objetivo y puede estar sujeta a restricciones.

2. FUNCION OBJETIVO Y RESTRICCIONES

El objetivo de esta sección es describir las técnicas de optimización que se emplearon en el análisis de este trabajo experimental. Se ha señalado anteriormente que durante la síntesis de sistemas es necesario maximizar o minimizar una cantidad, que es la medida de efectividad de una determinada operación.

No se pretende cubrir en forma exhaustiva este t3pico que es sumamente amplio. Solamente se dar3n a conocer las t3cnicas de optimizaci3n utilizadas; por ser las m3s importantes. Se har3 hincapi3 fundamentalmente en los aspectos de aplicaci3n. Para profundizar en las bases te3ricas de estos procedimientos se sugiere referirse a la bibliograf3a.

La formulaci3n matem3tica general de estos problemas es la siguiente:

Encuentrese el valor de las variables (X_1, X_2, \dots, X_n) que maximicen o minimicen a la funci3n M llamada funci3n objetivo.

$$M = M(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

Sujeta a las siguientes restricciones:

$$C_i(x_1, x_2, \dots, x_n) = 0 \text{ para } i = 1, \dots, p$$

$$C_i(x_1, x_2, \dots, x_n) \leq 0 \text{ para } i = p + 1, \dots, r \quad A. 1$$

$$C_i(x_1, x_2, \dots, x_n) \geq 0 \text{ para } i = r + 1, \dots, m$$

Por razones que se se3alan en la secci3n de programaci3n lineal de este anexo es deseable que todas las restricciones sean igualdades, es decir del tipo.

$$C_i(x_1, x_2, \dots, x_n) = 0 \text{ para } i = 1, 2, \dots, N$$

3. TECNICAS DE OPTIMIZACION

Entre las t3cnicas de optimizaci3n, la programaci3n lineal es la m3s empleada, ya que al no ser una t3cnica de enumeraci3n de posibles soluciones y posterior b3squeda entre ellas de la 3ptima, no requiere de la gran capacidad de memoria que se necesita para los problemas de programaci3n din3mica. Adem3s resulta

un método computacionalmente muy eficiente (rápido).

Al tratar cualquier problema de programación lineal o de programación dinámica cada una de las técnicas de optimización, impone tanto a la función objetivo como a las restricciones, determinadas condiciones. Entre más estrictas son estas condiciones, tanto más eficiente es la técnica de optimización correspondiente. La programación lineal al imponer condiciones sumamente estrictas, es de una de las técnicas más rápidas y poderosas de optimización.

Es importante aclarar que la naturaleza del problema de optimización indica el tipo de técnica que debe emplearse para la solución. Si un problema no cumple con las condiciones que impone alguna de las técnicas de optimización, es posible, frecuentemente, reformularlo para que cumpla con las restricciones de determinada técnica de optimización.

Antes de describir el método simple de programación lineal, se introducen algunos conceptos preliminares adicionales.

4. SOLUCION FACTIBLE

Probablemente es difícil familiarizarse con el concepto de punto en un espacio de N dimensiones, donde N es un número que puede ser mayor de tres. En este trabajo al hablar de las coordenadas de un punto, estas no necesariamente se restringen a tres. Es decir, se hará una extensión del concepto geométrico de tres coordenadas de un punto del espacio, a N coordenadas.

Se emplearán en forma indiferente los términos de coordenadas de un punto

o variables (x_1, x_2, \dots, x_n) se designarán con R la región del espacio de N dimensiones cuyos puntos satisfacen todas las restricciones.

Para poder ilustrar este concepto, consideremos las siguientes condiciones:

$$\begin{aligned}x_1 + x_2 &\leq 4 \\2x_1 + x_2 &\leq 6 \\x_1 &\geq 0 \\x_2 &\geq 0\end{aligned}$$

Para determinar la zona donde se cumplen las 4 restricciones es necesario encontrar la región del plano, donde se satisfacen simultáneamente las 4 restricciones. Para visualizar esta zona se sobrepone las zonas mostradas en la figura 1.

Recibe el nombre de SOLUCION FACTIBLE de un problema de optimización, cualquier punto o conjunto de variables.

$$x = (x_1, x_2, \dots, x_n) \text{ que satisfacen las restricciones}$$

La región R está formada por lo tanto por todas las soluciones factibles x; empleando la terminología de la teoría de conjuntos se puede escribir:

$$x \in R$$

Un punto x^* que satisface las restricciones y por lo tanto es una solución posible del problema de optimización y además cumple con la condición:

$$M(x^*) < M(x), \quad x \in R$$

recibe el nombre de mínimo global de la función objetivo M(x) que se definió anteriormente

Es decir x^* es un punto o conjunto de valores $(x_1^*, x_2^*, \dots, x_n^*)$ de las variables del problema de optimización, que cumple con las restricciones del problema y para el cual la función objetivo $M(x)$ es menor que para cualquier otro punto. Tal es el objetivo de cualquier técnica de optimización de encontrar precisamente ese punto.

5. PROGRAMACION LINEAL

5.1. Introducción.

El propósito de la programación lineal es encontrar la solución óptima que maximice o minimice la función objetivo (también de tipo lineal) y que satisfaga las restricciones. De los métodos existentes probablemente el más empleado es el método Simplex de Dantzing (58), que se usará para el programa.

Las características que debe de reunir el tipo de problema de programación lineal que se tratará son:

1. Que el modelo sea determinístico (parámetros constantes)
2. Que las variables sean no negativas
3. Que el único objetivo sea maximizar o minimizar
4. Que las variables sean divisibles, es decir, que puedan adquirir valores fraccionarios.

La estructura general de un problema de programación lineal es:

Función Objetivo

$$\begin{array}{l} \text{Max} \\ \text{ó} \\ \text{Min} \end{array} \quad Z = \sum_{i=1}^n C_i X_i$$

5.2. METODO SIMPLEX

5.2.1. Objetivo

Obtener la solución óptima de un problema de programación lineal mediante el método Simplex.

La estructura general de un problema de programación lineal, en forma compacta es:

$$\begin{array}{l} \text{Max} \\ \text{ó} \\ \text{Min} \end{array} \quad Z = C^T X$$

sujeto a:

$$AX \geq B$$

$$X \geq 0$$

A. 6

5.2.2. Método.

Considérese el siguiente modelo de programación lineal para un sistema:

Función objetivo:

$$\begin{array}{l} \text{Max} \\ \text{ó} \\ \text{Min} \end{array} \quad Z = \sum_{i=1}^n C_i X_i$$

A. 7

Restricciones:

$$\sum_{i=1}^n A_{ki} X_i \leq B_k \quad k = 1, 2, \dots, n$$

A. 8

condiciones de negatividad:

$$X_i \geq 0 \quad i = 1, 2, \dots, n \quad \text{A.9}$$

Para obtener la solución de este modelo, es necesario convertir las desigualdades (A.8) en igualdades. El planteamiento del problema es el siguiente:

función objetivo:

$$\begin{array}{l} \text{Máx} \\ \text{ó} \\ \text{Min} \end{array} \quad Z = \sum_{i=1}^n C_i X_i \quad \text{A. 10}$$

restricciones:

$$\sum_{i=1}^n A_{ki} X_i = B_k \quad k = 1, 2, \dots, n \quad \text{A. 11}$$

condiciones de no negatividad:

$$X_i \geq 0 \quad i = 1, 2, \dots, j \quad \text{A. 12}$$

donde las variables X_i para $i = n + 1, \dots, j$ son variables de holgura artificiales. Los coeficientes de costos C_i para $i = n + 1, \dots, j$ tienen los siguientes valores:

$$C_i = \begin{array}{l} 0 \text{ si corresponde a una variable de holgura} \\ 0 \text{ si corresponde a una variable artificial y} \\ \text{esta minimizado } Z. \\ 0 \text{ si corresponde a una variable artificial} \\ \text{y esta maximizado } Z \end{array} \quad i = n+1, \dots, j$$

La primera solución básica (no nula) se forma con las n variables que tengan coeficiente unitario positivo y solo aparezca en una ecuación. Las variables

que no forman parte de la base tienen valor nulo.

El proceso del método Simplex consiste en ir cambiando las variables que pertenecen a la base en forma sistemática, hasta optimizar la función objetivo. Para describir el proceso se considerará que se desea minimizar Z ; lo anterior no origina ninguna restricción puesto que $\min Z$ equivale a $\max (-Z)$.

Al seleccionar la primera base o solución factible inicial del sistema, los elementos de la figura A.2 tendrán el siguiente valor:

$$A_{ki}^* = a_{ki}$$

$$B_k^* = B_k$$

$$Z_i - C_i = A_{1i}^* C_1^* + \dots + A_{mi}^* C_m^* - C_i$$

$$Z_0 = C_1^* B_1^* + \dots + C_m^* B_m^*$$

X_1^*, \dots, X_m^* : variables que forman la primera solución básica.

C_1^*, \dots, C_m^* : coeficiente de costos correspondientes a las variables de la solución básica.

Para resolver el sistema de ecuaciones representado en la figura A.2 se aplica el método de Gauss-Jordan.

La selección del elemento pivote para efectos de minimizado se describe a continuación:

- 1) Analizar los evaluadores netos $Z_i - C_i$ para toda la i a fin de determinar si ya se optimizó la función objetivo. El mínimo se obtiene cuando $(Z_i - C_i) \leq 0$ para toda i , si este se cumple, se detiene el proceso ;

el valor de las incógnitas que forman la base es la solución óptima. En caso contrario continuar.

- 2) Examinar todos los $(Z_i - C_i) \leq 0$ y seleccionar como columna del elemento pivote la columna j con el máximo valor $(Z_j - C_j) \leq 0$.
- 3) Para asegurar la factibilidad de la nueva solución, el renglón k del elemento pivote será aquel para el cual se tenga el mínimo valor (B_k^* / A_{kj}^*) donde $A_{kj}^* \leq 0$; j corresponde a la columna seleccionada en el paso (2). La solución será no acotada cuando $A_{kj}^* \leq 0$ para toda k .
- 4) Introducir en la base la nueva variable básica X_j , es decir, hacer $X_k^* = X_j$ y $C_k^* = C_j$.
- 5) Aplicar el método de eliminación de Gauss-Jordan a la sección II de de la figura A.1 pivotando sobre el elemento A_{kj}^* . Al efectuar esta eliminación, los nuevos valores B_j^* corresponderán a los valores (solución) de las variables que forman la base X_i^* . Las variables no básicas tienen valor nulo.
- 6) Regresar al paso (1).

Se puede presentar el caso de que el problema sea cíclico o degenerativo, lo cual es una posibilidad muy remota en problemas reales. En previsión a lo anterior, se debe establecer un número máximo de iteraciones al implementar el algoritmo en una computadora. Si se tiene un sistema con n restricciones se requerirán aproximadamente $2n$ cambios de base para llegar a la solución óptima; en base a esto se pueden establecer el máximo número de iteraciones a efectuar.

En caso de que aparezcan variables artificiales no nulas (si se emplearon) en la solución óptima; en base a esto se puede establecer el máximo número de iteraciones a efectuar.

En caso de que aparezcan variables artificiales no nulas (si se emplearon) en la solución óptima, será necesario aumentar la magnitud de sus coeficientes de costos y volver a aplicar el método Simplex al sistema de ecuaciones.

En el programa se imprimen los datos, a continuación se dan los valores de las incógnitas que forman la base, el valor de la función objetivo y los evaluadores netos para cada iteración. Al final se imprimen los valores de las variables de la base y el valor óptimo de la función objetivo. Las variables que no forman parte de la base tienen valor nulo.

5.2.3. Descripción del programa

a) Subrutinas requeridas:

Ninguna

b) Descripción de las variables:

AMAX valor del máximo evaluador neto $Z_i - C_i$ 0

AMIN valor mínimo cociente $B_{k/A_{ki}}^*$

ASK variable que indica el tipo de optimización a efectuar (MAX o MIN)

ATEMP variable de remplazo

B(i,j) elemento A_{ij} de la matriz de coeficientes estructurales.

C(i,j) coeficiente de costos C_j de la función objetivo.
COI(i,i) coeficientes de costos de las incógnitas que forman parte de la base.
D(i,j) evaluadores netos $Z_j - C_j$ que indican cuando detener el proceso.
IR e IW unidades de lectura e impresión respectivamente.
ITERA contador de iteraciones
K identificador de las variables que formaran la primera base.
L contador
LA(i,i) número de la incógnita que forma parte de la base.
LC identificador de la base que entrará a la base.
LIM límite del número de iteraciones.
LLL variable de remplazo.
LR identificador de la variable que entrará a la base.
M número de restricciones = número de renglones de la matriz de coeficientes estructurales del sistema de ecuaciones.
N número total de variables (estructurales + holgura + artificiales) = número de columnas de la matriz de coeficientes estructurales.
PO(i,i) estipulación b_i o término independiente del sistema de ecuaciones.
VALZ valor de la función objetivo.

Base	C de la base	Sol	C_1	C_2	...	C_n	...	C_m	...	C_j
		básica	x_1	x_2	...	x_n	...	x_m	...	x_j
x_1	C_1	b_1	A_{11}	A_{12}	...	A_{1n}	...	A_{1m}	...	A_{1j}
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
x_i	C_i	b_i	A_{i1}	A_{i2}	...	A_{in}	...	A_{im}	...	A_{ij}
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
x_m	C_m	b_m	A_{m1}	A_{m2}	...	A_{mn}	...	A_{mm}	...	A_{mj}
valor de Z		Z_0	$Z_1 \cdot C_1$	$Z_2 \cdot C_2$...	$Z_n \cdot C_n$...	$Z_m \cdot C_m$...	$Z_j \cdot C_j$

Figura A. 2 Tabla para aplicar el método simplex.

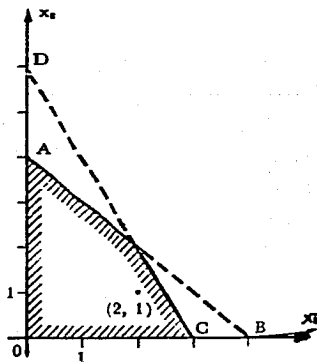


Fig. A.1 Región donde se cumplen las restricciones $x_1 + x_2 \leq 4$, $2x_1 + x_2 \leq 6$.

$$\begin{array}{r}
 2 + 1 \leq 4 \\
 2 \times 2 + 1 \leq 6 \\
 2 \leq 0 \\
 1 \leq 0
 \end{array}$$

ANEXO II

TEORIA DE DECISIONES

1. Importancia.

Todos los anteriores capítulos y secciones tienen como finalidad proporcionar elementos de información necesaria para tomar una decisión, con la que termina una de las fases de la investigación.

El propósito de este anexo, es presentar una teoría de decisiones en forma general. En particular se estudiarán la toma de decisiones concernientes a este trabajo.

Pueden presentarse diferentes situaciones:

1. Puede ser necesario tener que decidir entre diferentes alternativas cuyos beneficios se conocen, este problema se conoce con el nombre de toma de decisiones bajo condiciones de certeza.
2. Cuando se conoce la probabilidad de ocurrencia de las alternativas, se habla de decisiones bajo condiciones de riesgo.
3. Finalmente pueden presentarse situaciones donde se desconoce la probabilidad de ocurrencia de resultados. Este problema se conoce con el nombre de toma de decisiones bajo condiciones de incertidumbre.

2. Definiciones

Es importante definir algunos conceptos para tener una visión más amplia

de esta teoría.

- a. Por etapa de decisión se entiende el instante del proceso de análisis en el cual se debe de elegir entre diferentes alternativas.
- b. Por alternativas se entienden los posibles cursos de acción que se presentan a las personas que realizan el análisis.
- c. A cada alternativa o curso de acción van asociados una serie de posibles resultados. Por ejemplo, R_{ij} representa el i -ésimo resultado asociado a la j -ésima alternativa de una etapa de decisión.

Estas decisiones permiten formalizar el estudio de la teoría de las decisiones.

3. Decisiones bajo condiciones de incertidumbre.

3.1. Características

Las características de este tipo de decisiones son:

- a. Se desconoce la probabilidad de ocurrencia de resultados.
- b. Los resultados son los mismos para todas las alternativas.

Dado que las alternativas tienen los mismos resultados es más conveniente la situación de toma de decisiones bajo condiciones de incertidumbre mediante matrices

En la matriz para tomar decisiones bajo condiciones de incertidumbre, las columnas representan las diferentes alternativas (A_j), los renglones corresponden a los posibles resultados (R_i) y el elemento (V_{ij}) representa el

valor asociado con la ocurrencia del resultado R_i dado que se elija la alternativa A_i . En el caso de que sucedan simultáneamente, la alternativa A_i y el resultado R_i el valor del evento se encuentra en la posición V_{ij} de la matriz.

Existe una gran variedad de criterios para elegir alternativas bajo condiciones de incertidumbre. Los más conocidos son:

- a. Criterios de maximización del mínimo valor (max min)
- b. Criterios de maximización del máximo valor (max max)
- c. Criterio de compromiso.
- d. Criterio de arrepentimiento
- e. Criterio de Laplace

A continuación se define cada uno de estos criterios.

a) Criterio de maximización del mínimo valor (MAX MIN).

Este criterio establece que la persona que toma las decisiones debe elegir aquella alternativa que maximiza el valor mínimo que puede recibir. En otras palabras, se debe elegir la alternativa que se encuentra en la columna que contiene el mayor de los valores mínimos de cada renglón.

Esto es, el elegir una alternativa que garantice en el más pesimista de los casos, la mayor ganancia.

b) Criterios de maximización del máximo valor (MAX MAX)

Este criterio establece que la persona que toma las decisiones debe elegir

aquella alternativa que maximiza el valor máximo que se puede recibir. En otras palabras se debe elegir la alternativa que se encuentra en la columna que contiene el mayor de los valores máximos de cada renglón. Esto es, se debe elegir la opción que garantiza, en el más optimista de los casos, la que obtendrá la máxima ganancia.

c) Criterio de compromiso o de Hurwicz

La decisión de utilizar cualquiera de los dos criterios antes mencionados, depende de la personalidad del individuo que toma las decisiones.

Un individuo sumamente pesimista utilizará el criterio max min. Este criterio le permite maximizar las ganancias en el peor, o más pesimista de los casos, que es el que él piensa que puede suceder.

Un individuo pesimista es un individuo con gran aversión al riesgo. La curva de aversión al riesgo de un individuo pesimista tiene, aproximadamente, la forma que se muestra en la gráfica B.2.

Los individuos extremadamente optimistas emplean el criterio max max y tienen una curva de aversión al riesgo similar a la de la gráfica B.3 y tratan de maximizar el beneficio en el mejor de los casos.

Los individuos normales, tienen en general curvas de aversión al riesgo como la que se muestra en la gráfica B.4.

HURWICZ, propone la utilización de un criterio que combine ambos extremos tratando de obtener una solución de compromiso. Esto se logra utilizando un índice de optimismo . Dicho índice se utiliza para tomar en cuenta la personalidad de cada individuo en los valores máximos y mínimos de cada alternativa. El índice de optimismo varía entre 0 y 1 . El primer valor corresponde al extremo pesimista y el segundo, al extremo optimista.

d) Criterio de arrepentimiento

Savage (18) define como valor de arrepentimiento la diferencia entre el valor máximo de cada resultado y el valor del resultado. En otras palabras, valor de arrepentimiento es la diferencia entre el valor de cada elemento de un renglón de la matriz de la figura B.1 y el máximo valor de dicho renglón.

El criterio del arrepentimiento establece que la persona que toma decisiones deberá elegir aquella alternativa que minimice el arrepentimiento. En otras palabras, se deberá elegir la alternativa que tenga el menor de los valores máximos de arrepentimiento.

El criterio de arrepentimiento tiene el defecto de que las decisiones que se toman al aplicarlo no son absolutas. El eliminar una de las alternativas hace que cambie el resultado. Es decir, este criterio o es absoluto, sino relativo; el óptimo cambia con las alternativas.

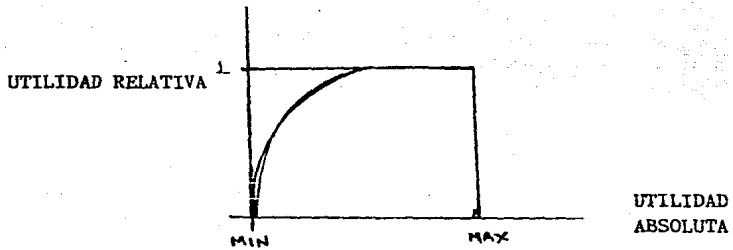


Figura B. 2. Curva de aversión al riesgo de un individuo extremadamente pesimista.

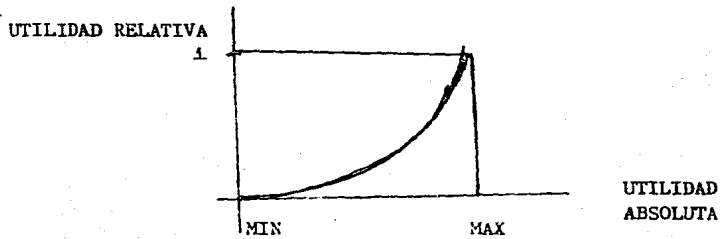


Figura B.3. Curva de aversión al riesgo de un individuo extremadamente optimista.

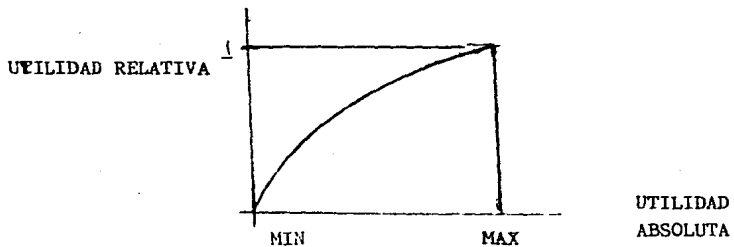


Figura B.4. Curva de aversión al riesgo de individuos normales.

e) Criterio de Laplace.

Este criterio presupone que, dado que no se conoce la probabilidad de ocurrencia de cada resultado, todos los resultados son igualmente probables.

El criterio de Laplace establece que la persona que toma las decisiones debe elegir la alternativa que maximiza el valor máximo esperado. Suponiendo que todos los resultados son igualmente probables.

La decisión de cual de los criterios mencionados anteriormente se debe emplear en la toma de decisiones es enteramente subjetiva y depende de las circunstancias particulares del sistema de estudio.

*Use una matriz

		Alternativas				
		A ₁	A ₂	...	A _n	
R e s u l t a d o s	R ₁	V ₁₁	V ₁₂	...	V _{1n}	
	R ₂	V ₂₁	V ₂₂	...	V _{2n}	
	
	
	R _m	V _{m1}	V _{m2}	...	V _{mn}	

Fig. B.1 Matriz para tomar decisiones en condiciones de incertidumbre.

*Columnas = Alternativas
 Renglones = Resultados
 Elementos = Valor de combinaciones alternativas-resultados



```
CG CALCULO DE LOS EVALUADORES NETOS QUE INDICAN CUANDO PARAR
00 17 J=1,N
01 18 I=1,M
02 19 C=C(I,J)*COI(I,1)
03 20 C=C(I,J) - C(I,J)
04 21
05 22 FIN DE LOS EVALUADORES NETOS
06 23 I=1,M
07 24 J=1,N
08 25 LA(I,1)=C(I,1)
09 26 DO I=1,M
10 27 DO J=1,N
11 28 LA(I,J)=C(I,J)
12 29 WRITE(IH,700) VALZ
13 30 WRITE(IH,700) -VALZ
14 31 DO J=1,N
15 32 DO I=1,M
16 33 C(I,J)=LA(I,J)
17 34
18 35
19 36
20 37
21 38
22 39
23 40
24 41
25 42
26 43
27 44
28 45
29 46
30 47
31 48
32 49
33 50
34 51
35 52
36 53
37 54
38 55
39 56
40 57
41 58
42 59
43 60
44 61
45 62
46 63
47 64
48 65
49 66
50 67
51 68
52 69
53 70
54 71
55 72
56 73
57 74
58 75
59 76
60 77
61 78
62 79
63 80
64 81
65 82
66 83
67 84
68 85
69 86
70 87
71 88
72 89
73 90
74 91
75 92
76 93
77 94
78 95
79 96
80 97
81 98
82 99
90 100
91 101
92 102
93 103
94 104
95 105
96 106
97 107
98 108
99 109
100 110
101 111
102 112
103 113
104 114
105 115
106 116
107 117
108 118
109 119
110 120
111 121
112 122
113 123
114 124
115 125
116 126
117 127
118 128
119 129
120 130
121 131
122 132
123 133
124 134
125 135
126 136
127 137
128 138
129 139
130 140
131 141
132 142
133 143
134 144
135 145
136 146
137 147
138 148
139 149
140 150
141 151
142 152
143 153
144 154
145 155
146 156
147 157
148 158
149 159
150 160
151 161
152 162
153 163
154 164
155 165
156 166
157 167
158 168
159 169
160 170
161 171
162 172
163 173
164 174
165 175
166 176
167 177
168 178
169 179
170 180
171 181
172 182
173 183
174 184
175 185
176 186
177 187
178 188
179 189
180 190
181 191
182 192
183 193
184 194
185 195
186 196
187 197
188 198
189 199
190 200
200 201
201 202
202 203
203 204
204 205
205 206
206 207
207 208
208 209
209 210
210 211
211 212
212 213
213 214
214 215
215 216
216 217
217 218
218 219
219 220
220 221
221 222
222 223
223 224
224 225
225 226
226 227
227 228
228 229
229 230
230 231
231 232
232 233
233 234
234 235
235 236
236 237
237 238
238 239
239 240
240 241
241 242
242 243
243 244
244 245
245 246
246 247
247 248
248 249
249 250
250 251
251 252
252 253
253 254
254 255
255 256
256 257
257 258
258 259
259 260
260 261
261 262
262 263
263 264
264 265
265 266
266 267
267 268
268 269
269 270
270 271
271 272
272 273
273 274
274 275
275 276
276 277
277 278
278 279
279 280
280 281
281 282
282 283
283 284
284 285
285 286
286 287
287 288
288 289
289 290
290 291
291 292
292 293
293 294
294 295
295 296
296 297
297 298
298 299
299 300
300 301
301 302
302 303
303 304
304 305
305 306
306 307
307 308
308 309
309 310
310 311
311 312
312 313
313 314
314 315
315 316
316 317
317 318
318 319
319 320
320 321
321 322
322 323
323 324
324 325
325 326
326 327
327 328
328 329
329 330
330 331
331 332
332 333
333 334
334 335
335 336
336 337
337 338
338 339
339 340
340 341
341 342
342 343
343 344
344 345
345 346
346 347
347 348
348 349
349 350
350 351
351 352
352 353
353 354
354 355
355 356
356 357
357 358
358 359
359 360
360 361
361 362
362 363
363 364
364 365
365 366
366 367
367 368
368 369
369 370
370 371
371 372
372 373
373 374
374 375
375 376
376 377
377 378
378 379
379 380
380 381
381 382
382 383
383 384
384 385
385 386
386 387
387 388
388 389
389 390
390 391
391 392
392 393
393 394
394 395
395 396
396 397
397 398
398 399
399 400
400 401
401 402
402 403
403 404
404 405
405 406
406 407
407 408
408 409
409 410
410 411
411 412
412 413
413 414
414 415
415 416
416 417
417 418
418 419
419 420
420 421
421 422
422 423
423 424
424 425
425 426
426 427
427 428
428 429
429 430
430 431
431 432
432 433
433 434
434 435
435 436
436 437
437 438
438 439
439 440
440 441
441 442
442 443
443 444
444 445
445 446
446 447
447 448
448 449
449 450
450 451
451 452
452 453
453 454
454 455
455 456
456 457
457 458
458 459
459 460
460 461
461 462
462 463
463 464
464 465
465 466
466 467
467 468
468 469
469 470
470 471
471 472
472 473
473 474
474 475
475 476
476 477
477 478
478 479
479 480
480 481
481 482
482 483
483 484
484 485
485 486
486 487
487 488
488 489
489 490
490 491
491 492
492 493
493 494
494 495
495 496
496 497
497 498
498 499
499 500
500 501
501 502
502 503
503 504
504 505
505 506
506 507
507 508
508 509
509 510
510 511
511 512
512 513
513 514
514 515
515 516
516 517
517 518
518 519
519 520
520 521
521 522
522 523
523 524
524 525
525 526
526 527
527 528
528 529
529 530
530 531
531 532
532 533
533 534
534 535
535 536
536 537
537 538
538 539
539 540
540 541
541 542
542 543
543 544
544 545
545 546
546 547
547 548
548 549
549 550
550 551
551 552
552 553
553 554
554 555
555 556
556 557
557 558
558 559
559 560
560 561
561 562
562 563
563 564
564 565
565 566
566 567
567 568
568 569
569 570
570 571
571 572
572 573
573 574
574 575
575 576
576 577
577 578
578 579
579 580
580 581
581 582
582 583
583 584
584 585
585 586
586 587
587 588
588 589
589 590
590 591
591 592
592 593
593 594
594 595
595 596
596 597
597 598
598 599
599 600
600 601
601 602
602 603
603 604
604 605
605 606
606 607
607 608
608 609
609 610
610 611
611 612
612 613
613 614
614 615
615 616
616 617
617 618
618 619
619 620
620 621
621 622
622 623
623 624
624 625
625 626
626 627
627 628
628 629
629 630
630 631
631 632
632 633
633 634
634 635
635 636
636 637
637 638
638 639
639 640
640 641
641 642
642 643
643 644
644 645
645 646
646 647
647 648
648 649
649 650
650 651
651 652
652 653
653 654
654 655
655 656
656 657
657 658
658 659
659 660
660 661
661 662
662 663
663 664
664 665
665 666
666 667
667 668
668 669
669 670
670 671
671 672
672 673
673 674
674 675
675 676
676 677
677 678
678 679
679 680
680 681
681 682
682 683
683 684
684 685
685 686
686 687
687 688
688 689
689 690
690 691
691 692
692 693
693 694
694 695
695 696
696 697
697 698
698 699
699 700
700 701
701 702
702 703
703 704
704 705
705 706
706 707
707 708
708 709
709 710
710 711
711 712
712 713
713 714
714 715
715 716
716 717
717 718
718 719
719 720
720 721
721 722
722 723
723 724
724 725
725 726
726 727
727 728
728 729
729 730
730 731
731 732
732 733
733 734
734 735
735 736
736 737
737 738
738 739
739 740
740 741
741 742
742 743
743 744
744 745
745 746
746 747
747 748
748 749
749 750
750 751
751 752
752 753
753 754
754 755
755 756
756 757
757 758
758 759
759 760
760 761
761 762
762 763
763 764
764 765
765 766
766 767
767 768
768 769
769 770
770 771
771 772
772 773
773 774
774 775
775 776
776 777
777 778
778 779
779 780
780 781
781 782
782 783
783 784
784 785
785 786
786 787
787 788
788 789
789 790
790 791
791 792
792 793
793 794
794 795
795 796
796 797
797 798
798 799
799 800
800 801
801 802
802 803
803 804
804 805
805 806
806 807
807 808
808 809
809 810
810 811
811 812
812 813
813 814
814 815
815 816
816 817
817 818
818 819
819 820
820 821
821 822
822 823
823 824
824 825
825 826
826 827
827 828
828 829
829 830
830 831
831 832
832 833
833 834
834 835
835 836
836 837
837 838
838 839
839 840
840 841
841 842
842 843
843 844
844 845
845 846
846 847
847 848
848 849
849 850
850 851
851 852
852 853
853 854
854 855
855 856
856 857
857 858
858 859
859 860
860 861
861 862
862 863
863 864
864 865
865 866
866 867
867 868
868 869
869 870
870 871
871 872
872 873
873 874
874 875
875 876
876 877
877 878
878 879
879 880
880 881
881 882
882 883
883 884
884 885
885 886
886 887
887 888
888 889
889 890
890 891
891 892
892 893
893 894
894 895
895 896
896 897
897 898
898 899
899 900
900 901
901 902
902 903
903 904
904 905
905 906
906 907
907 908
908 909
909 910
910 911
911 912
912 913
913 914
914 915
915 916
916 917
917 918
918 919
919 920
920 921
921 922
922 923
923 924
924 925
925 926
926 927
927 928
928 929
929 930
930 931
931 932
932 933
933 934
934 935
935 936
936 937
937 938
938 939
939 940
940 941
941 942
942 943
943 944
944 945
945 946
946 947
947 948
948 949
949 950
950 951
951 952
952 953
953 954
954 955
955 956
956 957
957 958
958 959
959 960
960 961
961 962
962 963
963 964
964 965
965 966
966 967
967 968
968 969
969 970
970 971
971 972
972 973
973 974
974 975
975 976
976 977
977 978
978 979
979 980
980 981
981 982
982 983
983 984
984 985
985 986
986 987
987 988
988 989
989 990
990 991
991 992
992 993
993 994
994 995
995 996
996 997
997 998
998 999
999 1000
```




/// 20X, 20(12, 1X, '1X')
/// 5X, 100A1, ///, 20X, 'CRITERIO DE MAXIMAX', ///, 5X, 100A1)
/// 5X, 100A1, ///, 20X, 'CRITERIO DE HURWICZ CON ALFA=
///, 100A1)
/// 10X, 12)
/// 5X, 100A1, ///, 15X, 'CRITERIO DE ARREPENTIMIENTO', ///, 5X
///, 5X, 100A1, ///, 15X, 'CRITERIO DE LAPLACE', ///, 5X, 100A1)

FOR INFORMATION: IAL7640973-6 7:10 PM WED , 26 AUG., 1987

20X,20(18 1X, 1X)
10(18 1X, 1X)
10(18 1X, 1X) 'CRITERIO DE MAXIMAY' ///,5X,100A1)
10(18 1X, 1X) 'CRITERIO DE HURWICZ' CON ALFA=1/
10(18 1X, 1X)
10(18 1X, 1X) 'CRITERIO DE ARREPENTIMIENTO' ///,5X
10(18 1X, 1X) 'CRITERIO DE LAPLACE' ///,5X,100A1)

SECRET

FIN DE IMPRESION: 1AL7840973-6 7:10 PM WED., 26 AUG., 1987