

03088

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCION
Y APLICACION DE DEXTRANASAS

Tema que presenta

MARIA AMANDA GALVEZ MARISCAL

Para optar por el título de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Comité Tutorial:

Dr. Agustín López Munguía Canales

Dr. Hermilo Leal Lara

M. en C. Fernando García Hernández

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992



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.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABLAS.....	4
INTRODUCCION	5
OBJETIVOS.....	10
GENERALIDADES	
Dextranas.....	11
Dextranasas.....	23
MATERIALES Y METODOS	
Aislamiento y selección de cepas.....	42
Preparación del inóculo.....	43
Resuspensión de esporas.....	44
Conteo de esporas.....	45
Muestreo.....	45
Medición de la actividad enzimática.....	46
Identificación y mantenimiento de las cepas.....	47
Optimización del medio de cultivo.....	48
Cinéticas de fermentación.....	48
Aplicación de la dextrana como inductor y fuente de carbono.....	50
Efecto de la glucosa como fuente de carbono.....	50
Evaluación de la actividad de dextranasa intracelular.....	51
Caracterización de la dextranasa 6R.....	52
Efecto de los productos finales de reacción y sacarosa sobre la actividad enzimática de la dextranasa 6R.....	52
Evaluación de las reacciones de hidrólisis de dextrana.....	53
RESULTADOS Y DISCUSION	
Aislamiento y selección de cepas.....	55
Morfología y taxonomía.....	56
Fermentaciones preliminares en matraces Erlenmeyer..	66
Optimización del medio de cultivo.....	70
Uso de glucosa y/o dextrana como fuente de carbono..	76
Uso de dextrana y/o dextrana hidrolizada como inductores.....	79

Evaluación de la actividad asociada al micelio y actividad intracelular.....	83
Caracterización de la enzima.....	87
Cinética enzimática y efecto de peso molecular del sustrato.....	90
Evolución de los productos de hidrólisis.....	96

CONCLUSIONES	102
--------------------	-----

REFERENCIAS	104
-------------------	-----

APENDICE I	109
------------------	-----

APENDICE II	110
-------------------	-----

RESUMEN.

Las dextranasas son enzimas hidrolíticas que degradan las gomas producidas por Leuconostoc mesenteroides y otras bacterias a partir de la sacarosa. Los problemas ocasionados por la generación de dextranas en los ingenios azucareros incluyen elevación de la viscosidad del jugo de caña, obstrucción de tuberías, deposición de material insoluble en el equipo y una disminución considerable del rendimiento del proceso. Las dextranasas se aplican en los ingenios para degradar las gomas y así evitar la elongación de los cristales de sacarosa y la deposición de dextrana sobre ellos. Las dextranasas comerciales son producidas por Penicillium funiculosum y Chaetomium gracile. En este estudio se obtuvieron varias cepas fungales productoras de dextranasa extracelular a través de un procedimiento de aislamiento y selección realizado sobre diversos ambientes como aire, tierra, jugos de caña, muestras de dextrana contaminadas, etc. Las cepas fueron identificadas y la producción de dextranasa se llevó a cabo en fermentaciones por lote en matraces Erlenmeyer. La cepa identificada como Paecilomyces lilacinus 6R fue seleccionada para la producción de la enzima. El medio de cultivo fue optimizado mediante un diseño factorial Box-Wilson evaluando la importancia de las fuentes de C y N sobre la producción de la enzima que fue elevada al doble, obteniéndose entre 36 y 42 UD/ml de sobrenadante. La dextranasa es una enzima inducible con dextrana. En la cepa 6R también puede inducirse la producción de la enzima con isomaltosa con la misma eficiencia que con dextrana, sin presentar represión catabólica. La dextranasa de la cepa 6R tiene una excelente estabilidad térmica a 60 °C, un pH óptimo de 5.4 y su velocidad no se ve afectada por la presencia de sacarosa ni por variaciones en peso molecular del sustrato. No presenta inhibición por exceso de sustrato hasta concentraciones de 60 g/l. La isomaltosa no presenta un efecto de inhibición sobre la enzima, sino que su presencia mejora la actividad enzimática. En este trabajo se logró obtener una cepa silvestre distinta de las especies usadas en la industria, que es capaz de producir dextranasa en forma extracelular y en niveles comercialmente prometedores. En general se contribuyó al desarrollo de sistemas enzimáticos para la hidrólisis de polisacáridos. Se ponen también de manifiesto aspectos relevantes de su cinética con respecto al tamaño relativo del sustrato y productos de la reacción.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Estructura de la dextrana de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> B-512F.....	13
Fig. 2.	Estructura de la dextranas producidas por diversas cepas bacterianas.....	14
Fig. 3.	Reacción catalizada por la dextransacarasa para la producción de dextrana.....	16
Fig. 4.	Diagrama de la elaboración de azúcar.....	21
Fig. 5A.	Patrón de hidrólisis de la dextranasa II de <u>P.funiculosum</u> sobre distintas isomaltodextrinas	
	B. Patrón de hidrólisis y frecuencia de ataque sobre los distintos enlaces glucosídicos de la dextranasa de <u>Penicillium lilacinum</u>	38
Fig. 6.	Cinética de producción de dextranasa con distintas cepas.....	67
Fig. 7.	Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de <u>Paecilomyces lilacinus</u> 6R en el medio con dextrana.....	71
Fig. 8.	Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de <u>Paecilomyces lilacinus</u> 6R en el medio optimizado.....	75
Fig. 9.	Efecto del pH inicial de la fermentación sobre la producción de dextranasa de <u>P. lilacinus</u> 6R...	77
Fig. 10.	Producción de dextranasa de <u>P. lilacinus</u> 6R con glucosa y dextrana como inductores.....	78
Fig. 11.	Producción de dextranasa de <u>P. lilacinus</u> 6R con dextrana e hidrolizado de dextrana como inductores.....	78
Fig. 12.	Efecto de la adición de isomaltosa como inductor en la cinética de crecimiento y de producción de dextranasa.....	82
Fig. 13.	Evaluación de la actividad asociada al micelio de <u>P. lilacinus</u> 6R.....	84
Fig. 14.A.	Efecto del pH sobre la actividad de dextranasa 6R	
	B. Efecto de la temperatura sobre la actividad de dextranasa 6R.....	88

Fig. 15.	Estabilidad de la dextranasa 6R.....	89
Fig. 16.	Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la dextranasa 6R.....	91
Fig. 17.	Evolución de la hidrólisis de varios tipos de dextrana descritos por la ecuación integrada de Michaelis Menten.....	95
Fig. 18.	Efecto de la isomaltosa sobre las velocidades iniciales de la dextranasa 6R.....	97
Fig. 19.	Disminución del tiempo de caída de jugo de caña adicionado con dextrana industrial.....	98
Fig. 20A.	Cromatograma de los estándares.....	100
Fig. 20B.	Evolución de los productos de hidrólisis de dextrana industrial de PM 5-40 millones de daltons con dextranasa 6R.....	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Inductores de dextrana.....	25
Tabla 2.	Cepas bacterianas productoras de dextranasa reportadas en la literatura.....	27
Tabla 3.	Productividad de cepas microbianas productoras de dextranasas reportadas en la literatura.....	29
Tabla 4.	Inhibición de la dextranasa II de <u>P. funiculosum</u> con distintos oligosacáridos.....	36
Tabla 5.	Composición de los medios de cultivo para la técnica de Box-Wilson.....	49
Tabla 6.	Datos del crecimiento de cinco cepas en diversos medios de cultivo.....	57
Tabla 7.	Actividad de dextranasa de cepas aisladas y algunas cepas de colección.....	69
Tabla 8.	Resultados de la actividad sobre dieciseis medios distintos.....	72
Tabla 9.	Resultados finales de la técnica de Box-Wilson.....	74
Tabla 10.	Efecto del peso molecular de la dextrana sobre las constantes cinéticas de Michaelis-Menten de la dextranasa 6R.....	93

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

La Biotecnología se ha considerado en los años más recientes como la opción más interesante para abordar y resolver problemas diversos en las áreas de salud, alimentos, energía y contaminación ambiental entre otras, al utilizar los sistemas celulares tanto de microorganismos como de células vegetales y animales. Los procesos biológicos, en su mayoría, se llevan a cabo utilizando enzimas que cuentan con las características que les permiten realizarlos de una forma extremadamente eficiente y específica. Se ha estimado que existen alrededor de 25,000 enzimas de las cuales la Unión Internacional de Bioquímica ha reconocido oficialmente 2100 (Neidelman, 1986). Las razones que soportan el desarrollo de la tecnología enzimática se resumen en cuatro características únicas de las enzimas: especificidad, eficiencia, condiciones de operación y la gran variedad de reacciones en las que las enzimas intervienen.

En las aplicaciones industriales son las enzimas microbianas las más utilizadas del mercado. Entre las enzimas de origen microbiano, las extracelulares han recibido una gran atención por la facilidad con que se recuperan de los medios de cultivo. La función natural de las enzimas extracelulares es la de hacer disponibles los nutrimentos existentes fuera de la célula, gracias a la hidrólisis de los sustratos de alto peso molecular. Estas enzimas deben tener ciertas propiedades de estabilidad para sobrevivir en el medio ambiente externo a la célula, y dada la

extensión y el volumen de ese medio ambiente, deben ser producidas en mayor cantidad que las enzimas intracelulares lo que resulta conveniente para su producción a nivel industrial.

Entre las hidrolasas que degradan biopolímeros como las amilasas, las celulasas y las proteasas, se encuentran también las dextranasas. Estas enzimas degradan una clase de polímeros que son menos abundantes en la naturaleza: las dextranas, que son polisacáridos formados por microorganismos que aprovechan la sacarosa para polimerizar la glucosa dejando como subproducto la fructosa. Entre las especies productoras de dextranas se encuentra Leuconostoc mesenteroides que es una bacteria láctica microaerofílica, que probablemente produce el polisacárido como una respuesta a un medio ambiente muy aireado como es el jugo de caña de azúcar, de la que es flora bacteriana natural. La presencia del polisacárido en el medio permite disminuir la cantidad de oxígeno disuelto en el jugo de caña, por lo que se mejoran las condiciones para el crecimiento de Leuconostoc. Sin embargo, la generación de dextranas en los ingenios azucareros durante el proceso de refinación acarrea una serie de problemas como la elevación de la viscosidad del jugo, obstrucción de tuberías y bombas, deposición de material insoluble en el equipo y una disminución considerable del rendimiento del proceso. Las dextranasas se aplican en los ingenios azucareros con el fin de degradar las gomas y así evitar también la elongación de los cristales de sacarosa y la deposición de la goma sobre ellos.

Las dextranasas comerciales se producen con Penicillium funiculosum y Chaetomium gracile. Sin embargo su aplicación es una práctica poco utilizada en México ya que implica ciertos costos que pueden variar desde \$1.00 hasta \$13.00 USD por Ton de azúcar refinada dependiendo del nivel de contaminación encontrado.

Actualmente en México no se produce dextranasa, pero tampoco los ingenios azucareros aparecen en las estadísticas como importadores de enzimas. Son las representaciones comerciales de grandes compañías productoras de enzimas las que importan las dextranasas, bajo el rubro "otras enzimas", ya que no existe un rubro específico "dextranasas" en las fracciones arancelarias correspondientes. Se sabe que en México solo dos quintas partes de los ingenios utilizan actualmente dextranasa en su proceso, por lo que el consumo de esta enzima se estima en la zafra de 1989-1990 a 4 Ton, que significan aproximadamente \$50,000 U.S. Esto lleva a la conclusión de que el uso de las dextranasas en la industria azucarera apenas se inicia y representa por lo tanto un mercado en expansión.

Con todo lo anterior como antecedente, resultó interesante plantear la búsqueda de un microorganismo con características de productividad similares a las cepas utilizadas industrialmente para la producción de dextranasas, pero diferente de las especies comerciales. Por ejemplo, resultaba interesante buscar una cepa que no fuera Penicillium para evitar problemas relacionados con

la producción de antibióticos o toxinas, o de preferencia buscar una especie GRAS. Así mismo la búsqueda debía llevarse a cabo sobre muestras de jugos de caña de ingenios mexicanos y sobre medio ambientes relacionados con la sacarosa y la dextrana.

El procedimiento de "screening" o de aislamiento y selección no es una actividad nueva. En Biotecnología es bien conocido que la primera cepa productora de penicilina capaz de crecer en una fermentación agitada provino de una toronja enmohecida, y que la cefalosporina provenía de un microorganismo del drenaje de Cerdeña. La búsqueda sistematizada de microorganismos productores de alguna enzima de interés ha sido y seguirá siendo una valiosa herramienta del biotecnólogo. La creatividad y el cuidado al aplicar la presión selectiva en el medio de cultivo, así como el muestreo sobre zonas o ambientes donde se encuentre el sustrato son las condiciones principales para obtener microorganismos naturales con las actividades deseadas. Sin embargo actualmente muchos de nuestros esfuerzos en tecnología enzimática se inclinan a tratar de maximizar la actividad de las pocas enzimas comerciales y de ampliar el número de biocatalizadores disponibles mediante la ingeniería de proteínas, en vez de explorar la naturaleza aplicando las técnicas establecidas para el "screening". Esta es una situación curiosa ya que las limitaciones en el rango y variedad de los biocatalizadores naturales no han sido ni remotamente definidas (Cheetham, 1987).

Un ejemplo exitoso de un proceso obtenido a través de un "screening" es la producción industrial de acrilamida a partir de acetonitrilo tratado con una nitrilasa microbiana (Yamaguchi, 1985).

El "screening" resulta un proceso de bajo costo ya que no se requiere de equipo especializado aunque la cantidad de trabajo involucrado es muy significativa. El método de selección de las cepas de interés biotecnológico resulta de primordial importancia. Por ejemplo utilizar placas de agar con un medio específico que permita visualizar un halo de actividad es muy conveniente. Sin embargo el diámetro del halo disminuye exponencialmente conforme aumenta la cantidad de enzima excretada al medio ambiente, por lo que algunos autores prefieren medir áreas de actividad en vez de diámetros. Otra posibilidad es relacionar el diámetro del halo con el diámetro de la colonia, aunque hay colonias sumamente compactas que son difíciles de medir y hay otras que son demasiado extendidas que enmascaran los resultados (Rowlands, 1984). Una vez seleccionada una cepa debe depositarse en una colección microbiana para ser sometida a métodos de conservación de larga duración. Así mismo debe evaluarse periódicamente su estabilidad, ya que conservar sus características biotecnológicas intactas es de vital importancia para el estudio.

El OBJETIVO GENERAL de este trabajo consistió en:

Obtener a través de un procedimiento de aislamiento y selección un microorganismo productor de dextranasa extracelular utilizando un medio de cultivo con dextrana como única fuente de carbono.

Los OBJETIVOS ESPECIFICOS son los siguientes:

Optimizar la composición del medio de cultivo para la producción de la dextranasa con el microorganismo seleccionado.

Caracterizar la cinética de producción de la enzima en fermentación sumergida en matraces Erlenmeyer.

Realizar la caracterización de la dextranasa en términos de efecto del pH, la temperatura, efecto del sustrato (concentración y peso molecular) y efecto de los productos de hidrólisis sobre la actividad enzimática.

Los principales resultados de esta investigación han sido publicados en Applied Microbiology and Biotechnology .

Se anexa una copia en el Apéndice II.

G E N E R A L I D A D E S

1. DEXTRANAS

El término dextrana fue acuñado por Scheibler en 1874 al encontrar que la causa de que se espesara el jugo de caña de azúcar era la presencia de un carbohidrato con fórmula empírica (C₆H₁₀ O₅) y con una rotación óptica positiva. Ya en 1861 Pasteur había mostrado que estas masas mucilaginosas tenían un origen microbiano, y Van Tieghem identificó a la bacteria que las produce como Leuconostoc mesenteroides. Posteriormente se demostró que la "dextrana" también es producida por numerosos microorganismos.

Dextrana o dextranas es entonces el nombre colectivo de un amplio grupo de polisacáridos bacterianos extracelulares compuestos exclusivamente de α-D-glucopiranososa, con enlaces glucosídicos de diversos tipos, que tienen estructuras variables (desde las lineales hasta las altamente ramificadas), y que se obtienen de una gran variedad de microorganismos mediante síntesis enzimática. Los microorganismos más citados como productores de dextranasas son: Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis y otras

bacterias lácticas. Todas las especies tienen una característica en común: la sacarosa es el sustrato para la producción del polisacárido (Barker, 1958; Hehre, 1949).

CLASIFICACION DE LAS DEXTRANAS

La dextrana producida por la cepa industrial de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F (Fig. 1) presenta una estructura lineal con 95% de enlaces $\alpha(1-6)$ y solamente un 5% de ramificaciones en $\alpha(1-3)$. Sin embargo también pueden encontrarse ramificaciones en otras posiciones como $\alpha(1-2)$ o $\alpha(1-4)$ dependiendo de la cepa que las produzca. Desde 1976 el grupo de Seymour del Centro Médico de Texas EUA, ha trabajado en la determinación de la estructura de dextranas producidas por diversas cepas de Leuconostoc mesenteroides y de Streptococcus mutans usando metilación, oxidación con periodato y resonancia magnética nuclear de carbono 13. Seymour y Knapp (1980), señalan que las dextranas pueden ser divididas en tres clases en base a sus características estructurales. La figura 2 esquematiza la estructura de estos polisacáridos. La clase I son las dextranas que contienen una cadena principal de residuos glucosídicos consecutivos unidos con enlaces $\alpha(1-6)$ con ramificaciones en las posiciones 2, 3 o 4. La clase II son las dextranas que contienen enlaces consecutivos $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-6)$ y ramificaciones en los enlaces $\alpha(1-3)$. Finalmente la clase III son dextranas con enlaces consecutivos $\alpha(1-3)$ y ramificaciones en $\alpha(1-6)$. El polímero que tiene enlaces alternados $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$ en una cadena lineal, se conoce como alternano. El polímero que sólo tiene enlaces $\alpha(1-3)$ en cadenas

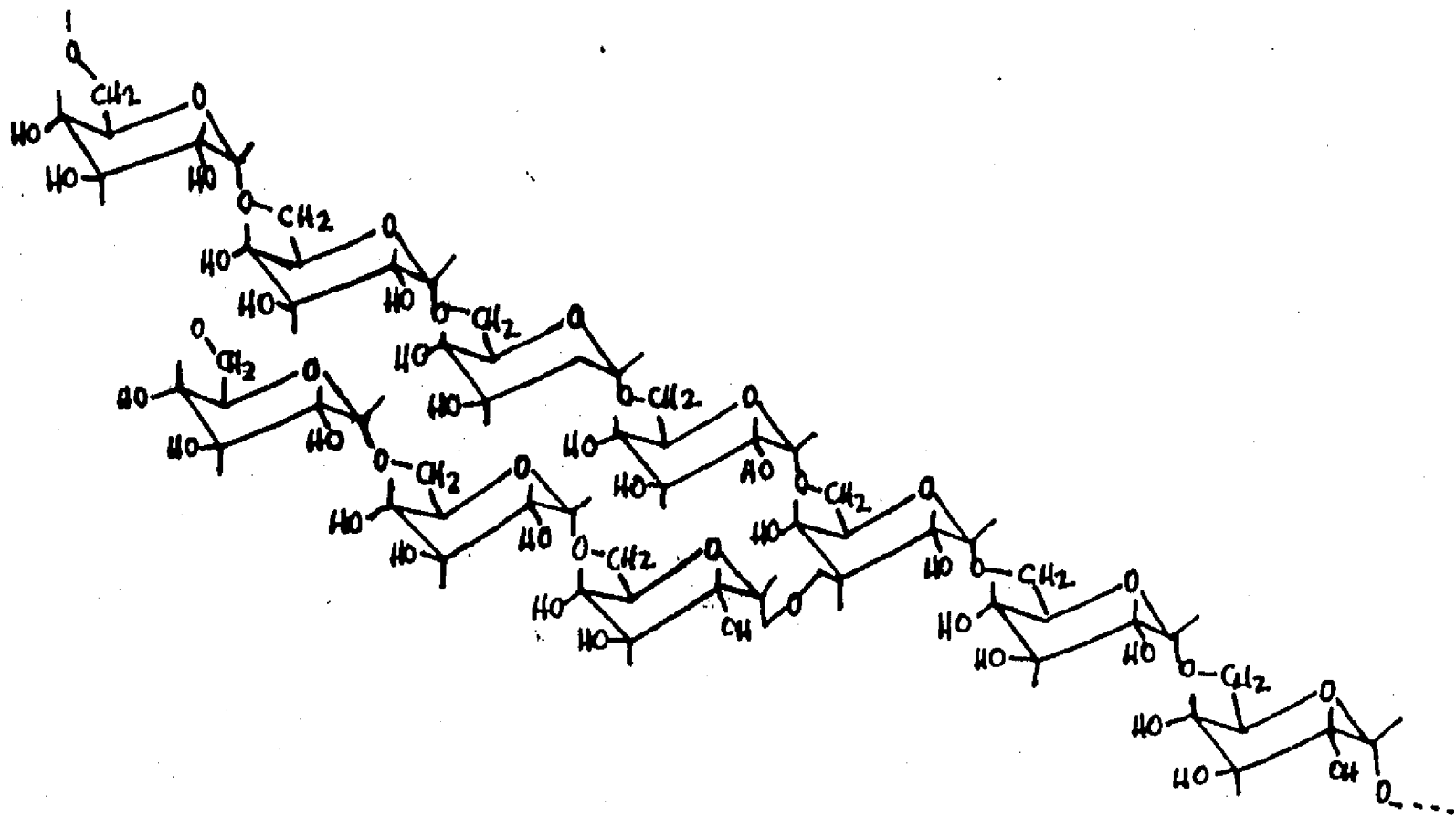


Fig. 1. Estructura de la dextrana de Leuconostoc mesenteroides B-512F.

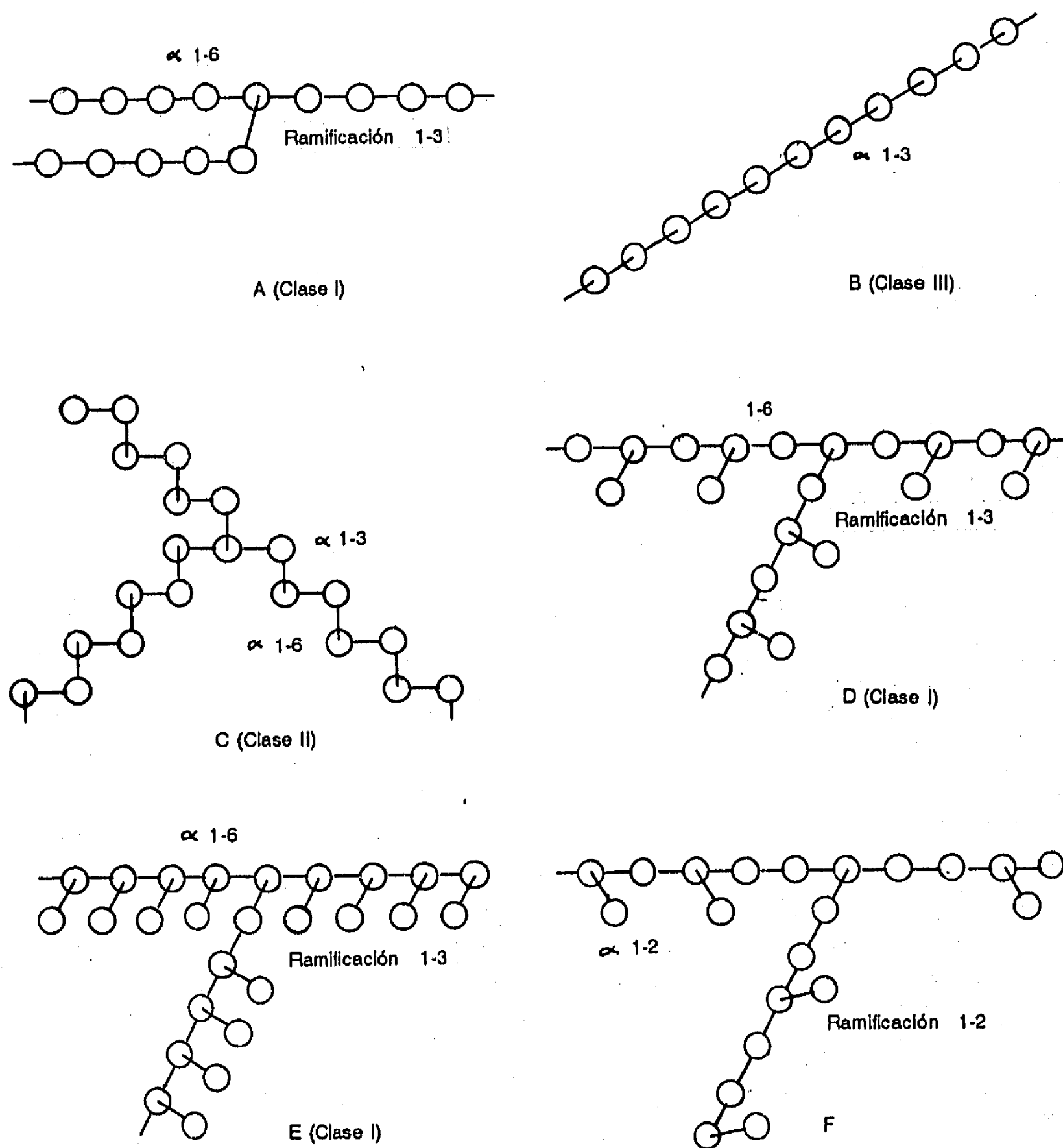


Fig. 2. Estructura de la dextranas producidas por diversas cepas bacterianas

A: Leuconostoc mesenteroides B-512F

B: Streptococcus mutans

C: Leuconostoc mesenteroides B-1355

D: Streptococcus mutans

E: Leuconostoc mesenteroides B-742

F: Leuconostoc mesenteroides B-1299

Fuente: Seymour & Knapp, 1980.

lineales se denomina mutano. La dextrana típica de L. mesenteroides es soluble en agua, pero el mutano y los polisacáridos que tienen un alto porcentaje de ramificaciones son insolubles y se encuentran presentes en la placa dental y otros depósitos microbianos, como los granos de tíficos que contienen una estructura insoluble de dextrana que da soporte a las asociaciones microbianas productoras de yogurt y kefir. La dextrana también está involucrada en la formación de los granos del nopal que son agregados o exudados de esta goma que protegen a la planta cuando sufre un daño físico como una perforación o una cortada (Borisberger, 1969). La presencia de polisacáridos insolubles en la placa dental es un mecanismo natural que permite a los microorganismos de la flora oral fijarse a una superficie tan lisa como el esmalte dental. Así entonces el proceso de desmineralización de los dientes es causado por los ácidos secretados como metabolitos primarios por la flora sostenida en la placa. De hecho se reconoce en este proceso el inicio de la caries dental.

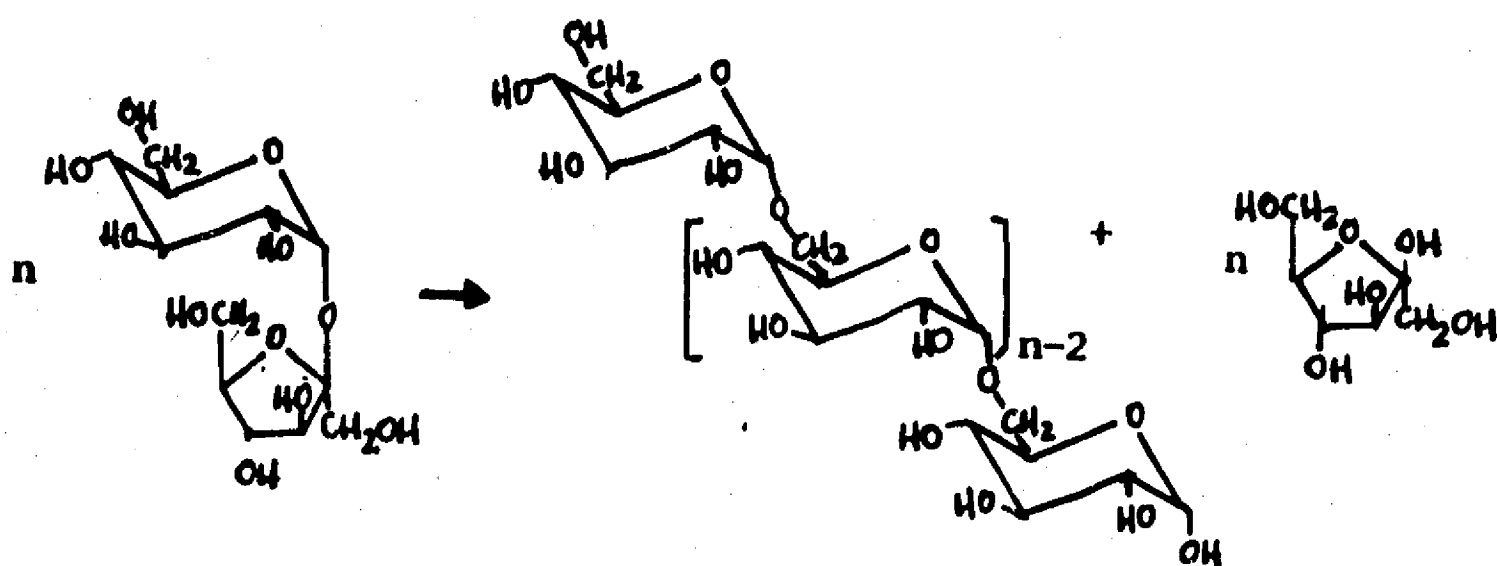


Fig. 3. Reacción catalizada por la dextransacarasa para la producción de dextrana.

SINTESIS DE DEXTRANA

La síntesis de dextrana se lleva a cabo por la acción de una glucosiltransferasa: la dextranasacarasa que cataliza la reacción de transferencia de unidades glucosil a partir de sacarosa, formando el polímero de glucosa y la fructosa como subproducto (Fig. 3).

La síntesis de dextrana a partir de sacarosa difiere de la síntesis de glucógeno o de almidón en que no requiere de intermediarios fosforilados, pues la energía necesaria para la condensación de los residuos glucosídicos es la proporcionada por la hidrólisis del enlace de la sacarosa: la energía libre de hidrólisis es de -6.6 kcal/mol, y la energía necesaria para la formación de un enlace $\alpha(1-6)$ en la dextrana es de 2.0 kcal/mol. De esta forma la reacción de la síntesis de dextrana es irreversible a causa de la gran diferencia entre las energías de hidrólisis y de condensación de acuerdo con Hehre (1946).

USOS

El polisacárido tiene aplicaciones interesantes gracias a su solubilidad y las propiedades reológicas de sus soluciones. Entre las aplicaciones propuestas para las dextranas se encuentran las siguientes:

- * Recuperación secundaria de petróleo (Sparks, 1962)
- * Lodos para perforación de pozos (Monaghan, 1959; Monaghan, 1962; Mueller, 1963; Owen, 1952)
- * Cubiertas protectoras para semillas (Peake, 1956)
- * Desfloculantes en productos papeleros (de Waals, 1945)
- * Procesos de chapado de metales (Bolton, 1961)
- * Suturas quirúrgicas (Novak, 1956)
- * Espesantes y estabilizantes en la industria alimentaria (Wadsworth y Hughes, 1946)

Estas aplicaciones en general consideran a las dextranas de alto peso molecular que alcanzan hasta los 200 millones de daltons.

Las dextranas de bajo peso molecular tienen también aplicaciones interesantes. Su síntesis se realiza bajo condiciones de reacción específicas que permiten un crecimiento controlado de la cadena. Las dextranas de bajo peso molecular tienen su mayor aplicación en la industria farmacéutica donde las fracciones de $75,000 \pm 25,000$ daltons han sido utilizadas como expansores del volumen de plasma y mejoradores del flujo sanguíneo. Estos productos fueron introducidos en el mercado en la década de los años 50 como soluciones salinas isotónicas al 6% obteniendo propiedades viscosas, coloidales y osmóticas equivalentes a las proteínas plasmáticas. La dextrana circulante en el torrente sanguíneo se elimina por vía renal. Sin embargo las dextranas de alto PM son antigénicas y pueden causar efectos

secundarios en algunos sujetos, por lo que la tendencia actual resultó en la comercialización de dextrana 70 (PM 70,000) como expansor de volumen sanguíneo, y dextrana 40 (PM 40,000) como mejorador de flujo. Estas dextranas se fabrican actualmente por hidrólisis ácida de la dextrana de alto peso molecular de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F. Tienen la ventaja de ser estables a los procesos de esterilización, que su aplicación es independiente del grupo sanguíneo del receptor, que se evitan las enfermedades transmisibles y que hay una baja incidencia de reacciones adversas. El mercado actual más importante corresponde al complejo hierro-dextrana empleado como medicamento para el tratamiento de anemia en humanos y como vehículo de este mineral para lechones en el destete. Esta aplicación surgió en 1954 cuando London y Twigg produjeron la primera solución estable de hierro para uso intramuscular. Un producto de gran aceptación es la sulfato-dextrana utilizada como anticoagulante. Otra aplicación comercial exitosa de la dextrana es la manufactura de tamices moleculares fabricados con dextrana entrecruzada con epíclorhidrina en presencia de hidróxido de sodio.

La síntesis de dextrana adquiere relevancia en la industria azucarera donde el polisacárido es sintetizado en forma no controlada por los microorganismos presentes en el guarapo (jugo de caña), causando una serie de dificultades que enseguida se analizan.

DEXTRANAS EN LA INDUSTRIA AZUCARERA

Ya en el siglo pasado, hacia 1890, se aceptaba que la acción de Leuconostoc mesenteroides y otras bacterias del género que son flora normal de la caña de azúcar, era la causa de la elevación de la viscosidad del guarapo y de la formación de masas mucilaginosas. Esta flora microbiana es muy amplia y no puede adjudicarse a un microorganismo particular la formación de las gomas. Los microorganismos presentes en la caña cortada también provienen del suelo y de los desechos de plantas en degradación. Esta población se ve influenciada por la temperatura, la humedad la temporada del corte de caña y otros factores (Duncan y Colmer, 1964). Las bacterias que se encuentran más comunmente en hojas y tallos pertenecen a las especies Flavobacterium, Lactobacillus, Xantomonas, Enterobacter, Pseudomonas, Erwinia, Leuconostoc, Bacillus y Corinebacterium. La forma más común de cosechar la caña en México consiste en prender fuego al campo, práctica que causa que la temperatura del tallo llegue a valores entre 55 y 85°C. La quema no elimina los microorganismos, ya que se han detectado viables una gran variedad de ellos después de esta operación (Bevan y Bond, 1971); por ejemplo Leuconostoc mesenteroides ha sido detectado en tallos en concentraciones similares antes y después de la quema. En el diagrama de la producción de azúcar de la figura 4, pueden notarse los pasos en que el jugo de caña queda expuesto a una contaminación exógena o a la evolución de una contaminación endógena ya que la sacarosa se encuentra expuesta a la acción microbiana desde el momento en

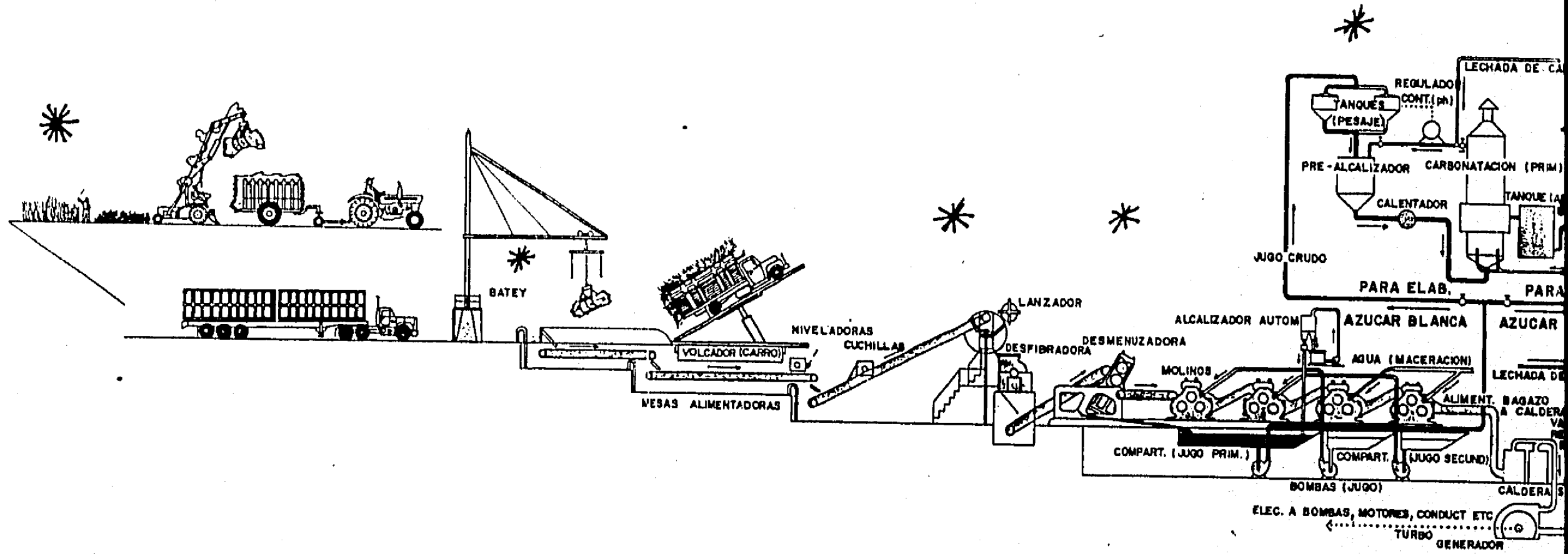
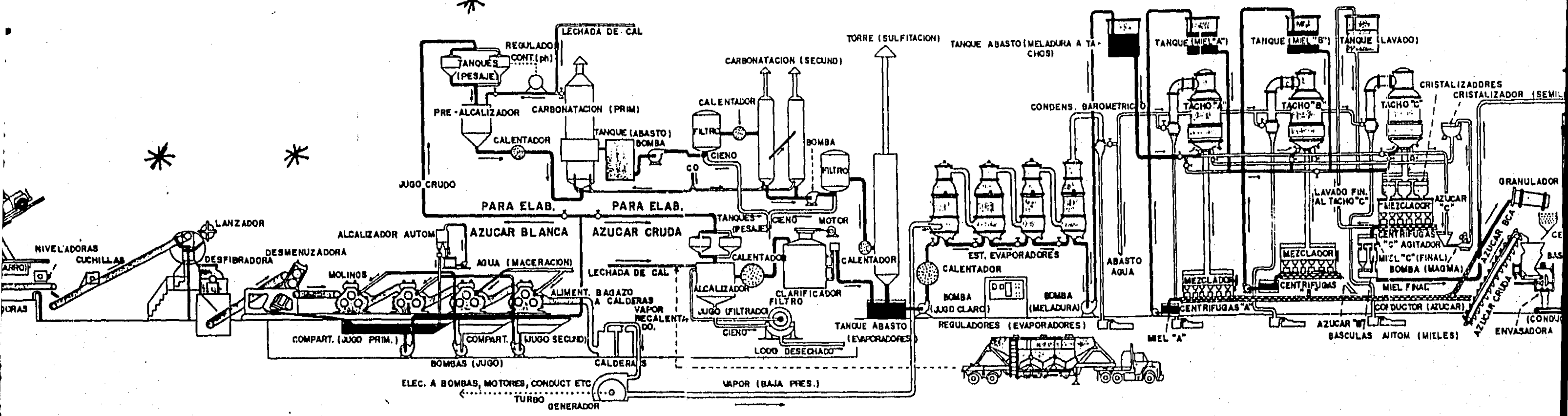
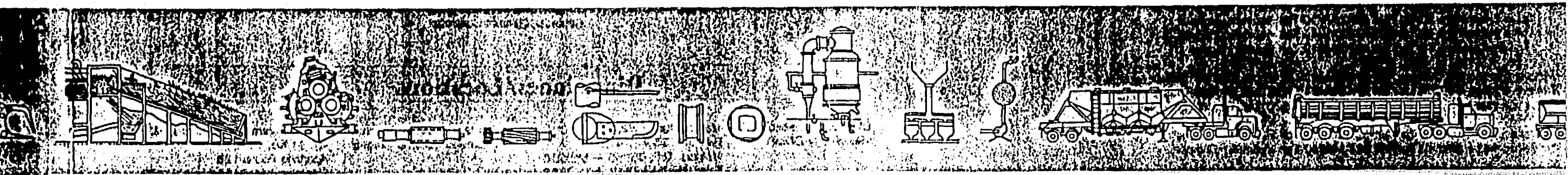
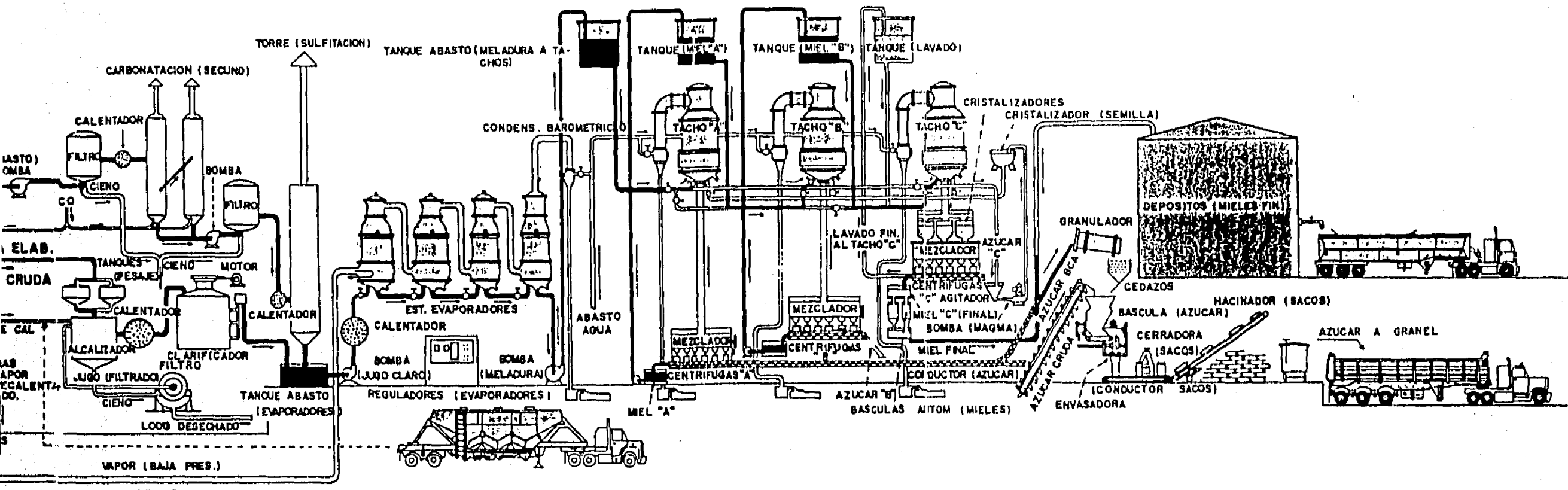


Fig. 4. Diagrama de la elaboración de azúcar.

* puntos de posible producción de dextrana



azúcar.
de dextrana



que se corta la caña hasta la evaporación. El tiempo que pasa la caña en el batey (patio del ingenio) antes de la molienda tiene a su vez una gran influencia en el desarrollo de las dextranas. Una programación adecuada del corte en los campos y de la entrada de caña al batey es indispensable para mejorar los rendimientos del proceso. Sin embargo la contaminación microbiana, como lo es la producción de las gomas aún en bajas cantidades es inevitable.

De los problemas causados por la presencia de dextranas en los ingenios, el principal es que la goma se produce a costa de la sacarosa disminuyendo el rendimiento general del proceso de refinación. Así mismo se acarrearán serias dificultades en el manejo del guarapo por la alta viscosidad generada, sobreviene una cristalización lenta y se provoca una elongación de los cristales de sacarosa. De igual forma el proceso de filtración y el manejo en general del jugo se vuelven más lentos. Hay riesgos de obstrucción de las tuberías y la formación de una gran cantidad de depósitos insolubles en el equipo.

Se han implementado varias estrategias para solucionar los inconvenientes de la contaminación. La forma más atractiva, por su bajo costo, consiste en añadir sustancias bactericidas como sales cuaternarias de amonio y compuestos organofosforados, pero tiene el inconveniente de introducir riesgos toxicológicos en el proceso. Una solución aplicada actualmente en algunos países

es la utilización de dextranasas capaces de romper enlaces $\alpha(1-6)$ disminuyendo rápidamente el peso molecular de la goma y por lo tanto la viscosidad del jugo (Novo Nordisk a/s, 1989).

Enseguida se describen algunas características relevantes de las dextranasas.

2. DEXTRANASAS

Las dextranasas hidrolizan en forma específica enlaces $\alpha(1-6)$. Su clasificación es: $\alpha(1-6)$ -D-glucan-6-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.11.).

Las carbohidrasas y otras enzimas despolimerizantes son generalmente inducibles. La hidrólisis de carbohidratos y de otros polímeros como polipéptidos y poliésteres implicaría la introducción de los polímeros a la célula, sin embargo no son las moléculas de alto peso molecular sino los productos de la hidrólisis los que penetran la pared celular y actúan como inductores. Es por lo anterior que estas enzimas son extracelulares o bien se encuentran asociadas a la membrana o a la pared celular dada la imposibilidad de los sustratos de alto peso molecular para penetrar. La inducción de este tipo de enzimas por los productos de la reacción tal vez no se reconoció con anterioridad a causa de la represión catabólica, que es un

fenómeno común en la producción de celulasas por la presencia de celobiosa. La represión ocurre a concentraciones relativamente pequeñas del dímero. La capacidad inductiva de un polímero (el sustrato de la enzima) resulta de su hidrólisis a dímero. En algunos casos este dímero nunca se acumula hasta una concentración que reprima porque se consume tan rápidamente como se forma (Reese, 1972; Suzuki et al., 1969).

La dextranasa es una enzima inducible y no hay informes concernientes a la existencia de una mutante constitutiva. En la tabla 1 se mencionan diversos inductores encontrados en la literatura. La isomaltosa y los oligosacáridos de bajo peso molecular (e.g. isomaltopentaosa) se consideran inductores pobres. Algunas formas oxidadas de la dextrana y cetodextrana son mejores inductores que la dextrana para P. funiculosum y otros hongos (Brown, 1979). Sin embargo la conclusión general es que la dextrana es el mejor inductor para la producción industrial de dextranasa, en términos de disponibilidad y costos de producción.

La existencia de dextranasas ha sido reportada como puede notarse en las tablas 1, 2 y 3 en hongos, levaduras y también en bacterias. Sin embargo dada la utilización de la dextrana como un sustituto de plasma sanguíneo y a partir del hecho que se deshecha del organismo después de un tiempo de haber sido aplicada en forma intravenosa, se alentó la búsqueda de dextranasas in vivo en diversos órganos del cuerpo humano.

TABLA 1. INDUCTORES DE DEXTRANASA

INDUCTOR	MICROORGANISMO
Isomaltopentosa	(1)
Isomaltotetrosa	(1)
Isomaltotriosa	(1)
Isomaltosa	(1)
AMG (1- α -metil-glucopiranosido)	(1)
BMG (1- β -metil-glucopiranosido)	(1)
Dextrana	(1, 2, 3, 4)
Isomaltosa monopalmitato	(2, 3, 4)
Isomaltosa dipalmitato	(2, 3, 4)
Isomaltosa-x-palmitato	(2, 3, 4)
Sacarosa monopalmitato	(2, 3, 4)
Cetodextrana I	(2)
Cetodextrana II	(2, 3, 4)

- 1) Lipomyces starkeyi
- 2) Penicillium funiculosum QM 474
- 3) Spicaria violacea QM 1031
- 4) Penicillium lilacinum QM 4e

NOTA: Cetodextrana I y II contenían 0.02 y 0.2 grupos ceto por residuo de hexosa respectivamente

(Ref.: Koenig & Day, 1989; Reese et al., 1969)

Scully en 1952 y Gray en 1953 encontraron que los productos de degradación de la dextrana son fácilmente metabolizados y que la administración oral de dextrana, en ratas y en seres humanos, causa un incremento rápido en glucosa sanguínea y glucógeno hepático. La velocidad de absorción de la dextrana llevó a pensar a Bloom y Wilhelmi en 1952, que en su degradación no sólo están involucradas bacterias de la flora intestinal sino una dextranasa intestinal. Posteriormente se descubrió actividad en diversos órganos (en orden decreciente de actividad): bazo, riñón, pulmones y cerebro, músculo. Sin embargo no se detectó actividad en sangre. Las dextranasas halladas en tejidos animales degradan la dextrana en forma exo, liberando únicamente moléculas de glucosa y deteniéndose en los puntos de ramificación por lo que dejan un residuo polimérico sin hidrolizar (Rozenfeld, 1958). Sin embargo la actividad del tejido intestinal resultó ser sumamente baja y la duda persiste del por qué existe actividad dextranasa si no existen poliglucósidos $\alpha(1-6)$ en tejidos animales y la amiloglicosidasa $\alpha(1-6)$ hidroliza la dextrana a velocidades sumamente bajas.

Para efectos de la producción de las dextranasas como aditivos útiles en la industria farmacéutica y la industria azucarera, son de interés las fuentes microbianas productoras de enzimas

En la tabla 2 se mencionan las especies bacterianas productoras de dextranasa que han sido reportadas en la literatura. Lactobacillus bifidus, anaerobio aislado del rumen, produce una

TABLA 2. CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE DEXTRANASA
REPORTADAS EN LA LITERATURA

MICROORGANISMO	REFERENCIA
<u>Lactobacillus bifidus</u>	Bailey & Clarke '59
<u>Brevibacterium fuscum</u> var. <u>dextranolyticum</u>	Sugiura et al. '74
<u>Arthrobacter globiformis</u> NRRL B-4425	Sawai et al., Ohya et al. '80
<u>Flavobacterium multivorum</u>	Hayward & Sly '84
<u>Flavobacterium</u> sp. M-73	Kobayashi et al. '83
<u>Celvibrio fulva</u>	Ingelman '48

endodextranasa con la particularidad atípica de formar a partir de dextrana oligosacáridos de 6 o 7 unidades y no produce isomaltosa o glucosa como productos finales. Para el caso de Celvibrio fulva debe mencionarse que además de producir dextranasas produce celulasas (Fisher y Stein, 1960).

Algunas especies de Bacteroides del tracto gastrointestinal, no mencionadas en la tabla 2, han sido implicadas en la degradación de dextrana administrada por vía oral (Hehre y Sery, 1952). Sus enzimas presentan una mezcla de actividad endo y exodextranasa, por lo que la glucosa es el producto final. Las enzimas endo y exo difieren en su relación entre pH y actividad: la actividad "licuante" (endo) tiene un pH óptimo entre 5.0 y 5.5, y es despreciable arriba de 6.5. Por otro lado la liberación de glucosa (actividad "sacarificante") desde un extremo de la cadena se lleva a cabo a pH 7.0 - 7.5, y es nula por debajo de 6.0.

La producción adaptativa de dextranasas se ha observado en diversas cepas fungales: Penicillium, Aspergillus, Verticillium y Spicaria. En la tabla 3 se mencionan las especies más estudiadas. Las dextranasas fungales actúan al azar sobre la molécula de dextrana produciendo isomaltosa principalmente, y en menor cantidad isomaltotriosa y glucosa. El sistema enzimático de A. niger es una excepción pues presenta una actividad isomaltasa y sólo produce glucosa (Tsuchiya et al., 1952). Se han reportado también dextranasas en la especie Penicillium purpurogenum

TABLA 3. PRODUCTIVIDAD DE CEPAS MICROBIANAS PRODUCTORAS DE DEXTRANASAS REPORTADAS EN LA LITERATURA.

MICROORGANISMO	PRODUCTIVIDAD (U/ml·h)	REFERENCIAS
<u>Penicillium purpurogenum</u>	0.54	Guilarte et al., 1986
<u>P. funiculosum</u> HI-4	0.91	"
<u>P. funiculosum</u> SH-5	0.81	Kosaric et al., 1973
<u>P. aculeatum</u>	1.25	Madhu & Prabhu, 1984
<u>P. purpurogenum</u>	0.96	Shukla et al., 1989
<u>P. funiculosum</u>	0.69	"
<u>P. aculeatum</u>	0.61-0.78	"
<u>Chaetomium gracile</u>	0.36	Hattori et al., 1980
<u>Lipomyces starkeyi</u>	0.05	Koenig & Day, 1988
<u>Lipomyces starkeyi</u>	--	Louisiana St. Univ. Pat.No. WO 8705324
<u>Arthrobacter globiformis</u>	--	Nissin-Food, 1988 Pat.No.JP 63185381

(Guilarte et al., 1986). Lipomyces starkeyi es una levadura con actividad dextranolítica. Sin embargo la actividad final reportada para 83 hs de fermentación es 4.4 UD/ml en el sobrenadante lo que resulta substancialmente inferior a las reportadas para cepas fungales, aunque tendría la ventaja potencial de no presentar riesgos de producción de antibióticos o micotoxinas.

PROCESOS DE OBTENCION Y DE PURIFICACION DE DEXTRANASAS

Los procedimientos industriales para la producción de dextranasas se llevan a cabo por fermentación sumergida. El medio de cultivo contiene al inductor de esta enzima como única fuente de carbono. La fermentación con Lipomyces starkeyi es una excepción pues Koenig y Day (1988) reportaron el crecimiento de la biomasa de una mutante desreprimida en glucosa para posteriormente añadir el inductor y lograr la actividad deseada. En general los medios de cultivo industriales contienen dextrana como fuente de carbono y se utilizan sólidos de agua de remojo de maíz, extracto de levadura, sulfato de amonio o nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno. Entre las sales minerales importantes para la fermentación se encuentran $MgCl_2$, $CaCl_2$, $FeSO_4$ y $MnSO_4$. Las fermentaciones se llevan a cabo a valores de pH de 5.8 a 7.0 dependiendo del microorganismo en cuestión.

Uno de los microorganismos más estudiados es Penicillium funiculosum. En 1973 Kosaric y col. estudiaron la cepa SH-5 en fermentación sumergida, obteniendo 2000 U/ml (mg de isomaltosa

liberados por hora por ml). Las condiciones de la fermentación fueron 400 rpm, 26°C y 0.5 vvm de aireación en un medio de cultivo compuesto de: 20g de dextrana de alto peso molecular, 10g de extracto de levadura, 0.4g de CaCl₂, 0.2g de MgCl₂·6H₂O en 1l de buffer fosfatos 0.1M pH 5.8. La fermentación se inoculó con esporas y se cultivó durante 4 días. Para fermentaciones posteriores se empleó un 5% v/v de cultivo activo como inóculo. Al término del cultivo, la biomasa se separó por centrifugación y el medio se preconcentró hasta 1/3 de su volumen original mediante ultrafiltración. Posteriormente el medio concentrado se sometió a precipitación fraccionada con (NH₄)₂SO₄, se filtró y se desaló por ultrafiltración con una recuperación del 65%. La actividad específica del precipitado es de 3760 UD/mg de proteína.

Hattori y col. (1981) reportaron el cultivo de Chaetomium gracile, cepa que es utilizada industrialmente. El proceso que describen se llevó a cabo en un fermentador de 100 l con un volumen de trabajo de 50 l. El medio de cultivo se compuso de 10 g/l de dextrana de alto peso molecular, 5 g/l de agua de remojo de maíz, 5 g/l Pharmamedia, 2.5 g/l KH₂PO₄ y 2.5 g/l de MgSO₄·7H₂O. El pH se ajustó a 6.0 con NaOH y se esterilizó a 120°C por 20 min. A las 96 horas de cultivo se alcanzaron actividades en el sobrenadante de 345 SU/ml. Una unidad SU o unidad de sacarificación es la cantidad de enzima que produce azúcares reductores equivalentes a 1 μmol de glucosa por min. Al terminar la fermentación se filtró el micelio y se concentró el

sobrenadante a presión reducida y 40°C. Posteriormente se precipitó con acetona al 70% y se deshidrató al vacío a 30°C para obtener el producto en polvo.

Shukla et al. (1989), estudiaron entre otros microorganismos una cepa de Penicillium aculeatum seleccionada a través de un procedimiento de "screening". El cultivo se realizó a 30°C, con 200 rpm, durante 3 a 4 días en un medio con 20 g/l de dextrana.

Arthrobacter sp., fue la cepa utilizada por Nissin-Food que en 1988 obtuvo la patente No. JP 63185381 (Kokai) para la producción de dextranasa a gran escala. Esta enzima es capaz de hidrolizar tres veces más rápido la dextrana insoluble que la producida por una cepa de Penicillium sp. El cultivo se realizó a 30-37°C, pH 6 - 7 y por 24 - 48 horas. Posteriormente se centrifugó la biomasa, el sobrenadante se sometió a ultrafiltración y se precipitó con sales. Se produjeron alrededor de 2.5 mg de enzima por ml.

La patente No. WO 8705324 fue asignada a Louisiana State University para la producción de dextranasas por cultivo de Lipomyces starkeyi. El pH óptimo se encuentra entre 2.5 y 4.5 a una temperatura de 20 a 30°C, en presencia de dextrana como inductor. También la cepa ATCC 20825 produce una cantidad importante de dextranasa a los mismos valores de pH, en un medio con dextrana y glucosa.

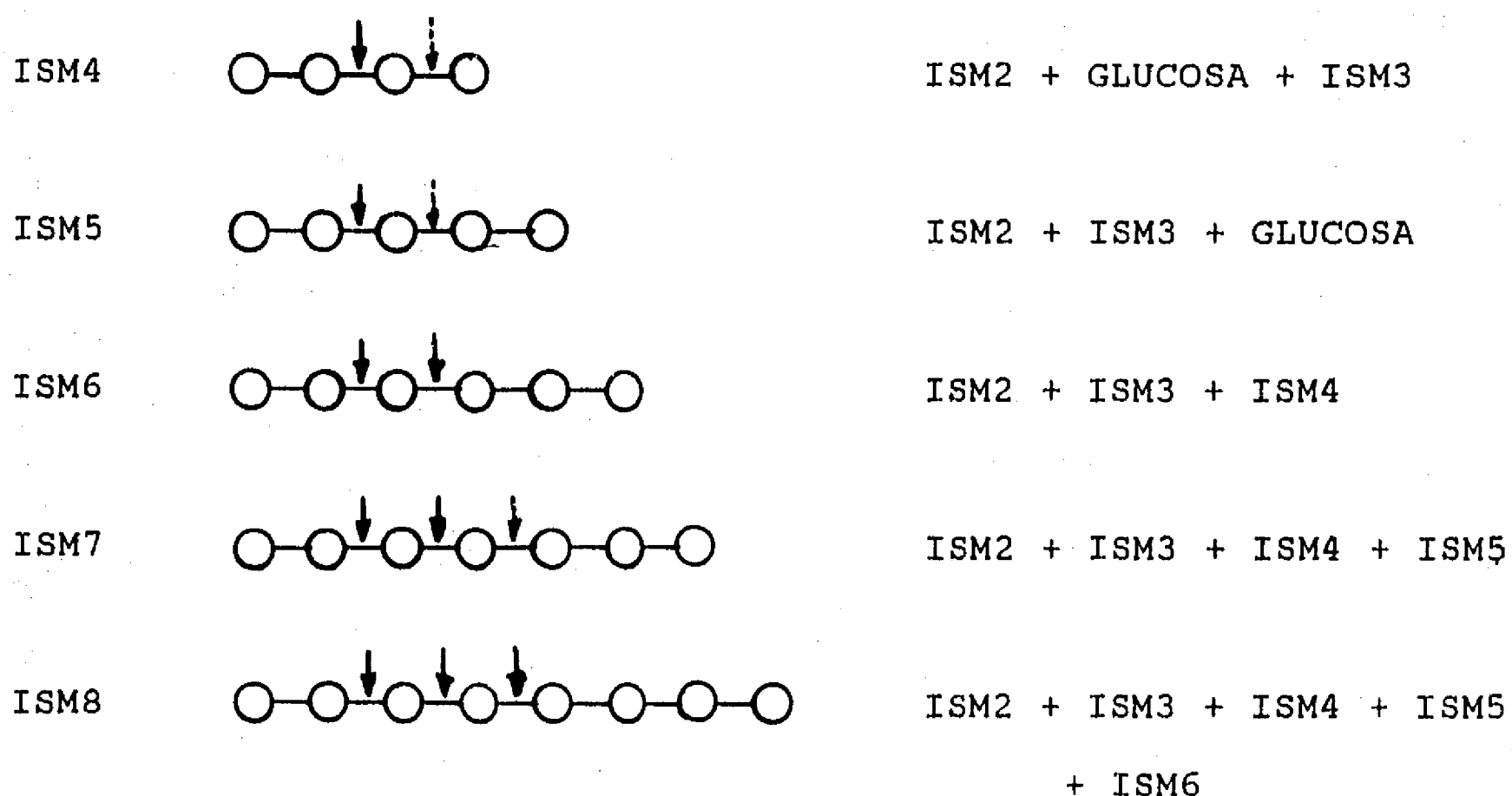
Paecilomyces lilacinus ha sido estudiado para la producción de dextranasas (Lee & Fox, 1985; Sun et al, 1988). El pH óptimo de la enzima es 5.4 pero la fermentación tuvo mejores resultados a pH 7.0 . No han sido reportados los datos para la optimización y producción en mayor escala de la dextranasa de P. lilacinus, sin embargo en la preparación enzimática se han detectado 2 fracciones por electroforesis y ambas presentaron una alta actividad. Los medios de cultivo reportados utilizan dextrana como inductor y la fuente de nitrógeno varía entre extracto de levadura y sólidos de agua de remojo de maíz.

PATRON DE ACCION DE LAS DEXTRANASAS.

La caracterización de los productos de la hidrólisis de dextrana con dextranasas de P. funiculosum y de P. lilacinum fue descrita por vez primera por Bourne et al. (1962) y Hutson & Weigel (1963) para extractos crudos que produjeron glucosa, isomaltosa e isomaltotriosa en menor cantidad.

La dextranasa purificada fue estudiada posteriormente por Sugiura et al. (1974). Ellos encontraron que la enzima estaba formada por dos fracciones: dextranasa I con un pI de 3.98 y la dextranasa II con pI de 4.19. Ambas fracciones presentaron propiedades enzimáticas similares. La fracción mejor estudiada fue la fracción II que al incubarse con dextrana produjo: isomaltosa (ISM2), isomaltotriosa (ISM3), -tetraosa (ISM4), -pentaosa (ISM5), -hexaosa (ISM6) e isomaltodextrinas más grandes al inicio

de la reacción, por lo que se deduce que la ruptura de enlaces es de tipo endo. La isomaltosa no se hidrolizaba más pues es un producto final de la reacción. La isomaltotriosa pudo hidrolizarse a glucosa e ISM2 pero a concentraciones de enzima mucho mayores. Esto indicó que la afinidad por la isomaltotriosa es débil, sin embargo la enzima es capaz de hidrolizar rápidamente las moléculas con más de tres enlaces glucosídicos. De hecho al aumentar el peso molecular de los oligosacáridos, aumenta la velocidad de hidrólisis hasta alcanzar un valor máximo correspondiente al observado con dextrana. La isomaltosa fue el producto principal de la hidrólisis de dextrana y oligosacáridos. Los productos de reacción de la hidrólisis de isomaltotetraosa son principalmente ISM2, y glucosa e ISM3 en menores proporciones. Los productos de hidrólisis de diferentes oligosacáridos se presenta enseguida:



La distancia entre el sitio catalítico y el sitio de unión en el centro activo de la dextranasa se deduce que debe ser mayor de dos enlaces glucosídicos puesto que la ISM3 (con dos enlaces glucosídicos) se hidrolizó aunque lentamente, pero la ISM2 ya no es sustrato de la enzima.

La dextranasa II actuó de manera regular sobre las isomaltodextrinas. A partir de los resultados de la hidrólisis sobre los isomaltodextrinóles correspondientes, se observó que los puntos de ataque son principalmente sobre el 2º y 3er. enlace glucosídico a partir del extremo no-reductor del sustrato, y si aumenta el grado de polimerización la enzima ataca también el 4º y el 5º enlaces. Esta es una de las pruebas de que la enzima es una endodextranasa. Sugiura y colaboradores (1974) realizaron estudios con distintos mono y disacáridos inhibidores de la dextranasa (Tabla 4). La K_i de la galactosa es mayor que la de glucosa, por lo que el -OH del C4 en posición β permite unir el inhibidor más fácilmente que en posición α . Por otro lado se observó que el ác. glucurónico es un inhibidor de tipo mixto, cuando la ramnosa, con un metilo en C6 es un inhibidor no-competitivo. Esto indica que la posición C6 es la más importante para definir el tipo de inhibidor de que se trata, y da pautas para elucidar el sitio de unión de la enzima y esto se complementa con el hecho de la diferencia de inhibición entre el ác. galacturónico (mixto) y la galactosa (competitivo). Los

TABLA 4. INHIBICION DE LA DEXTRANASA II DE P. funiculosum CON DISTINTOS OLIGOSACARIDOS

OLIGOSACARIDO	TIPO DE INHIBICION	CONSTANTE DE INHIBICION Ki (X10 ⁻² M)	OLIGOSACARIDO	TIPO DE INHIBICION	CONSTANTE DE INHIBICION Ki (x 10 ⁻² M)
D-glucosa	C	3.5	L-rhamnosa	N	32.0
D-glucosamina	C	5.6	D-xilosa	C	3.9
Ac. D-glucurónico	M	6.2	maltosa	M	1.6
D-galactosa	C	4.9	Lactosa	M	4.0
Ac. D-galacturónico	M	5.7	Celobiosa	M	3.1
D.fructosa	C	3.4			

C = Inhibición competitiva N = inhibición no competitiva M = inhibición mixta

FUENTE: Sugiura et al. (1974)

disacáridos usados en los experimentos actuaron como inhibidores de tipo mixto. El patrón de acción propuesto por los autores se encuentra en la figura 5A.

El patrón de acción de Penicillium lilacinum fue estudiado por Walker y Hare (1975) (Figura 5B). Sus conclusiones indican que la D-glucosa se obtiene como un producto de la hidrólisis de isomaltotriosa e isomaltotetraosa sobre el primer enlace del extremo reductor. Para el caso de oligosacáridos superiores (de 5 a 8 carbonos) los enlaces terminales no fueron atacados. Así mismo la hidrólisis de la ISM3 para obtener D-glucosa e ISM2 fue extremadamente lenta, lo que coincide con lo encontrado por Sugiura para la dextranasa de P. funiculosum. Sin embargo la D-glucosa se obtiene rápidamente a partir de ISM4. Sin embargo el enlace que se hidroliza principalmente en la ISM4 es el enlace interior.

La hidrólisis de oligosacáridos superiores produjo ISM2 e ISM3 principalmente, y la ISM2 resultó por la hidrólisis del 2º enlace, mientras que la ISM3 aparece por hidrólisis del 3er. enlace a partir del extremo no-reductor. La ISM3 es el producto principal de la hidrólisis de ISM5, ISM6, ISM7 e ISM8. El hecho de que Bourne et al. hayan reportado una baja concentración de ISM3 tal vez se deba a que utilizaron una gran cantidad de enzima que sometió a la ISM3 a una degradación posterior y no se detectó correctamente. En los experimentos de Walker y Hare no se detectó una hidrólisis posterior de ISM2 o ISM3.

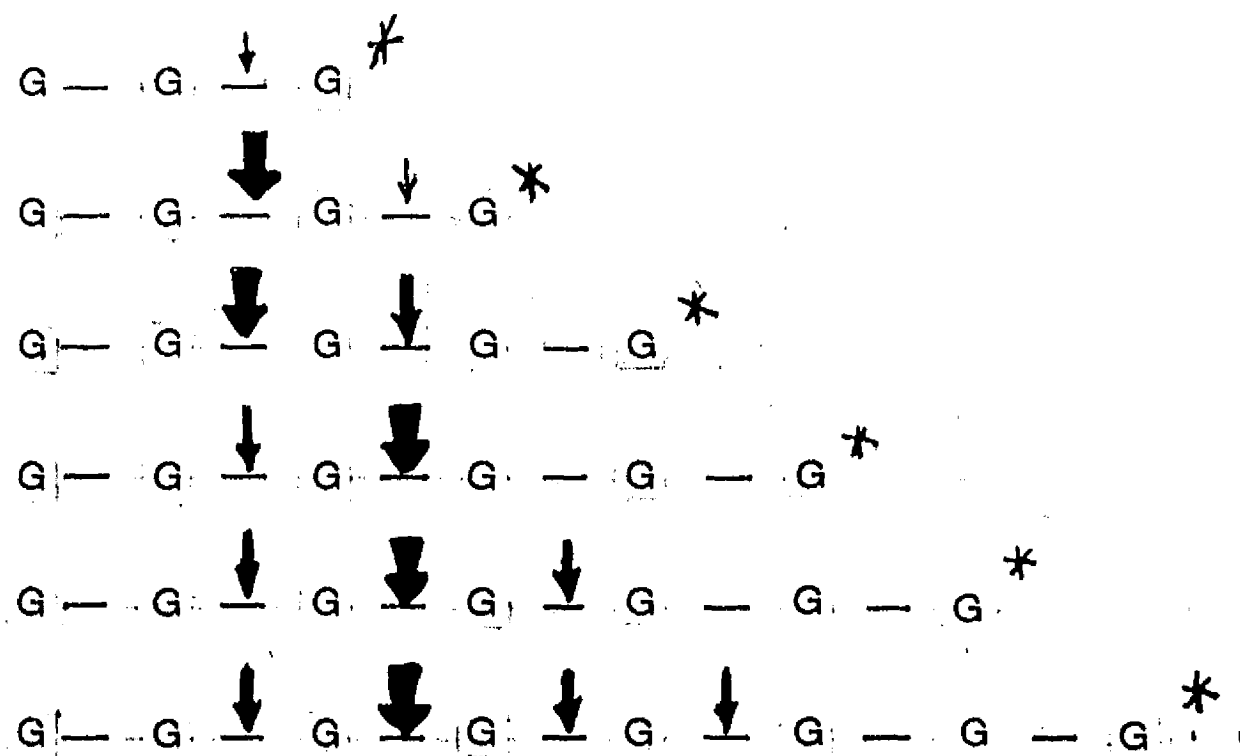


Fig. 5A. Patrón de hidrólisis de la dextranasa II de *P. funiculosum* sobre distintas isomaltodextrinas.

G glucosa, G* extremo reductor, - enlace glucosídico $\alpha(1-6)$, \downarrow hidrólisis muy rápida, \downarrow hidrólisis rápida, \downarrow hidrólisis lenta cuando se sustituye el extremo reductor por un radical alcohol.

Fuente: Sugiura & Ito (1974)

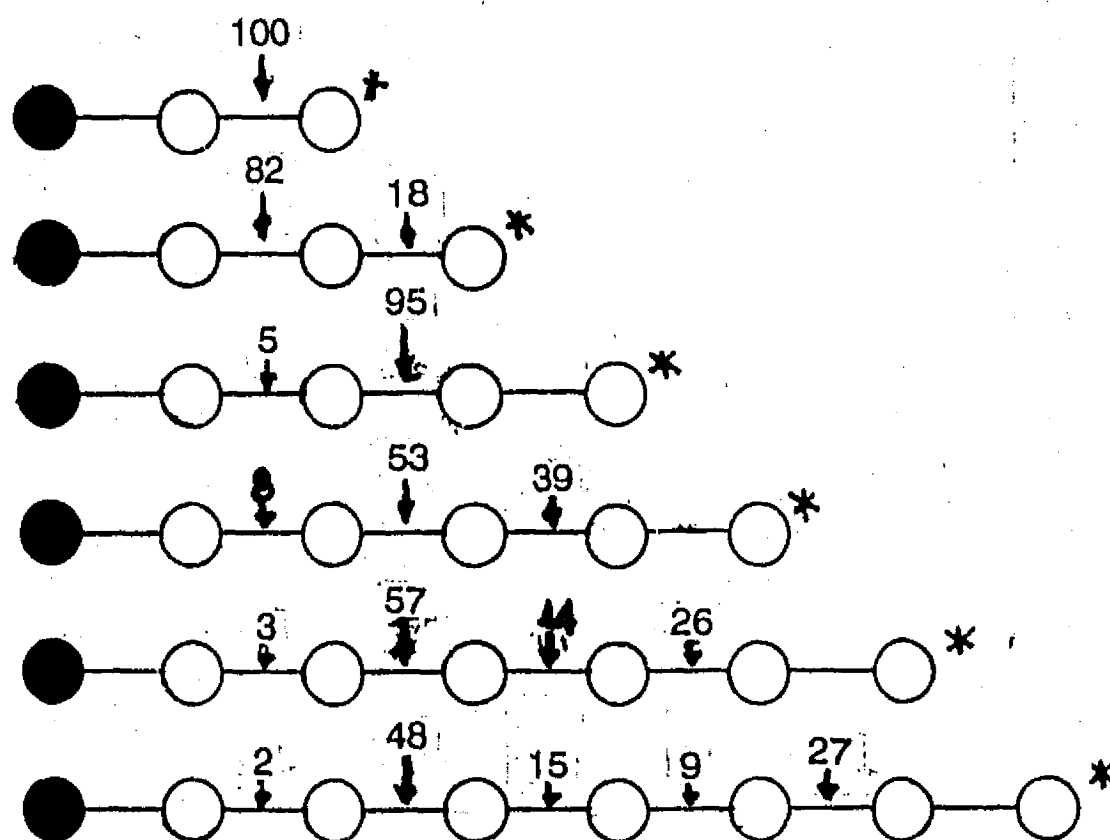


Fig. 5B. Patrón de hidrólisis y frecuencia de ataque sobre los distintos enlaces glucosídicos de la dextranasa de *Penicillium lilacinum*.

Fuente: Walker & Hare (1975)

Todos los oligosacáridos excepto ISM3 fueron hidrolizados en más de un enlace. Los principales puntos de ataque de ISM4 a ISM8 fueron el 2º y el 3er. enlace glucosídico a partir del extremo no-reductor. La ISM2 proviene de la hidrólisis del 2º enlace y la ISM3 del tercero. La ISM3 es el principal producto de la hidrólisis de ISM5, ISM6, ISM7 e ISM8. La frecuencia de ataque en los distintos enlaces sobre distintos oligosacáridos se presenta en la figura 6. Sobre la ISM5 coincide el enlace 2 con el enlace 3 del extremo no-reductor lo que permite un 95% de la hidrólisis en el enlace marcado en el esquema. Esto sugeriría que el sitio activo de la enzima podría calcularse de la suma de los dos productos principales en la hidrólisis: ISM2 e ISM3 obteniéndose un sitio que contuviera 5 unidades de monosacárido. Sin embargo la energía de unión de un oligosacárido de 5 miembros no coincidió con los resultados y no se tienen datos suficientes para asegurar el tamaño del sitio activo (Walker y Hare, 1975).

Las dextranasas son enzimas poco utilizadas en la industria pero tienen un potencial importante en tres de sus aplicaciones principales:

- 1) hidrólisis de la placa dental para combatir la caries
- 2) hidrólisis controlada para la producción de dextranas de bajo peso molecular para uso clínico
- 3) hidrólisis de la dextrana contaminante en la industria azucarera

APLICACIONES DE LAS DEXTRANASAS

Para el caso de la placa dental, se sabe que los microorganismos constituyentes de la flora oral normal son capaces de formar dextrana insoluble que les permite fijarse a una superficie tan lisa como es el esmalte de los dientes. La dextrana insoluble forma un soporte para éstos y algunos otros microorganismos. Son los metabolitos ácidos producidos por estos organismos los que paulatinamente desmineralizan los dientes iniciando el proceso que ocasiona la caries. El uso de pastas dentales que contengan dextranasa se ha propuesto ya con anterioridad, pero sólo en Japón se ha logrado hacer en forma comercial. Si se dispusiera de dextranasa con una mayor especificidad hacia los enlaces $\alpha(1-3)$ ya sea en cadenas continuas o bien en los puntos de las ramificaciones de las dextranas de la clase I (ver Fig. 3), y si se produjera con cepas de microorganismos GRAS (generalmente reconocidos como inocuos), podría sin duda expanderse esta aplicación. Actualmente sólo se recomienda evitar la sacarosa en la dieta y entre comidas para eliminar así la presencia del sustrato de la dextransacarasa, o bien sustituir la sacarosa por azúcares no-cariogénicos como la glucosa, jarabes fructosados, xilitol, maltosa, etc.

La producción de dextranas de peso molecular controlado se realiza actualmente por hidrólisis ácida del polímero. Aún no se implementa la hidrólisis enzimática de dextranas en forma industrial para este objetivo.

La hidrólisis de la dextrana contaminante en los ingenios azucareros constituye la aplicación industrial más relevante de esta enzima, y ha traído como consecuencia que los estudios más profundos se hayan realizado sobre cepas productoras de dextranasa específica para atacar los enlaces $\alpha(1-6)$. Las dextranasas en el mercado provienen de Chaetomium gracile y Penicillium funiculosum y son producidas por las empresas Novo Nordisk (Dextranase), Miles (Dextranex DX) y Amano (Sugarase). La aplicación de la enzima se lleva a cabo en un tanque agitado que se mantiene a 50-55°C y pH de 5 a 5.5 durante 15 minutos antes de los clarificadores. En el caso de procesos que parten de azúcar mascabado, como sucede en el Noreste de los Estados Unidos de Norteamérica, se aplica la dextranasa en el jarabe hecho con el mascabado.

MATERIALES Y METODOS

AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS.

El procedimiento de aislamiento y selección se llevó a cabo sobre muestras de jugo de caña del Ingenio "Constancia" de Córdoba, Veracruz, sobre soluciones de dextrana contaminadas en refrigeración y sobre muestras de tierra y aire. Los microorganismos que son capaces de crecer en un medio de cultivo con dextrana como única fuente de carbono, necesariamente utilizan dextranasa para hidrolizar el polisacárido. El medio de cultivo utilizado inicialmente tiene la siguiente composición: 10 g/l dextrana industrial de alto peso molecular (5 a 40 millones de daltons en promedio) (Sigma Chemical Co. Inc. St. Louis MO, USA), 15 g/l agar, 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/l KH_2PO_4 y 0.1 g/l MgSO_4 (Hultin & Nordstrom, 1949). Las colonias características fueron aisladas por resiembras consecutivas en placas. Los microorganismos con actividad dextranasa extracelular fueron seleccionados en un medio sólido con la composición anteriormente descrita pero sustituyendo 5 g/l de la dextrana industrial por dextrana azul 2000 (Pharmacia, Suecia). La enzima secretada hacia el medio difunde y produce un halo incoloro alrededor de la colonia, debido a que se libera el colorante.

También fueron evaluadas algunas cepas de colección como Paecilomyces sp. del Cepario de la Fac. de Química, Paecilomyces lilacinus NRRL 895, y Penicillium funiculosum NRRL 3647.

Cada cepa fue evaluada en un cultivo sumergido para determinar su productividad enzimática, para lo cual se inocularon medios líquidos y se procedió a la fermentación.

PREPARACION DEL INOCULO.

El inóculo para el cultivo sumergido consiste de una suspensión de esporas en solución salina. La cantidad utilizada es de 1×10 esporas para 50 ml de medio de cultivo. Para obtener esporas se seleccionó un medio de cultivo adecuado para la esporulación después de inocular placas de distintos medios de cultivo con cada una de las cepas seleccionadas. Los criterios de selección del medio más apropiado fueron: abundancia de esporas, homogeneidad de crecimiento y estabilidad de la colonia. Las colonias fueron observadas a simple vista y con un microscopio estereoscópico (Zeiss, Alemania Occidental Mod. 475052-9901). Los medios probados fueron H&N con dextrana grado industrial de alto peso molecular y con dextrana T70 (peso molecular = 70,000) (Farmacia. Upsala, Suecia), medio modificado de Kosaric y agar extracto de malta (EMA). Las composiciones detalladas de estos medios se encuentran en el apéndice I.

La esporulación se llevó a cabo en botellas planas de vidrio transparente que son las más apropiadas para la observación del crecimiento, además de que facilitan la recuperación de las esporas. Un volumen de 30 ml de medio sólido, debe alcanzar un espesor de aprox. 0.7 cm.

Las botellas fueron inoculadas por siembra por estría a partir de una suspensión de esporas (preservadas en glicerol al 15%) y fueron incubadas a 28°C. El tiempo de incubación para lograr la esporulación del cultivo es variable para cada cepa: de 8 a 10 días para los Penicillia, de 12 a 14 días para los Paecilomyces. Paralelamente se incubaron cultivos en placa sembrados por picadura para observar, en la colonia gigante, la posible sectorización de la colonia y el control de la estabilidad morfológica.

RESUSPENSION DE ESPORAS.

Las esporas producidas en las botellas fueron colectadas con 12 a 15 ml de solución salina estéril adicionada de un 0.1% de Tween 80 como tensoactivo que permite mojar más fácilmente las esporas. La botella se agita suavemente, sin raspar el cultivo para evitar el arrastre de micelio y únicamente colectar esporas. El líquido es recogido en tubos de ensaye de un volumen tal que no se ocupe más de la tercera parte del tubo para que al agitar vigorosamente se evite la aglomeración de las esporas.

CONTEO DE ESPORAS.

Para estandarizar el inóculo se efectúa un conteo de esporas en un hemocitómetro o cámara de Neubauer. En el microscopio óptico con el objetivo 16x se contaron las esporas contenidas en 10 cuadros (0.04 mm^2) de cada celda. El total de esporas contado en 20 cuadros se encuentra en un volumen calculado de $80 \times 10^{-6} \text{ ml}$ de muestra, lo que permitió calcular el número de esporas por ml de suspensión.

Cada matraz Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo se inoculó con 1×10^7 esporas contenidas en 1.0 ± 0.5 ml de suspensión. Cada unidad experimental consistió en un duplicado de matraces. El cultivo se mantuvo con agitación recíproca de 110 desplazamientos (8.5 cm) por minuto, en una cámara de incubación (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison NJ, USA, Mod. R-25), a temperatura controlada de $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, durante 8 a 10 días.

MUESTREO.

El cultivo se muestreó en condiciones de esterilidad tomando 1.5 ml diariamente, de forma que al 8º día de fermentación solo se hubiera consumido un 20% del volumen inicial. Inmediatamente después de tomada la muestra ésta se sometió a centrifugación a 11,000 rpm en una centrífuga Damon IEC HT (USA). El pellet obtenido se enjuagó con agua destilada y se secó a 70°C en una estufa de 20 a 24 horas, sobre pedazos de papel aluminio tarados.

Este método de muestreo no permitió una determinación muy precisa del peso seco de micelio, sin embargo el crecimiento se correlacionó apropiadamente con el método de consumo de carbohidratos. El sobrenadante se dividió en dos partes: una que se utilizó para determinar la actividad de dextranasa y el resto se congela a -20°C para posteriormente determinar carbohidratos totales y proteína soluble.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La actividad enzimática se determinó por la cuantificación de extremos reductores liberados durante la hidrólisis, con el reactivo del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sumner, 1935), sobre una solución de dextrana T70 (peso molecular controlado de 70,000 daltons) (Farmacia. Upsala, Suecia) en buffer de acetatos 0.1M, pH 5.4 a 40°C . Se utilizó una curva estándar de 2.0 g/l de glucosa.

Para este estudio en particular se definió una unidad de dextranasa (UD) como la cantidad de enzima necesaria para liberar una micromol de glucosa equivalente por min en las condiciones arriba estipuladas.

La productividad de cada cepa se evaluó en cultivo sumergido, con un medio semi-definido, con dextrana como única fuente de carbono, y que fue modificado a partir del medio descrito por Kosaric et al. (1973). Este medio de cultivo consiste de 20 g/l

dextrana industrial de alto peso molecular, 10 g/l de extracto de levadura (Merck, Alemania), 0.4 g/l CaCl₂ y 0.2 g/l MgCl₂·6H₂O en buffer fosfatos 0.1M, pH 5.8 para Penicillium y pH 7.0 para Paecilomyces.

IDENTIFICACION Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.

La identificación taxonómica de Penicillium se llevó a cabo utilizando la clave de Von Arx (1971) para el género, y la clave de Pitt para la especie (Pitt, 1979) la cual se basa principalmente en características microscópicas, datos de crecimiento en diferentes medios, y en tercer lugar en datos de morfología colonial. La identificación del género Paecilomyces se realizó con las claves de Von Arx y Samson (Samson, 1974) siguiendo las características microscópicas y la morfología colonial. Los cultivos usados para estas identificaciones fueron sembrados en agar extracto de malta (EMA), incubados 14 días a 25°C, Czapek extracto de levadura (CYA) a 25 y 37°C (ibid), en medio G25N (ibid) y medio de Hultin & Nordstrom a 25°C. (Ver el apéndice I para la formulación de los medios).

Las cepas seleccionadas se mantuvieron por dos métodos: a) conservación de esporas en tierra estéril a 4°C y b) conservación de esporas en glicerol al 15% a -20°C (Smith, 1984).

OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

La optimización del medio de cultivo se efectuó utilizando la técnica de Box-Wilson, con un diseño factorial 2^n (Box and Wilson, 1951). Los niveles bajo y alto para los cuatro componentes básicos del medio de cultivo original se muestran en la tabla 5. Cada composición del medio de cultivo se ensayó por duplicado usando 25 ml que se inocularon de la forma anteriormente descrita.

CINETICAS DE FERMENTACION.

Las cinéticas de fermentación se describen en términos de la producción de enzima y de biomasa, midiendo el peso seco de micelio de las muestras del caldo de fermentación de la manera arriba descrita. Para algunas de las muestras también se midió la actividad específica y los carbohidratos totales residuales. La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977) y el de carbohidratos totales por el método del fenol-sulfúrico (Whistler y Wolfrom, 1962).

El efecto del pH inicial del medio de cultivo en la fermentación se evaluó a valores de 5.4, 6.0 y 7.0 .

TABLA 5. COMPOSICION (g/l) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA TECNICA DE BOX-WILSON.

MgCl ₂	0.20				0.30											
CaCl ₂	0.30		0.50		0.30		0.50									
Extracto de levadura	6	10	6	10	6	10	6	10								
Dextrana	15	25	15	25	15	25	15	25								
Número experimento	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
Act. (UD/ml)	27.82	16.88	27.72	31.94	27.59	14.76	30.03	20.25	19.50	11.68	30.63	26.93	29.72	16.86	22.79	31.67
Promedio general: 24.17 UD/ml																

APLICACION DE LA DEXTRANA COMO INDUCTOR Y FUENTE DE CARBONO.

La dextrana para ser utilizada como fuente de carbono e inductor para la producción de la enzima debe ser hidrolizada previa su introducción a la célula. El efecto de la dextrana hidrolizada como un inductor en el medio de cultivo se evaluó en términos de la producción de enzima. La dextrana industrial hidrolizada se preparó usando dextranasa comercial (Amano International Enzyme Co. Inc. VA, USA) a 40°C y posteriormente se inactivó en un baño a ebullición durante 5 min. Los hidrolizados fueron ajustados a 30 y 50 IE (equivalentes de isomaltosa) usando la misma terminología que se aplica a los productos de la hidrólisis de almidón.

Un experimento similar se realizó pero utilizando ahora dextrana T70 hidrolizada exhaustivamente con la propia dextranasa 6R a fin de que la fuente de inductor fuera una solución de 16g/l de isomaltosa puesto que este hidrolizado presenta en HPLC un solo pico (ver fig. 19 A.d.).

EFEECTO DE LA GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

P. lilacinus 6R también fue cultivado en un medio con glucosa y dextrana en distintas proporciones: 33-66 y 50-50 por ciento respectivamente, para producir una cantidad de biomasa a partir de glucosa y posteriormente se utilice la dextrana como inductor.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE DEXTRANASA INTRACELULAR.

Con el objeto de evaluar la posible existencia de actividad intracelular o de actividad asociada al micelio se utilizaron cultivos de 3, 5 y 12 días. El micelio fue lavado y centrifugado sucesivamente tres veces con buffer de fosfatos a fin de eliminar restos de sobrenadante. La mitad del micelio fue dividida en dos partes para añadirle sustrato (solución al 2.5% de dextrana T70) en dos celdas enchaquetadas a temperatura de 40°C a fin de llevar a cabo la determinación de actividad. La otra mitad del micelio fue sometida a dos períodos de molienda de 1 minuto cada uno en un Ultra Turrax Mod. 18/1052 (Janke & Kunkel. Ika-Werk. Suecia) con un intervalo de 1 minuto de descanso y sumergida en un baño de hielo para no calentar demasiado la preparación. El micelio así molido se puso en contacto, inmediatamente después, con el sustrato dividiéndolo en dos porciones para hacerlo por duplicado en otras dos celdas. Las muestras de las cuatro celdas fueron tomadas a diferentes tiempos e inactivadas en un baño a ebullición. En el sobrenadante de esta reacción se determinó la cantidad de reductores liberados durante la reacción. La actividad fue expresada como Unidades de Dextranasa por gramo de micelio (UD/g).

CARACTERIZACION DE LA DEXTRANASA 6R.

El pH y la temperatura óptimos para la dextranasa 6R fueron determinados, así como su estabilidad térmica a distintos pH y su estabilidad a distintos valores de pH a 60°C. También fueron determinados sus parámetros cinéticos básicos de acuerdo a los métodos de cinética clásica. El efecto del peso molecular del sustrato también fue evaluado sobre la cinética de Michaelis-Menten, utilizando las dextranas T10, T40 y T70 (10000, 40000 y 70000 daltons respectivamente) (Pharmacia. Upsala, Suecia) y dextrana industrial de alto peso molecular (5 a 40 millones de daltons) (Sigma Chemical Co. Inc. St. Louis MI, USA).

La especificidad de la dextranasa fue estudiada frente a varios polisacáridos de glucosa: almidón "soluble" (Mallinkrodt, Alemania), dextrana insoluble de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-523 sintetizada en el laboratorio (Durán, 1990) así como sobre pectina y alginato.

EFEECTO DE LOS PRODUCTOS FINALES DE REACCION Y SACAROSA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA DEXTRANASA 6R.

Un concentrado de isomaltosa fue utilizado para evaluar el efecto de los productos finales de la hidrólisis sobre la actividad y el comportamiento cinético de la enzima. Para obtener este concentrado se hidrolizó en forma exhaustiva una solución de

dextrana T70 con la dextranasa de P. lilacinus 6R, seguida de una inactivación térmica y evaporación al vacío obteniéndose una solución de 210 g/l de isomaltosa.

Se ha sugerido que la sacarosa inhibe la actividad de las dextranasas comerciales, por lo tanto, la actividad de la dextranasa 6R se evaluó en presencia de un 12% de sacarosa para observar cualquier efecto sobre velocidades iniciales.

EVALUACION DE LAS REACCIONES DE HIDROLISIS DE DEXTRANA.

La hidrólisis de dextrana se evaluó utilizando la ecuación integrada de Michaelis-Menten con respecto al tiempo. La concentración de producto y la V_{max} fueron expresadas en las unidades correspondientes de isomaltosa. La dosis de enzima utilizada para este experimento fue de 1 UD/ml, aplicada sobre soluciones de sustrato de 25 g/l durante 150 min, a pH 7.0 y 50°C.

La caracterización de los productos de la hidrólisis se llevó a cabo por cromatografía de alta presión (HPLC) en un cromatógrafo ISCO Inc. Mod. 2350 (Medford, MA USA), equipado con detector de índice de refracción Altex. Mod. 156 (Fullerton, CA USA). La columna utilizada fue una Altex PW-5000 a un flujo de 0.25 ml/min, utilizando agua como eluyente. Los estándares fueron soluciones de 25 g/l de dextranas de una amplia gama de pesos moleculares (70,000 a 40 millones de daltons).

A fin de comprobar la capacidad de la dextranasa 6R para disminuir la viscosidad de un jugo de caña que contiene dextrana, se disolvió dextrana industrial (Sigma Chem. Co.) en guarapo a una concentración de 15 g/l y se trató con los niveles recomendados por los fabricantes de dextranasas comerciales, adicionando 100 UD/g de dextrana presente en el jugo. La reacción se llevó a cabo en un viscosímetro Cannon-Fenske No. 100 que contenía 10 ml del jugo tratado y el viscosímetro se sumergió en un baño de temperatura constante a 55°C. En el tiempo cero se añadió la enzima para observar a distintos intervalos la disminución del tiempo de caída de la muestra, comparando con un control del jugo sin adición de dextrana.

RESULTADOS Y DISCUSION

AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS.

A partir de los experimentos de aislamiento y selección sobre diferentes ambientes, se obtuvieron un total de 23 cepas capaces de crecer en medios de cultivo sólidos con dextrana como única fuente de carbono. Estas cepas fueron posteriormente sembradas en medio sólido con dextrana azul como fuente de carbono. Se obtuvieron tres cepas silvestres distintas, capaces de formar un halo incoloro alrededor de la colonia después de 24 a 48 horas de sembradas. Así mismo, se observó que el tamaño y la velocidad de formación del halo no son proporcionales a la productividad de la cepa, cuando posteriormente se compararon estas observaciones con la productividad en fermentación sumergida.

MORFOLOGIA Y TAXONOMIA.

Las principales cepas formadoras de halo en dextrana azul fueron sometidas a una serie de pasos hasta lograr su identificación ya que al trabajar con cepas silvestres es importante conocer la identidad del microorganismo en cuestión, que no debe estar relacionada con algún microorganismo indeseable. Los datos de crecimiento y diámetro de tres de las cepas silvestres aisladas y dos más de colección analizadas en siete diferentes medios de

cultivo se presentan en la Tabla 6. Las descripciones de morfología colonial y medidas microscópicas se describen en cada sección:

1. Penicillium purpurogenum

a. Caracterización colonial

La descripción morfológica se hace sobre colonias de cultivos con 7 días de edad.

- Medio CYA, 25°C. Colonia circular, plana, de bordes definidos. El crecimiento es denso, uniforme y de media profundidad. El micelio es blanco o amarillo. La conidiogénesis, abundante, cubre de un verde mate (26-3E a 26-4E) a toda la colonia. La textura de la colonia tiene un aspecto velutinoso, y en ocasiones se forman surcos radiales poco profundos y hacia la parte central de la colonia. La mayoría de los conidióforos emergen directamente del sustrato, aunque algunos se originan en hifas aéreas. Estas hifas se encuentran entrelazadas en funículos laxos, distribuidos en toda la superficie de la colonia, y se acumulan hacia la parte central, donde en ocasiones se presenta una pigmentación roja o amarilla. El reverso de la colonia presenta una pigmentación rojo oscuro (9-7F) en el centro a un rojo claro (8-8C) en la periferia. Al 7º día de cultivo, en aproximadamente el 60% de las colonias se libera un pigmento rojo soluble, que se difunde en el medio, y antes de 10 días de inoculación en el 100% de las cajas se nota la pigmentación en toda la placa. Un cultivo líquido con 5 días de incubación permite recuperar una buena parte del pigmento.

TABLA 6. DATOS DEL CRECIMIENTO DE CINCO CEPAS EN DIVERSOS MEDIOS DE CULTIVO

CEPA Tiempo de incubación (días)	MEDIOS DE CULTIVO / TEMPERATURA DE INCUBACION						
	H&N No. 6 25°C	EMA No. 9 25°C	EMA No. 10 25°C	CYA No. 8 25°C	CYA No. 8 37°C	CYA No. 8 5°C	G25 No. 11 25°C
<u>Penicillium</u> <u>purpurogenum</u> A, B, C (7)	R=20-23 \bar{x} =22.28 s=0.98 (15)	R=35-42 \bar{x} =38.93 s=2.08 (15)		R=28-32 \bar{x} =29.7 s=1.29 (18)	R=7-11 \bar{x} =9.37 s=1.44 (18)		R=3-4.5 \bar{x} =3.77 s=0.44 (18)
<u>Paecilomyces</u> <u>lilacinus</u> 6R (14)	R=34-38 \bar{x} =35.83 s=1.34	R=71-75 \bar{x} =73.22 s=1.13	R=65-70 \bar{x} =67.5 s=1.06				
<u>Paecilomyces</u> sp. blanco (14)	R=43-45 \bar{x} =44.0 s=0.71 (6)	R=70-73 \bar{x} =70.83 s=1.07 (6)	R=64-67 \bar{x} =65.33 s=0.94 (6)				
<u>Paecilomyces</u> <u>lilacinus</u> NRRL-895 (14)	R=32-37 \bar{x} =34.26 s=1.14 (6)		R=60-65 \bar{x} =63.02 s=1.04 (6)				
<u>Penicillium</u> sp. 7V (7)	R=18-21 \bar{x} =19.23 s=0.96 (6)	R=34-39 \bar{x} =36.88 s=1.88 (8)		R=34-39 \bar{x} =35.5 s=1.41 (9)	R=3.5-4.2 \bar{x} =4.01 s=0.34 (6)	R=3 (6)	R=21-24 \bar{x} =22.06 s=0.76 (9)

Los resultados se expresan en mm.

Entre paréntesis se escribe el número de colonias medidas en esa condición

R = rango de crecimiento (mínimo-máximo)

\bar{x} = promedio

s = desviación estándar

-EMA a 25°C. Colonia semicircular a ovalada, plana, de bordes poco definidos. Crecimiento esparcido, poco compacto, de aspecto velutinoso a terroso. Conidiogénesis muy abundante, de color verde (27-4E), similar del de CYA, pero de menor intensidad. Los conidióforos emergen tanto del micelio subsuperficial, como de las hifas aéreas dispuestas homogéneamente en toda la superficie colonial. El reverso de la colonia es incoloro, y la pigmentación soluble ausente. En la mayoría de las colonias se presentan gotas de un exudado de color amarillo claro o ambarino, y son más abundantes hacia el centro.

-G25N a 25°C. Colonias muy pequeñas, ovales, planas, con bordes definidos. La colonia es de color blanco rosáceo, de aspecto velutinoso, con un crecimiento únicamente micelial, sin conidiogénesis. El reverso es incoloro y la pigmentación soluble ausente.

-CYA a 37°. Colonias circulares color de rosa (92-A a 93-A), de bordes definidos. El crecimiento es compacto y de aspecto velutinoso. La conidiogénesis es ausente y si se presenta, lo hace en la periferia de la colonia. Si se presenta, tiene una pigmentación verde similar a la de CYA a 25°C. El reverso es rojo oscuro (9-7E) y la pigmentación soluble, similar a la de 25°C, pero más abundante.

- CYA a 5°C. El hongo sólo germina para producir microcolonias o bien no hay germinación.

Enseguida se describe la morfología colonial observada en el medio de esporulación utilizado normalmente para el cultivo y la posterior colección de esporas del Paecilomyces lilacinus para inocular las fermentaciones:

- Medio Hultin & Nordstrom a 25°C. Colonia plana, circular, con un crecimiento más compacto que en medio EMA. Esporulación abundante que cubre toda la colonia desde los primeros días de cultivo. El color de la colonia, rosa intenso (10-3B a 10-2A), está dado por la conidiogénesis. El reverso es incoloro, y no se presenta la pigmentación soluble ni los exudados.

b. Caracterización microscópica

Los caracteres microscópicos se describen para el crecimiento en CYA a 25°C a los 7 días de cultivo.

La estructura microscópica corresponde a la de un Penicilliu biverticilado, simétrico, con penicilio o escobilla terminal (subgénero Biverticillium). Las dimensiones del penicillio son, en promedio, 22 μ de ancho a 26 μ de largo, y esta forma se debe a que las métulas y las fiálides se presentan apretadas. El estípite de los conidióforos, cuya base se encuentra en el sustrato, suele ser más largo que aquél de los conidióforos en hifas aéreas. En el primer caso las estípites miden de 100 a 250 μ de largo por 2 a 3 μ de ancho, y en el segundo de 70 a 200 μ de

largo por 2 a 3 μ de ancho. Las métulas, 3 a 5 por verticilio, miden de 8.5 a 13 μ de largo ($x=11.2$) por 1.5 a 3 μ de ancho. Tanto las métulas como el estípote son del tipo no vesiculado. Las fiálides son acerosas, con cólulas finas y alargadas. Sus medidas son: 1.5 a 2.3 μ de ancho ($x=2$), por 8.5 a 13.0 μ de largo ($x=11.4$). Las fiálides son de 3 a 5 por métula. Los conidios son subesferoidales a elipsoidales. finamente rugoso y miden de 2.3 a 3.0 μ ($x=2.7$) en su dimensión mayor. El conidióforo es su totalidad presenta un color verde pálido, aunque los conidios están más intensamente pigmentados.

c. Ubicación taxonómica.

El género Penicillium se caracteriza por tener conidióforos bien diferenciados, de estructura penicillada, y por presentar un color verde en la conidiogénesis.

Dentro del género Penicillium, la especie Penicillium purpurogenum se encuentra ubicada dentro del subgénero Biverticillium. Este subgénero se caracteriza por la presencia en el conidióforo de sólo dos verticilios, la simetría del penicillo, y la longitud similar de métulas y fiálides. Dentro de Biverticillium a Penicillium purpurogenum se la distingue por la estructura apretada o angosta del penicillo (más largo que ancho), el estípote generalmente mayor de 60 μ , y la liberación de un pigmento soluble de color rojo cuando se cultiva en CYA.

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género y especie: Penicillium purpurogenum

2. Paecilomyces lilacinus 6R

a. Caracterización colonial.

Esta descripción se hace para colonias cultivadas por 14 días.

- EMA a 25°C. Colonia plana, circular, de bordes definidos, de aspecto seco y velutinoso y de olor indistinto. El crecimiento es de densidad media a esparcido, y medianamente flocooso. El micelio es de color blanco. La conidiogénesis, que cubre casi toda la colonia, le da un color rosa grisáceo (10-3B a 11-3B) en el centro, y rosa claro (10-2A) en la periferia. El reverso de la colonia es incoloro, y no se presenta pigmento soluble ni exudado. Los conidióforos emergen del micelio sumergido, salvo en la parte central de la colonia donde existen agregados de hifas aéreas. La conidiogénesis es notablemente mayor hacia el centro de la colonia.

b. Caracterización microscópica.

Las preparaciones fueron hechas de colonias de 14 días cultivadas en EMA a 25°C.

Micelio vegetativo hialino, liso, septado, de 2 a 3 μ de ancho. Clamidosporas ausentes. Conidióforos de aspecto penicilado que, a diferencia de las hifas, se encuentran pigmentados de un color vináceo a rojo suave, y presentan paredes gruesas, marcadamente rugosas.

Los estípites son septados, de 2 a 3 μ de ancho ($x=2.9$), y de 340 a 600 μ de largo ($x=440$). Los de menor longitud (350 μ aprox.), pertenecen a conidióforos que se originan en el micelio aéreo. Los verticilios, generalmente se presentan uno terminal, y de 2 a 4 laterales subterminales. Las fiálides, 2 a 4 por verticilio, miden de 2 a 2.5 μ ($x=2.3$) en su parte más ancha, y de 7 a 9 μ de longitud ($x=7.7$). Su estructura cilíndrica, de base elipsoidal y cuello angosto, se parece más a la descrita para Paecilomyces marquandii, por lo que puede pensarse que se trata de una forma intermedia, forma cuya existencia es reconocida por Samson (1974).

Los conidios se presentan en cadenas cortas y "en masse" aparecen pigmentados del mismo color vináceo del resto del conidióforo. Sus formas son variadas, subesferoidales a fusiformes, y ligeramente rugosos. Sus medidas son: 2 a 3.5 μ de largo por 2 a 2.5 μ de ancho (3 x 2.1 μ en promedio).

c. Ubicación taxonómica.

El género Paecilomyces se caracteriza por un buen crecimiento en medios sintéticos, hifas lisas, hialinas y septadas. Las estructuras conidiógenas son snemáticas o moniemáticas, y consisten en su mayoría en conidióforos verticilados o irregularmente ramificados, que tienen terminalmente fiálides conidiógenas cilíndricas o ampiliformes. Los conidios se presentan en cadenas secas, hialinas o ligeramente pigmentadas, lisas o equinulasas, de varias formas. Clamidosporas presentes o ausentes.

Dentro del género Paecilomyces, la especie Paecilomyces lilacinus corresponde a la sección Isaroides, pues presenta sólo el estado imperfecto, mesofilia y un olor distinto de la colonia.

Paecilomyces lilacinus se caracteriza por presentar un conidióforo bien diferenciado, penicilado, parecido al de Penicillium, que suele ser pigmentado y rugoso a diferencia de las hifas vegetativas. Paecilomyces lilacinus difiere de Paecilomyces marquandii en que este último presenta clamidosporas en el micelio vegetativo.

Reino: Fungi
División: Eumycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género y especie: Paecilomyces lilacinus

3. Paecilomyces sp. blanco.

a. Caracterización colonial, para colonias de 14 días.

- EMA a 25°C. Colonia circular, de bordes definidos, de color blanco. El crecimiento es flocoso, de aspecto marcadamente algodonoso. No hay conidiogénesis. Reverso incoloro, sin pigmento soluble ni exudados.

- Hultin & Nordstrom a 25°C. Colonia circular, plana de bordes definidos, el crecimiento es denso y de aspecto velutinoso. La conidiogénesis, abundante le da a la colonia un color rosa pálida brillante (8-2A a 9-2A).

4. Paecilomyces lilacinus NRRL-895

a. Caracterización colonial. Descripción de colonias de 14 días.

- EMA a 25°C. Colonia circular, plana, de bordes definidos. Crecimiento de densidad media, de aspecto velutinoso a flocoso. El micelio es de color blanco, y la conidiogénesis, moderada, da

a la porción central de la colonia un color rosa claro (10-2A a 11-2A). El reverso de la colonia es incoloro y no existen pigmento soluble o exudados.

- Hultin & Nordstrom a 25°C. Colonia circular, plana, de bordes definidos. Crecimiento denso de aspecto velutinoso. Los conidióforos cubren toda la colonia, dándole un color rosa grisáceo (10-2A a 10-3B).

Las colonias de Paecilomyces lilacinus NRRL-895 en ambos medios tiene un gran parecido con las colonias de Paecilomyces lilacinus 6R.

5. Penicillium sp. 7V.

a. Caracterización colonial. Se describen colonias de 7 días de cultivo.

-CYA a 25°C. Colonia circular, de bordes definidos, de aspecto velutinoso y profundamente sulcada. Presenta un crecimiento muy denso y con abundante conidiogénesis de colores diversos, según la edad: en el centro de la colonia, como una borla, un color amarillo pálido (2-3A), y en el resto, diferentes tonos de verde, que van desde verde limón (28-5E) en la porción central, al verde azulado (25-4D) en la periferia. El reverso de la colonia es color amarillo grisáceo (2-2B) y no se presentan pigmentos solubles o exudados.

- EMA a 25°C. Colonia circular, plana, de bordes no definidos, de aspecto velutinoso y crecimiento disperso. La esporulación abundante cubre toda la colonia, y le da una coloración verde mate (26-3E a 26-4E), que es más intensa hacia el centro de la colonia.

FERMENTACIONES PRELIMINARES EN MATRACES ERLLENMEYER.

De las cepas aisladas en este estudio las tres cepas silvestres que crecían con mayor velocidad en cajas de dextrana azul: P. purpurogenum, P. lilacinus 6R y la cepa de Penicillium denominada 7V fueron sometidas a fermentación sumergida y su actividad se comparó con algunas cepas de colección: un Paecilomyces sp. y un Penicillium funiculosum, ambos de la colección de la Facultad de Química, y un Paecilomyces lilacinus NRRL-895. El patrón de producción de estas cepas se muestra en la figura 6. P. purpurogenum resultó ser la cepa más productiva, con una actividad máxima a las 90 horas de cultivo. Esta cepa es la única que mostró una disminución de la actividad enzimática no relacionada a la lisis celular, probablemente debido a una desnaturalización o a la liberación de proteasas en el medio. Las otras cepas mostraron un comportamiento diferente ya que la actividad enzimática se manifestó en un estadio posterior y se incrementó con el tiempo alcanzando un valor cercano a 20 UD/ml alrededor del 7° día de la fermentación. P. purpurogenum y P. lilacinus 6R mostraron actividades similares: de 18 y 19 UD/ml respectivamente al cabo de 7 días de

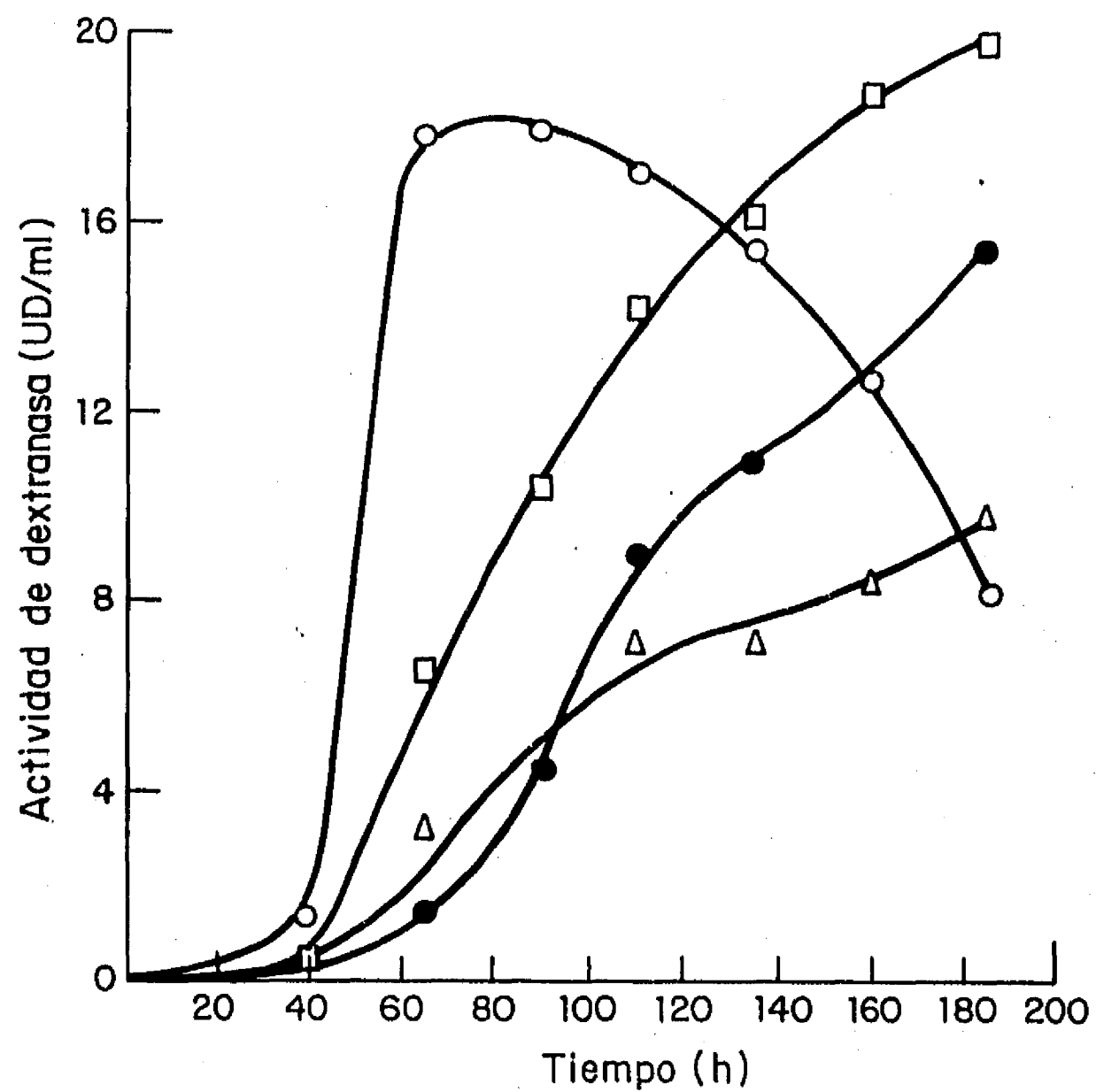


Fig. 6. Cinética de producción de dextranasa con distintas cepas
-○- *P. purpurogenum*, -□- *Paecilomyces lilacinus* 6R,
-●- *Paecilomyces* sp., -△- *Paecilomyces lilacinus* NRRL-895

fermentación. Sin embargo la productividad de la cepa de Penicillium es de 0.291 con respecto a 0.108 UD/mlhr del Paecilomyces. Los resultados detallados de estas fermentaciones se encuentran en la Tabla 7 donde se muestra la actividad, la actividad específica y la productividad de las cepas evaluadas.

P. purpurogenum ha sido reportado previamente como productor de dextranasa (Kosaric et al., 1973; Preobrazhenskaya y Manikova, 1975). Sin embargo, también se le conoce como productor de rubratoxinas. (Pitt, 1979; Smith, 1985; Pohland y Mislivec, 1976), por lo que se decidió descartar a este microorganismo del estudio, ya que el uso de células o productos derivados de esta especie deben ser excluidos de aplicaciones de alimentos y salud por los riesgos que involucran.

Considerando los resultados de la figura 6 se observa que la mejor cepa productora de dextranasa después de Penicillium purpurogenum es la cepa denominada 6R, que es un Paecilomyces lilacinus. Con respecto la especie Paecilomyces puede mencionarse que algunas cepas producen antibióticos (Samson, 1974) pero hasta ahora no se encuentran reportes sobre la producción de toxinas en esta especie (Pohland y Mislivic, 1976). Sin embargo no se le ha concedido un status GRAS (Generally Recognized as Safe) a Paecilomyces, pero tampoco a Chaetomium que es la especie utilizada industrialmente para la producción de dextranasa. Es por todo lo anterior que la cepa 6R se seleccionó para los experimentos posteriores de este trabajo.

TABLA 7. ACTIVIDAD DE DEXTRANASA DE CEPAS AISLADAS Y ALGUNAS CEPAS DE COLECCION .

CÓDIGO	NOMBRE	FUENTE	ACTIVIDAD (UD/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UD/mg prot.)	PRODUCTIVIDAD (UD/ml h)
6 Rosa	<u>Paecilomyces lilacinus</u>	Soluciones contami- nadas de dextrana	20	101	0.108
<u>Penicillium</u>	<u>P. purpurogenum</u>	Medio contaminado con <u>P. funiculosum</u>	19	104.8	0.291
<u>Paecilomyces blanco</u>	<u>Paecilomyces</u> sp.	Cepario de la Facultad de Química	15	61.7	0.083
NRRL-895	<u>P. lilacinus</u>	Colección NRRL	10	63.9	0.054
NRRL-3647	<u>P. funiculosum</u>	Collección NRRL	5	n.d.	n.d.
7 Verde	<u>Penicillium</u> sp.	Soluciones de dextrana contaminadas	0.4	3.6	0.002

n.d. no determinado

En la figura 7 aparece la cinética de fermentación de la cepa 6R. En estos cultivos, se realizó la medición de carbohidratos totales residuales que es un parámetro confiable para monitorear el proceso. La determinación de peso seco, aunque presenta algunas dificultades por el manejo del micelio, se correlaciona con el consumo de carbohidratos totales por lo que se optó por utilizarla en las fermentaciones posteriores. En la figura 7 se muestra que la producción de dextranasa estuvo claramente no-asociada al crecimiento, siendo importante en la última porción de la fase de crecimiento y después, cuando la biomasa disminuye y se alcanza al 7º día de cultivo una producción de 20 UD/ml. Esto ocurrió 4 días después que se alcanza la máxima producción de biomasa. Los carbohidratos residuales totales al final del proceso fueron corresponden a un 15% del valor inicial.

OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

La composición del medio de cultivo fue optimizada con un diseño experimental, siguiendo la técnica de Box-Wilson, con unidades de variación de 5, 2, 0.1 y 0.05 g/l para dextrana, extracto de levadura, CaCl₂ y MgCl₂ respectivamente. La composición de los 16 medios de cultivo ensayados inicialmente se encuentran en la tabla 8, incluyendo los resultados de actividad enzimática para cada caso. La ecuación de correlación que incluye los coeficientes de variación requeridos para la optimización es:

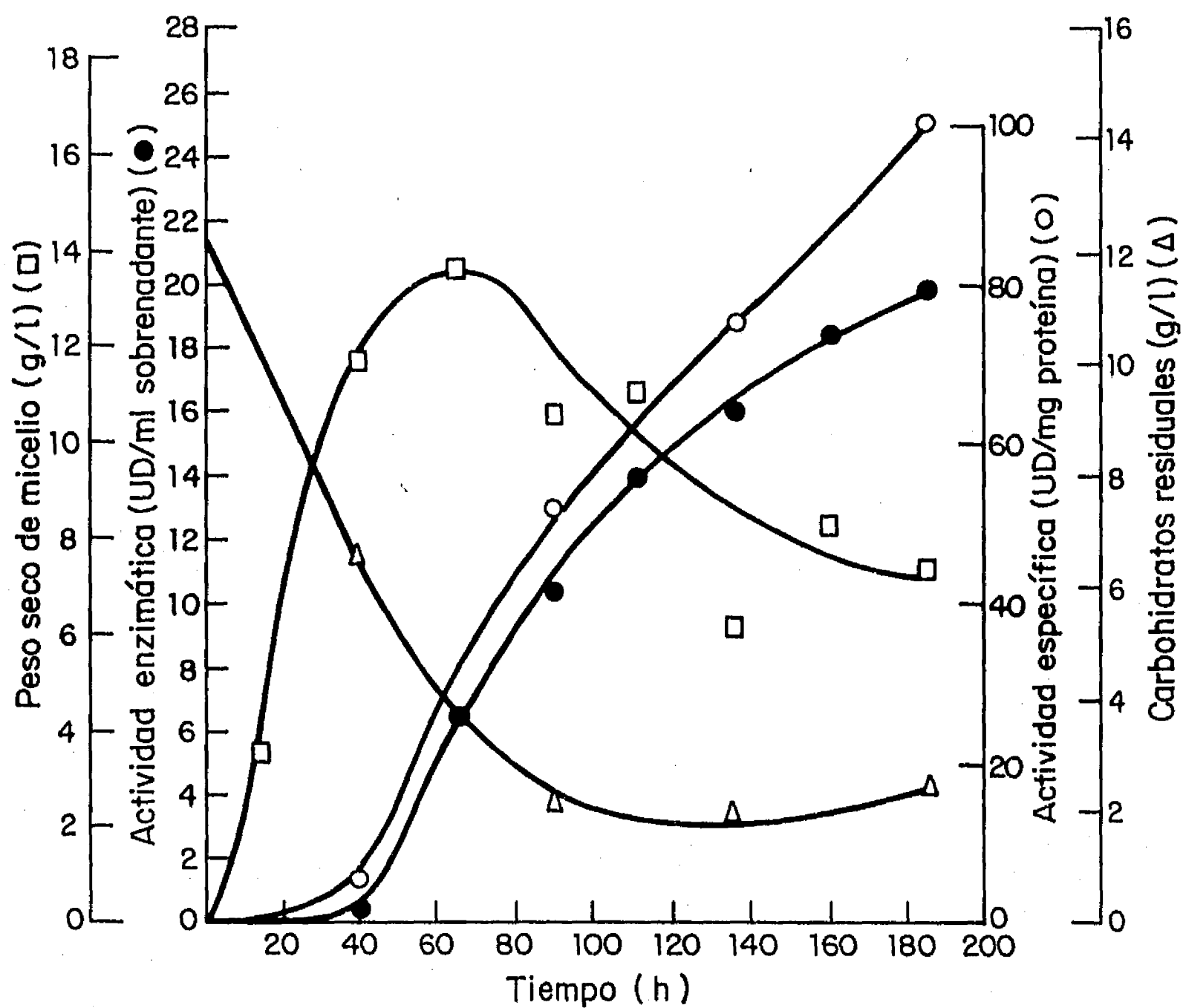


Fig. 7. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Paecilomyces lilacinus* 6R en el medio con dextrana industrial 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, CaCl 0.4 g/l y MgCl · 6H₂O 0.2 g/l, en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.0 para *Paecilomyces* y pH 5.8 para *Penicillium*.

TABLA 8. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD SOBRE DIECISEIS MEDIOS DISTINTOS.

	X1	X2	X3	X4	(UD/ml)		X1	X2	X3	X4	(UD/ml)
I	-	-	-	-	27.82	IX	-	-	-	+	19.50
II	+	-	-	-	16.88	X	+	-	-	+	11.68
III	-	+	-	-	27.72	XI	-	+	-	+	30.63
IV	+	+	-	-	31.94	XII	+	+	-	+	26.93
V	-	-	+	-	27.59	XIII	-	-	+	+	29.72
VI	+	-	+	-	14.76	XIV	+	-	+	+	16.86
VII	-	+	+	-	30.03	XV	-	+	+	+	22.79
VIII	+	+	+	-	20.25	XVI	+	+	+	+	31.67

X1 = Dextrana

X2 = Extracto de levadura

X3 = CaCl₂

X4 = MgCl₂

Los signos + y - significan nivel alto y bajo de cada factor.

$$Y = 24.17 - 0.45X_1 + 0.04X_2 + 3.572X_3 - 2.802X_4$$

donde Y = actividad enzimática (UD/ml)

X₁ = dextrana (g/l)

X₂ = extracto de levadura (g/l)

X₃ = CaCl₂ (g/l)

X₄ = MgCl₂ (g/l)

Cada coeficiente de correlación multiplicado por su correspondiente unidad de variación sugiere que para disminuir la concentración de dextrana 1 g/l del nivel base, hay que disminuir el MgCl₂ 0.0016g/l, aumentar el CaCl₂ en 0.0029 g/l y aumentar el extracto de levadura en 0.5 g/l. Por lo tanto, sólo la dextrana y el extracto de levadura se consideraron significativos para los experimentos finales de optimización debido a la baja respuesta en variación para las sales de calcio y de magnesio. Los seis medios de cultivo resultantes se muestran en la Tabla 9 con los resultados de cada fermentación en términos de la producción de dextranasa. Se observa que el medio de cultivo más adecuado resulta ser el que contiene: 16 g/l de dextrana, 9.12 g/l extracto de levadura, 0.40 g.l CaCl₂ y 0.25 g/l MgCl₂, ya que permitió un incremento en la actividad a 36.05 UD/ml en el sobrenadante de fermentación.

La cinética de fermentación de Paecilomyces lilacinus 6R con el medio optimizado se muestra en la figura 8. El microorganismo mostró el mismo comportamiento, alcanzando una actividad máxima

TABLA 9. RESULTADOS FINALES DE LA TECNICA DE BOX-WILSON.

	MgCl ₂ (g/l)	CaCl ₂ (g/l)	Ext. levadura (g/l)	Dextrana (g/l)	Actividad (UD/ml)
Medio base	0.25	0.40	8.00	20	31.43
XVII	0.25	0.40	8.28	19	31.25
XVIII	0.25	0.40	8.56	18	32.79
XIX	0.25	0.40	8.84	17	35.66
XX	0.25	0.40	9.12	16	36.05
XXI	0.25	0.40	9.40	15	34.11
XXII	0.25	0.40	9.68	14	31.23

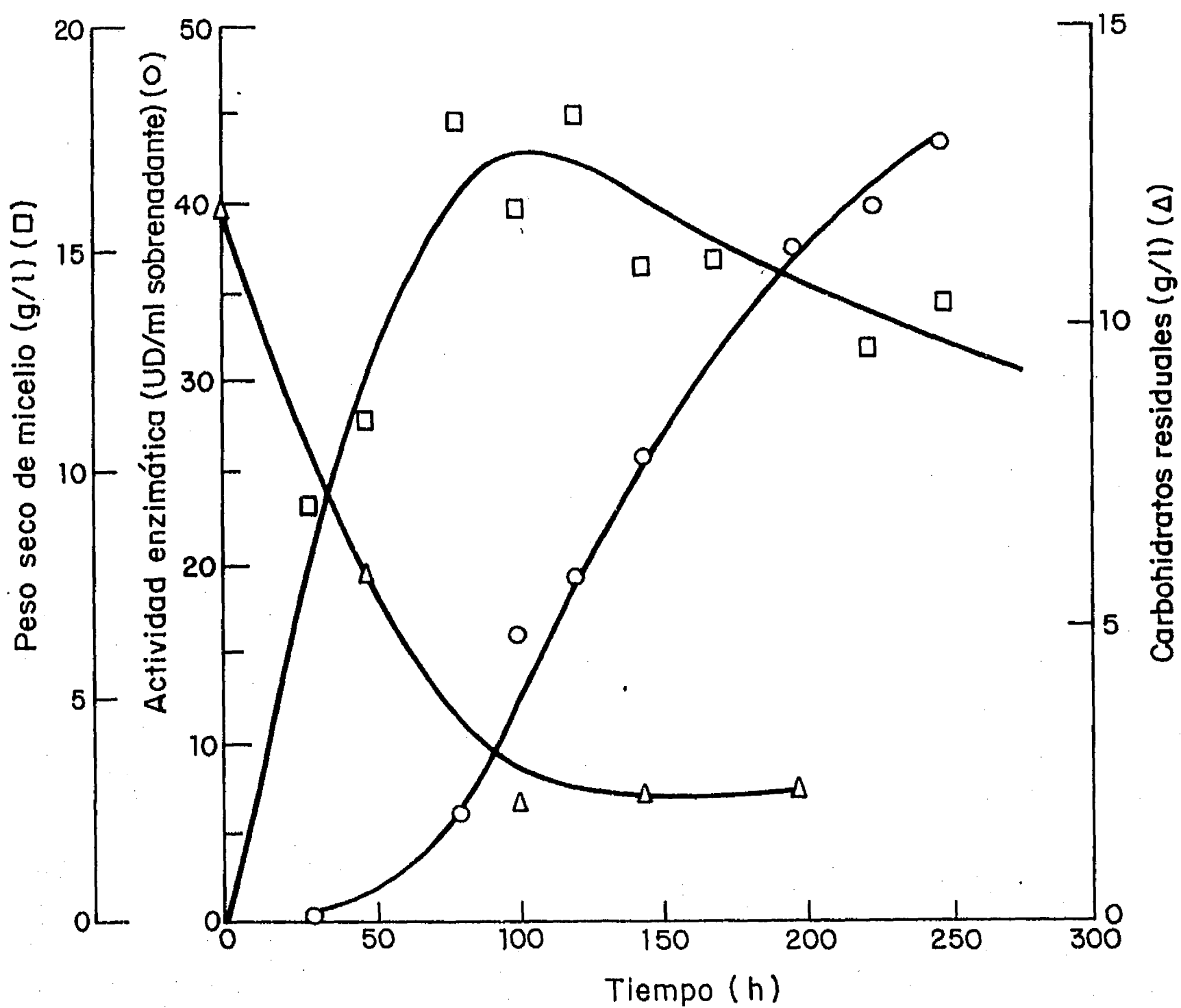


Fig. 8. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de Paecilomyces lilacinus 6R en el medio optimizado: dextrana industrial 16 g/l, extracto de levadura 9.1 g/l, CaCl 0.4 g/l y MgCl · 6H₂O 0.2 g/l, en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.0 para Paecilomyces y pH 5.8 para Penicillium.

en este caso particular de alrededor de 42 UD/ml. La velocidad específica de crecimiento resultó ser de 0.25 h y la productividad de 0.198 UD/ml h (ver tabla 7). En lo que respecta a otros parámetros de la fermentación, no se hallaron diferencias en la producción de la enzima cuando el pH inicial de la fermentación fue fijado en 5.4, 6.4 ó 7.0. En todos estos casos la forma de la curva de producción coincide (fig. 9).

USO DE GLUCOSA Y/O DEXTRANA COMO FUENTE DE CARBONO.

Se llevaron a cabo algunos experimentos donde se hizo crecer la cepa en un monosacárido y en presencia del polisacárido inductor. Esto permitiría obtener una cierta concentración de biomasa que una vez agotada la fuente de carbono de fácil asimilación utilizaría el inductor para la producción de la enzima. A partir de los resultados de la figura 10, es evidente que este enfoque no fue certero: las mejores productividades se obtuvieron con dextrana como única fuente de carbono, produciéndose únicamente el 75% de la actividad original cuando la fuente de carbono estuvo compuesta por 1/3 glucosa y 2/3 dextrana; se obtuvo un 60% de actividad cuando la glucosa y la dextrana estuvieron en cantidades equivalentes. En todos los experimentos la concentración de la fuente de carbono fue de 16 g/l. Aquí se observó un efecto de inhibición catabólica donde el aprovechamiento de una fuente de carbono que se utiliza muy rápidamente inhibe la actividad de algunas enzimas (Paigen y Williams, 1970).

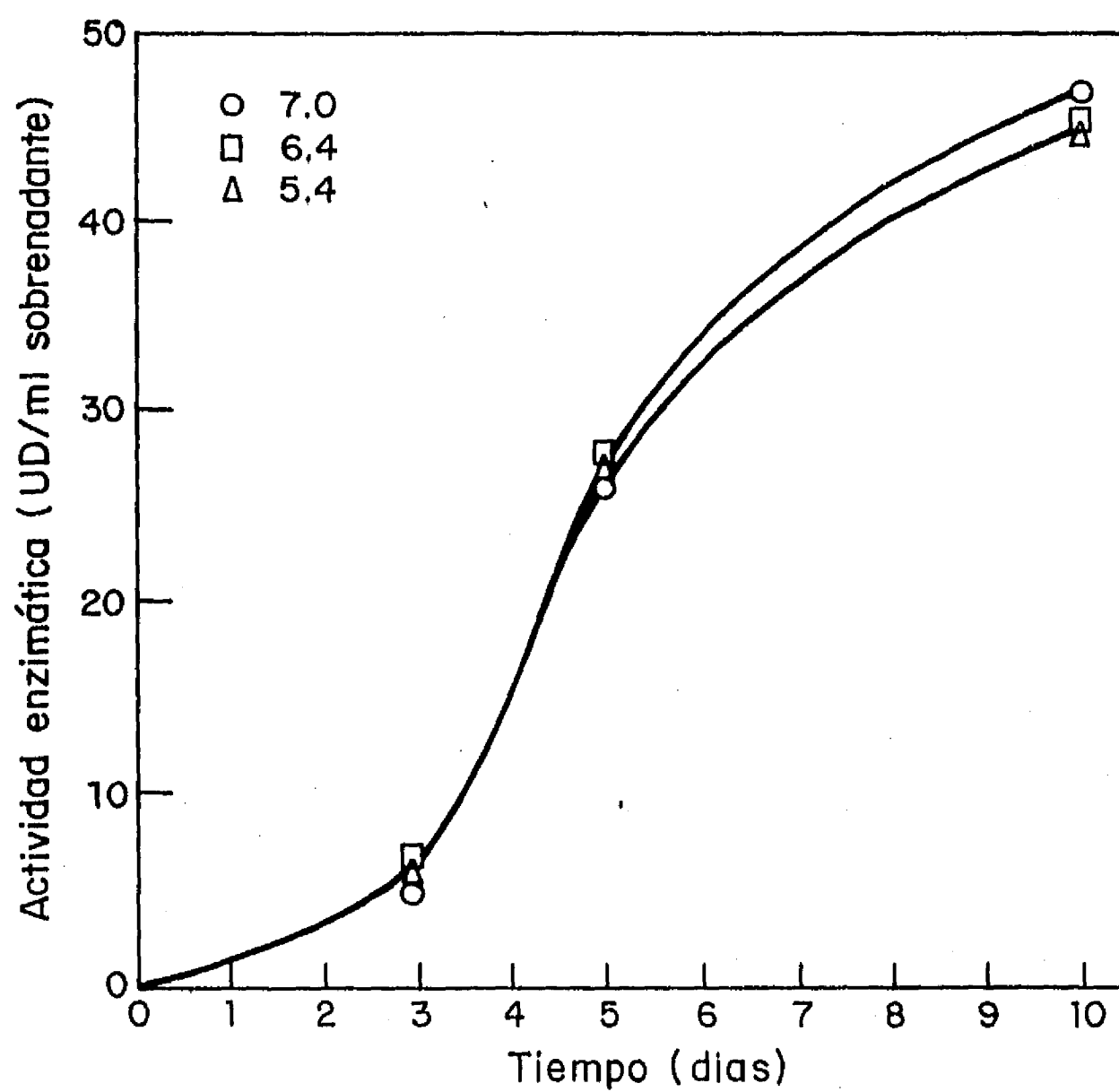


Fig. 9. Efecto del pH inicial de la fermentación sobre la producción de dextranasa de P. lilacinus 6R
-○- pH 7.0, -□- 6.4, -△- 5.4

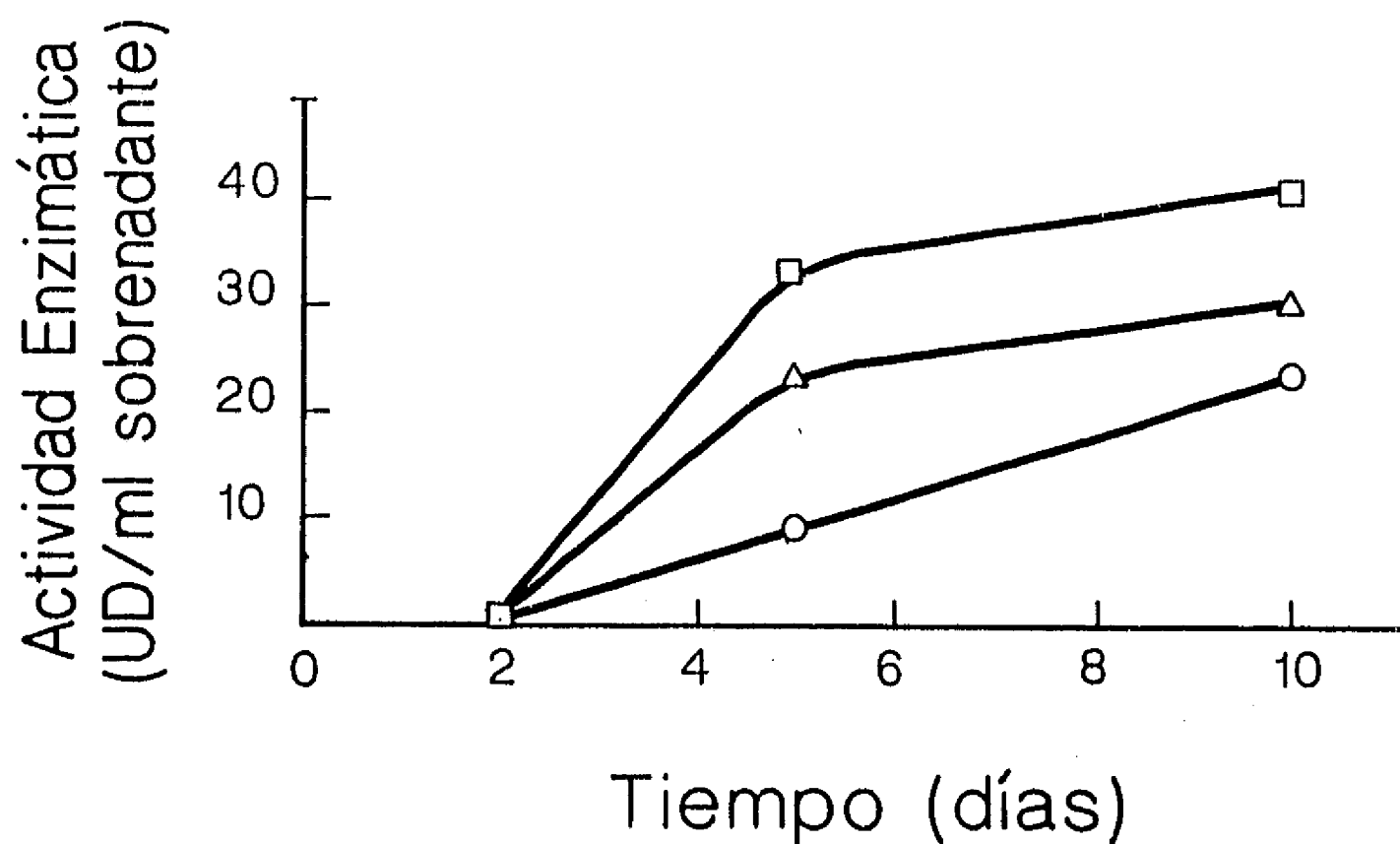


Fig. 10. Producción de dextranasa de *P. lilacinus* 6R con glucosa y dextrana como inductores:
 -□- dextrana industrial, -△- 1/3 glucosa y 2/3 dextrana, -○- 1/2 dextrana y 1/2 glucosa.
 Concentración total de carbohidratos: 16 g/l.

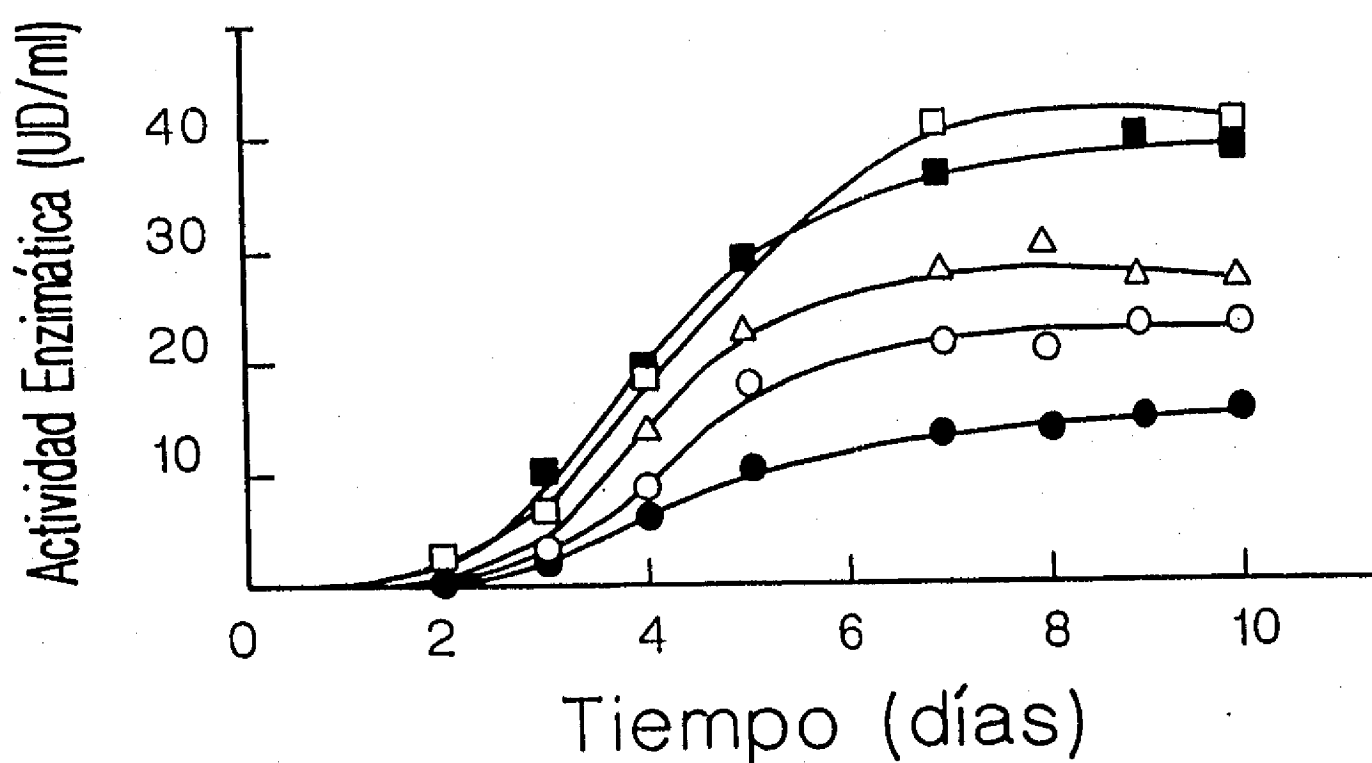


Fig. 11. Producción de dextranasa de *P. lilacinus* 6R con dextrana e hidrolizado de dextrana como inductores.
 -□- control 16 g/l dextrana industrial,
 -■- control + 0.1% Tween 80, -△- 70/30 dextrana/hidrolizado, -○- 50/50 dextrana hidrolizado, -●- 100% hidrolizado

USO DE DEXTRANA Y/O DEXTRANA HIDROLIZADA COMO INDUCTORES.

Para la obtención de hidrolizados de dextrana utilizados como inductores, se partió de dextrana industrial de alto peso molecular tratada con una dextranasa comercial hasta obtener principalmente isomaltosa (Ver Fig. 17B.V.). Este hidrolizado fue utilizado como única fuente de carbono, o bien se mezcló con dextrana industrial intacta a manera de obtener soluciones de IE (isomaltosa equivalente) de 30 y 50. Los resultados se compararon con un control que contenía un 100% de dextrana industrial de alto peso molecular intacta. La figura 11 muestra que el mejor inductor para la producción de dextranasa es la dextrana intacta, obteniéndose 41 UD/ml versus 27, 23 y 16 UD/ml cuando las mezclas eran de 30 IE, 50 IE y el hidrolizado 100% respectivamente (todos los resultados corresponden al 10° día de fermentación). Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Reese, et al. en 1969 donde indicaron que la isomaltosa es un inductor pobre para la producción de dextranasa de P. funiculosum (540 veces menos activo).

La síntesis de enzimas extracelulares se asocia normalmente a la fase exponencial o post-exponencial del crecimiento. Las enzimas que se producen, como la dextranasa, en la fase post-exponencial involucran una desrepresión causada por una modificación de la especificidad de la RNA polimerasa mediante la modulación de un efector o bien por cambios de composición de la RNA polimerasa asociados a algunos eventos como es la esporulación (Ward, 1989).

El ejemplo más difundido de este tipo de carbohidrasas extracelulares es la producción de los distintos tipos de celulasas reportadas por Reese en 1972. Chaetomium globosum consume rápidamente la celulosa durante el crecimiento pero no se detecta actividad extracelular o se detecta en muy bajo grado. Pestalotiopsis westerdijkii consume celulosa pero sólo produce en forma extracelular un componente del complejo de celulasas. Trichoderma viride consume la celulosa más lentamente que otros hongos, pero las enzimas que produce contienen todos los componentes del complejo. Reese, 1972 indicó también que la capacidad inductiva de un polímero (el sustrato de la enzima) resulta de su hidrólisis a dímeros que son los verdaderos inductores de la polisacarasa. Sin embargo hay microorganismos incapaces de producir celulasa con buenos rendimientos si crecen en medios con 0.5% de celobiosa en matraces agitados. La inducción entonces no se reconoce a causa de una represión catabólica que ocurre aún con bajas concentraciones del dímero. Si la celobiosa se alimenta lentamente y en forma continua (<0.005%) se incrementan los rendimientos de celulasa en forma importante. Los dímeros no se acumulan a una concentración que cause represión porque se consumen tan rápidamente como se producen. Los métodos que permitan la alimentación lenta del inductor al microorganismo en crecimiento, reducen entonces la represión catabólica y mejoran la producción de enzima.

Para el caso de la producción de dextranasa, la isomaltosa es el dímero inductor y Brown (1970) reporta un aumento de 500 veces en la producción de la enzima cuando la isomaltosa se libera lentamente al medio. Esta liberación se logra usando un inductor modificado (ver tabla 1) como el dipalmitato de isomaltosa (Reese et al. 1969) o bien la ceto dextrana (Brown, 1970).

Tomando lo anterior en consideración el experimento se repitió usando ahora dextrana T70, que es una dextrana purificada y de PM controlado y que hidrolizada exhaustivamente con dextranasa 6R muestra en HPLC un solo pico (Ver Fig. 19A.d.) a diferencia de la dextrana industrial que presenta dos (Fig. 19B.V.). Como se observó (Fig. 17), existe así mismo una diferencia en el efecto de la dextranasa 6R sobre las dextransas de alto PM que no se hidrolizan del todo y la dextrana T70 que es hidrolizada de forma más completa. El hidrolizado se usó como fuente de carbono a 16g/l. En el experimento A de la figura 12 se adicionaron 16g/l de isomaltosa desde el principio de la fermentación. En el B se intentó hacer una fermentación alimentada añadiendo 0.5 ml de una solución de 200g/l de isomaltosa cada 12 horas durante 7 días hasta completar un total de 16 g/l. Comparada con el control que a los 12 días produjo un máximo de 55 UD/ml, la fermentación A que produce 54 UD/ml no presentó una diferencia significativa. La principal implicación de este experimento es que la producción de dextranasa 6R no sufre de represión catabólica con isomaltosa y el cultivo tiene una productividad similar a la obtenida con dextrana industrial como inductor. De hecho si se compara este

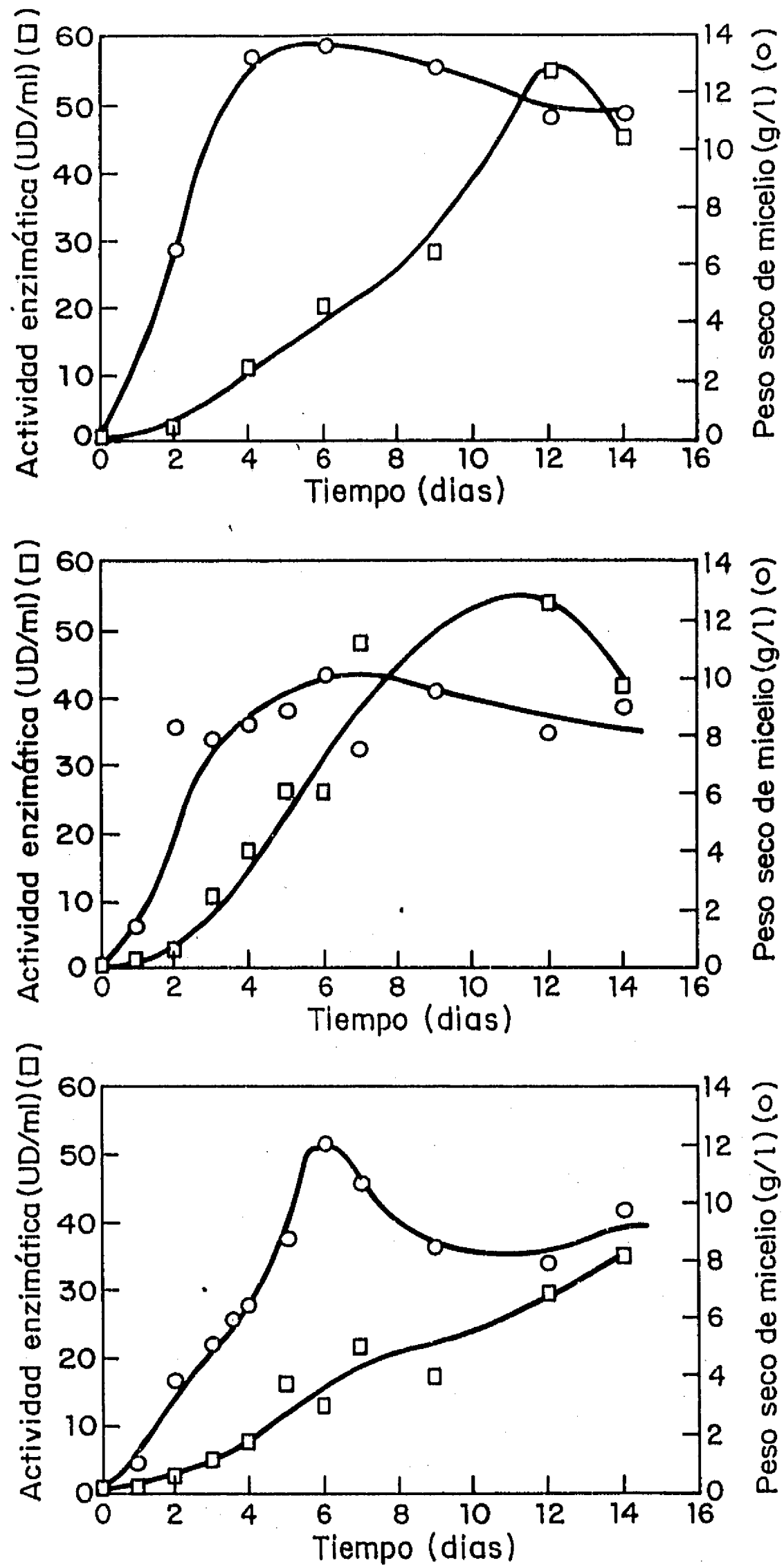


Fig. 12. Efecto de la adición de isomaltosa como inductor en la cinética de crecimiento y de producción de dextranasa.
 A: isomaltosa 16 g/l, B. isomaltosa alimentada 0.1g cada 12 horas durante 7 días. Control: 16 g/l dextrana industrial

último experimento con la curva control puede observarse una mayor velocidad de producción de dextranasa en los primeros días de la fermentación con isomaltosa, aunque al final se alcanzan niveles similares. De esta forma se demuestra que la isomaltosa también es inductor de la enzima. Esto explica el efecto inductor de la dextrana que no puede penetrar la pared del micelio en forma polimérica. El experimento B mostró una baja velocidad de producción y requeriría en todo caso una adición controlada del inductor. Aún a los 14 días la enzima se sigue produciendo alcanzando solo 34 UD/ml.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ASOCIADA AL MICELIO Y ACTIVIDAD INTRACELULAR.

Considerando que la dextrana es polimérica y se encuentra fuera de la célula, la dextranasa tiene como objetivo primordial disminuir el tamaño molecular del polisacárido para lograr introducir la fuente de carbono al interior de la célula y permitir el crecimiento del microorganismo. En la figura 13 se reporta un experimento que tuvo el objeto de evaluar la actividad del micelio intacto lavado y del micelio lavado y molido a fin de evaluar la actividad de dextranasa intracelular o asociada al micelio.

Con fines comparativos se definen primeramente los términos a usar:

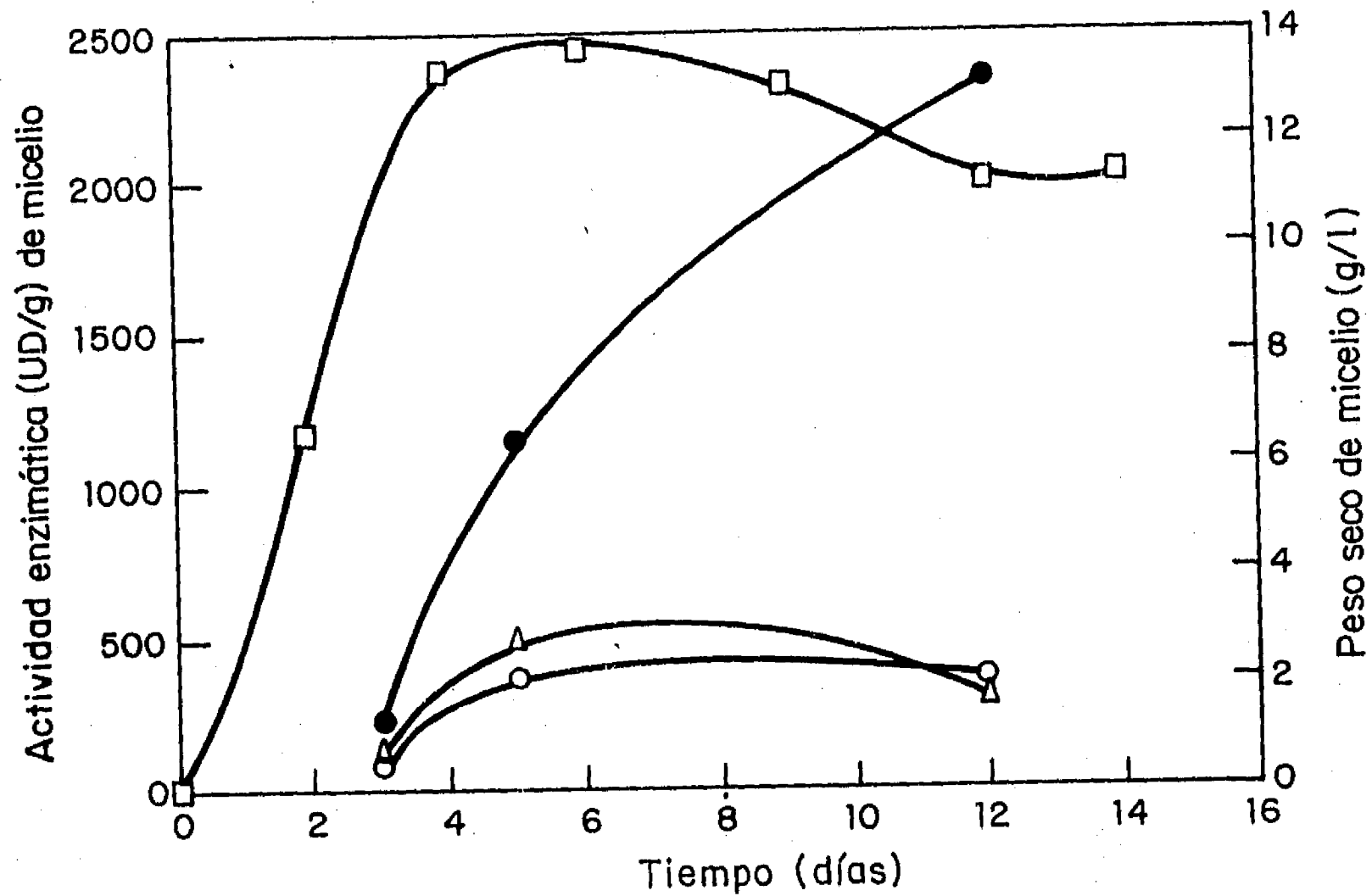


Fig. 13. Evaluación de la actividad asociada al micelio de *P. lilacinus* 6R.

-○- Actividad asociada a la membrana, -△- actividad celular total, -●- actividad soluble.

-□- Peso seco de micelio.

NOTA: Actividad soluble se refiere a la actividad mostrada por el sobrenadante pero dividida entre el peso seco del micelio correspondiente para expresarla en UD/g micelio.

Actividad asociada a la membrana es la actividad que presenta el micelio lavado intacto.

Actividad celular total es la suma de la actividad asociada a la membrana y la actividad intracelular. Se detecta sobre el micelio lavado y molido a alta velocidad.

Actividad soluble es la actividad del sobrenadante de la fermentación pero dividida entre el peso seco de micelio correspondiente.

En la figura 13 la curva del control del cultivo mostró un aumento constante de actividad enzimática durante los 8 días que siguieron al inicio de la fase estacionaria (que se encuentra entre el 4° y 5° días). Después del día 12 se observó una brusca disminución de actividad.

En el quinto día de cultivo la actividad asociada a la membrana no superó las 374 UD/g y la actividad celular total presentó un máximo de 500 UD/g. Estas actividades corresponden al 33 y 44% de la actividad soluble manifestada en el sobrenadante. A partir del 5° y hasta el 12° día se mantuvo constante el nivel de dextranasa asociada a la membrana.

La máxima actividad detectada en este experimento se manifestó al 12° día obteniéndose una actividad soluble de 2300 UD/g en el sobrenadante, tiempo en el que la actividad asociada a membrana fue solo del 15% y la actividad celular total fue del 13%.

La enzima es liberada al medio a una velocidad prácticamente constante entre el 4° y el 12° día, período que coincidió con el inicio de la fase de desaceleración y la fase estacionaria. La dextranasa es entonces producida aún en las condiciones de autólisis, lo que indica que los sistemas de producción enzimática son funcionales y las materias primas aún están disponibles para la síntesis de la enzima.

Los niveles detectables de dextranasa extracelular al inicio de la fermentación fueron sumamente bajos ya que solo se produce la enzima necesaria para crecer. Se observó que la actividad intracelular total es sólo un 35% mayor que la actividad asociada a membrana a 3° y 5° días de cultivo (Fig. 13), lo que indica que no existió un nivel importante de enzima que se acumule en el interior de la célula. Esto impide alcanzar un nivel crítico dentro de la célula que inhiba los sistemas de síntesis de dextranasa. Si nunca se alcanza el nivel crítico porque la enzima se excreta constantemente de la célula, entonces la síntesis se asemeja a un proceso continuo.

Al 12° día la actividad celular total ha disminuido su actividad comparada con la actividad asociada que se mantuvo a 355 UD/g pero la actividad soluble se encuentra en un máximo.

Adicionalmente se llevó a cabo un experimento donde se utilizaba un 0.1% de Tween 80 como agente tensoactivo (también incluido en la figura 11) pero éste no mostró efecto alguno sobre la productividad de la enzima.

CARACTERIZACION DE LA ENZIMA.

EFFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA.

La dextranasa de Paecilomyces lilacinus mostró un pH óptimo de actividad de 5.4 (Fig. 14A), como se reporta para otras cepas de Paecilomyces.

La temperatura óptima de actividad fue de 60°C determinada según un ensayo de actividad al cabo de 9 minutos de incubación. Las dextranasas comerciales presentan valores óptimos entre 50 y 60°C. (Godfrey y Reichelt, 1983; Novo, 1990) (Fig. 14B), por lo que esta enzima resulta muy adecuada por encontrarse el óptimo en el límite superior de lo reportado en la literatura. Adicionalmente la dextranasa 6R mostró una excelente estabilidad térmica a 60°C: después de 90 min de exposición se retiene casi el 100% de actividad (Fíg. 15A). A 65°C la mitad de la actividad se pierde después de 45 min de exposición. La estabilidad térmica a 60°C

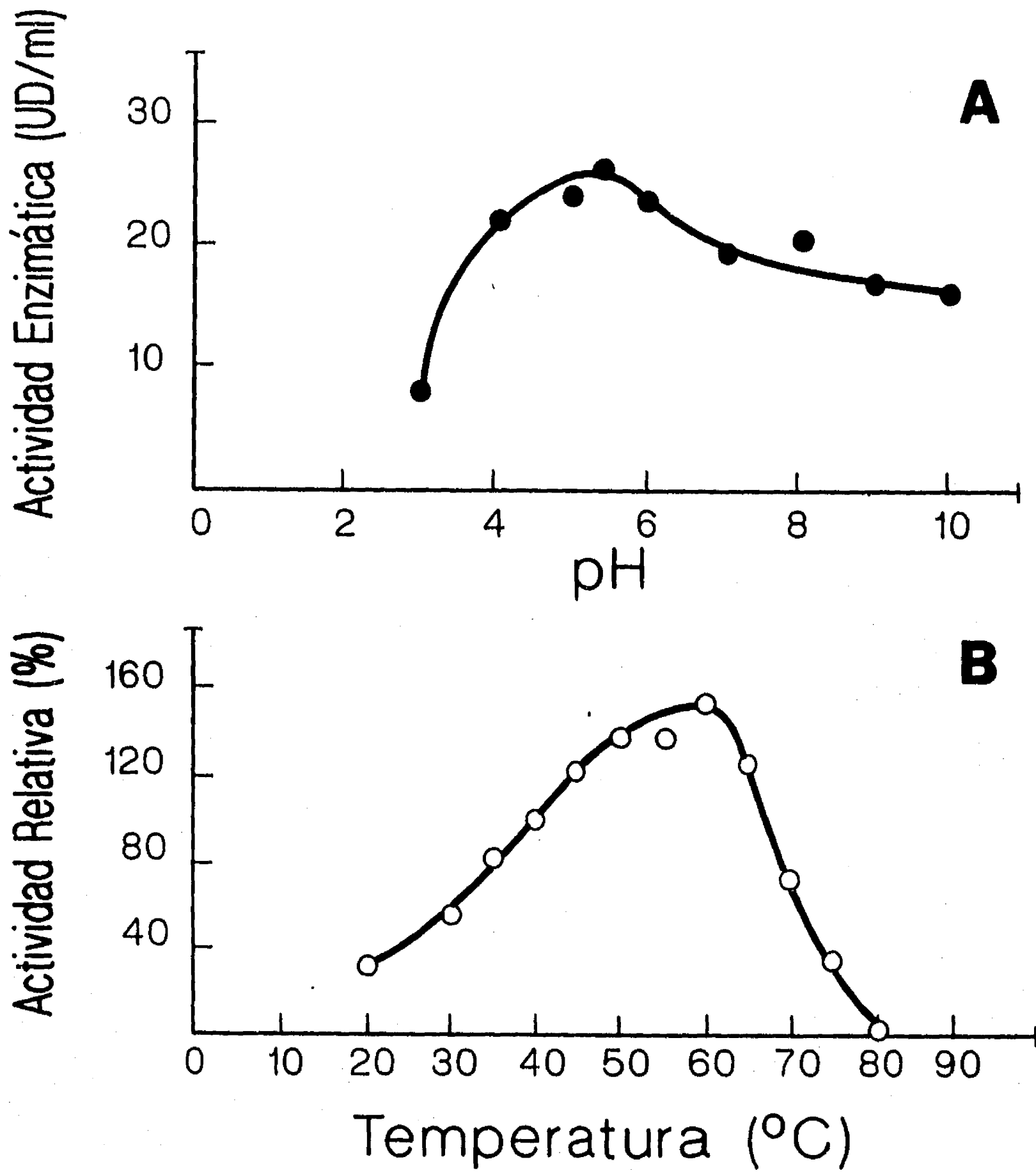


Fig. 14. A: Efecto del pH sobre la actividad de dextranasa 6R (T=40°C).
B: Efecto de la temperatura sobre la actividad de dextranasa 6R (pH=5.4).

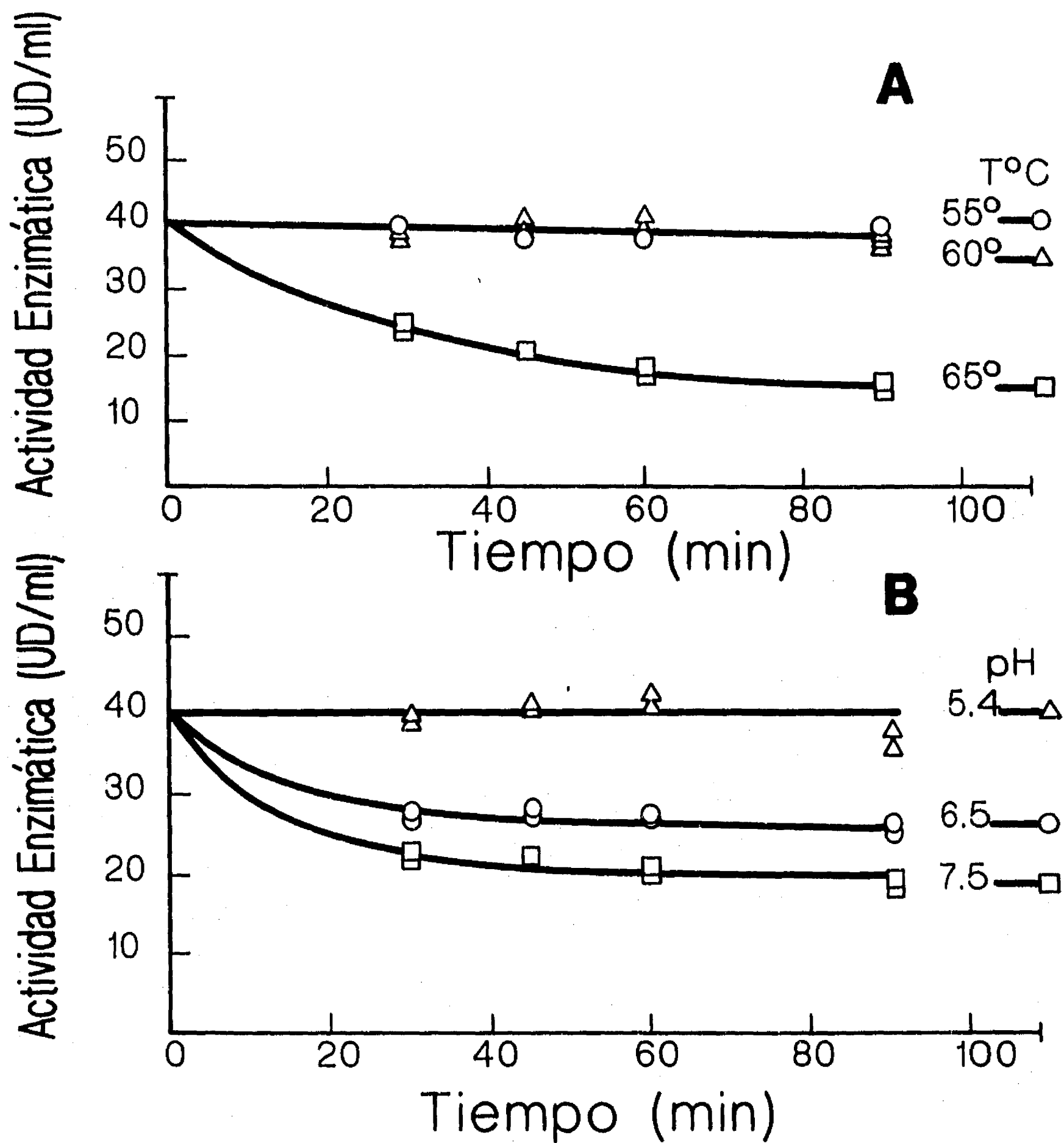


Fig. 15. Estabilidad de la dextranasa 6R
A: A diferentes temperaturas (pH 5.4)
B: A distintos valores de pH (T = 60°C)

fue también ensayada a distintos valores de pH: a partir de los resultados de la figura 15B, puede observarse que el pH óptimo de estabilidad también se encuentran alrededor de 5.4, y después de 60 min a pH 7.5, aún se retiene la mitad de la actividad. El comportamiento observado es el decaimiento enzimático de primer orden para el caso de pH y de temperatura, y concuerda con lo reportado por Lee & Fox, 1985 para la enzima de Paecilomyces lilacinus ATCC 10114. La enzima de 6R muestra, sin embargo una mejor estabilidad que la Paecilomyces lilacinus 8523 reportada por Sun et al. (1988). Considerando su actividad y propiedades de estabilidad, esta enzima puede utilizarse para reacciones por períodos largos a pH de 5.4, en el intervalo de temperaturas entre 50 y 60°C. Estos resultados satisfacen los requerimientos para las dextranasas comerciales adecuadas para su aplicación en la industria azucarera, donde la enzima se añade al jugo antes de la clarificación. Se requiere de un tanque agitado que pueda operarse entre 55 y 60°C a pH 5.5, por períodos de 10 a 20 min. Cuando no se dispone de un tanque de retención, la enzima puede añadirse al jarabe concentrado o bien si la enzima es lo suficientemente estable, al último o al penúltimo evaporador de efecto múltiple. Por esta razón, las propiedades de la dextranasa 6R son particularmente atractivas.

CINETICA ENZIMATICA Y EFECTO DE PESO MOLECULAR DEL SUSTRATO

En la Fig. 16 se muestra el efecto de la concentración de sustrato (dextrana T70) sobre la velocidad inicial de reacción. A partir de la linearización de Lineweaver-Burk se obtuvo un valor

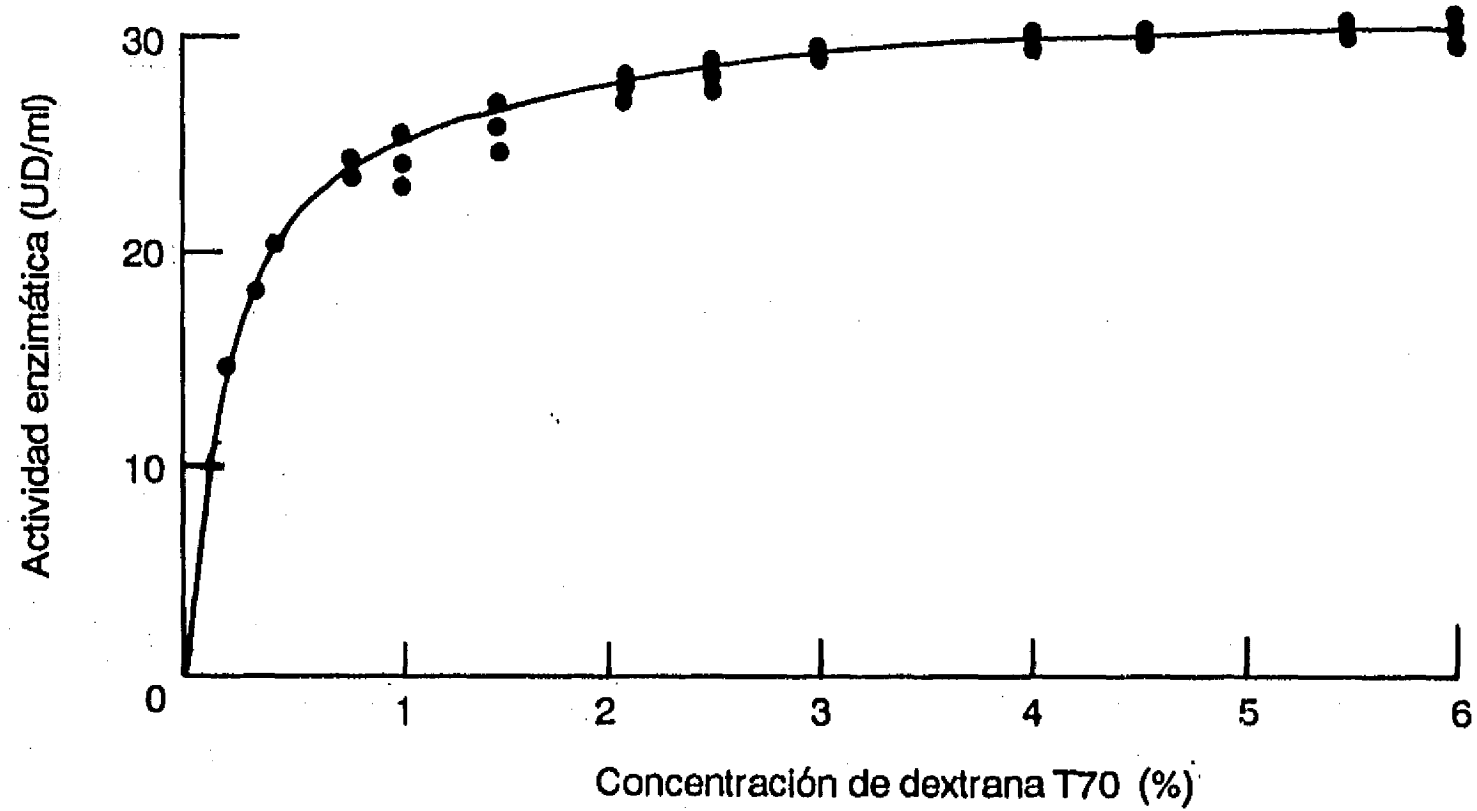


Fig. 16. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la dextranasa 6R ($T=60^{\circ}\text{C}$, pH 5.4, 0.66 UD/ml).

de K_m de 2.51 g/l que se determinó a pH 5.4 y 40°C con 0.66 UD/ml de ensayo. En estos experimentos la concentración de sustrato se aumentó hasta un 60 g/l, demostrando que no hay inhibición por sustrato para esas concentraciones.

Con frecuencia las dextranasas se caracterizan con sustratos de un peso molecular definido. Considerando que Leuconostoc mesenteroides en los ingenios azucareros sintetiza dextranas de una amplia distribución de pesos moleculares (López y Monsan, 1980), se estudió el efecto del peso molecular del sustrato sobre la actividad enzimática, caracterizando el efecto a través de la afinidad de la enzima por el sustrato (constantes de Michaelis-Menten). En la Tabla 10 se muestran estos resultados, mostrando que no hay diferencias significativas en la especificidad enzimática con sustratos de peso molecular creciente en el intervalo de 10,000 a 40 millones de daltons. La K_m promedio es de 2.6 g/l de dextrana. Se obtuvo además una V_{max} promedio de 32.29 UD/ml (8.58 g isomaltosa/l min). Estos experimentos se llevaron a cabo con el sobrenadante de la fermentación sin purificar y sin concentrar. En conclusión, la cinética de la dextranasa se describe apropiadamente mediante el comportamiento clásico de Michaelis-Menten y la enzima no muestra inhibición por sustrato en el intervalo ensayado, ni se ve afectada por la variación en su peso molecular durante el proceso. La inhibición por sustrato afecta a un gran número de enzimas lo que sería una limitante para productos comerciales, ya que en casos de contaminación por dextranas (ingenios, caries,

TABLA 10. EFECTO DEL PESO MOLECULAR DE LA DEXTRANA SOBRE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE MICHAELIS - MENTEN. DE LA DEXTRANASA 6R

P.M. DEXTRANA (daltons)	V _{max} (UD/ml)	K _m (g/l dextrana)
10,000	33.14	2.75
40,000	32.40	2.51
70,000	33.40	2.51
5x10 a 40x10	30.20	2.54

Dosis de enzima: 0.666 UD/ml
Concentración de sustrato: 10 a 30 g/l
Condiciones del ensayo: pH 7.0, 40 °C

etc.) o para procesos de hidrólisis en reactor, la concentración de dextrana es alta. Esta característica cinética es entonces de mayor relevancia para la aplicación de la dextranasa en los ingenios azucareros donde la concentración de dextrana puede ser tan alta como 15 g/l en los peores casos de contaminación (Enmex SA de CV, 1988).

Considerando la aplicación final de la enzima, y basados en la independencia de la K_m del PM del sustrato, se utilizó un modelo cinético para describir la degradación de la dextrana a través del tiempo. La ecuación de Michaelis-Menten integrada se aplicó con los valores de K_m y V_{max} transformados a las concentraciones equivalentes de isomaltosa. Los resultados experimentales para dextrana 70,000 y dextranas de mayor PM se muestran en la figura 17, comparándose con los resultados descritos. Los datos experimentales muestran dos tipos distintos de desviación: en la primera parte de la reacción el modelo predice conversiones más bajas, mientras que en la segunda parte se encuentra la situación opuesta. El primer comportamiento puede explicarse por el efecto activador de la isomaltosa que será discutido posteriormente. Por otro lado las conversiones máximas son menores que los valores teóricos esperados. Esto es debido a la presencia de una fracción no-degradable de polisacáridos en el sustrato, como se muestra en los cromatogramas de la figura 19B que se discuten posteriormente.

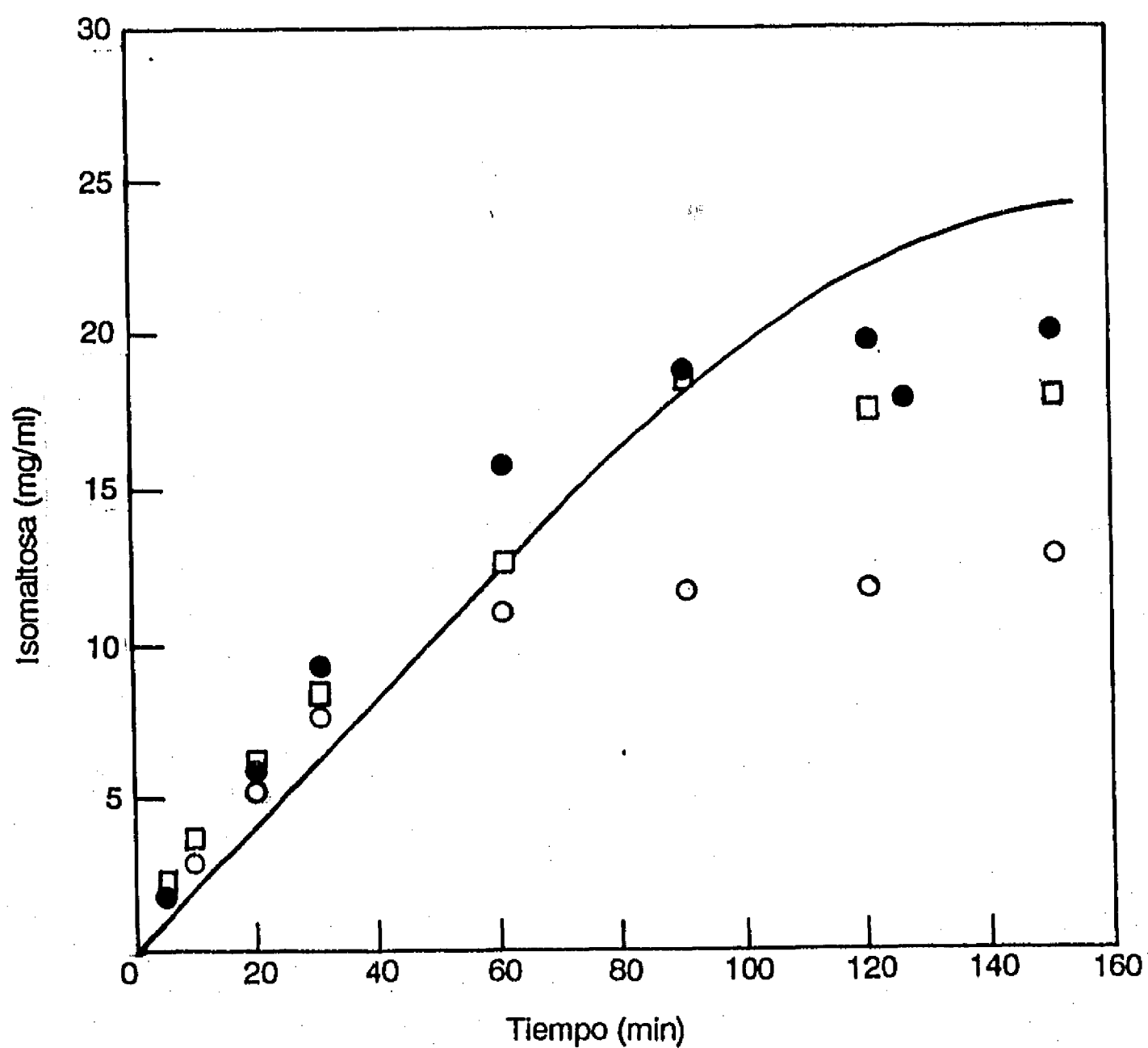


Fig. 17. Evolución de la hidrólisis de varios tipos de dextrana descritos por la ecuación integrada de Michaelis Menten. -●- dextrana T 70, -□- dextrana industrial, -○- dextrana B-512F, --- Modelo de Michaelis Menten integrado.

Mientras se experimentaba sobre el efecto de los productos finales de reacción sobre la actividad enzimática, se observó un efecto activador interesante de la isomaltosa. En la figura 18 se comparan los ensayos realizados a distintas concentraciones de sustrato con y sin isomaltosa. En ellos se muestra un incremento constante en la velocidad de reacción de alrededor del 17% en todas las concentraciones de sustrato estudiadas. El efecto de la isomaltosa sobre otras dextranasas y como una función de la concentración de la enzima se estudia actualmente.

Así mismo, resultó interesante conocer el efecto de la presencia de sacarosa sobre la actividad de la dextranasa puesto que en su aplicación práctica el disacárido se encuentra en concentraciones alrededor de 12%. Las velocidades iniciales de reacción no mostraron diferencias significativas a todas las concentraciones ensayadas.

Los resultados de la hidrólisis de dextrana en jugo de caña mostraron una fuerte disminución en los tiempos de caída en el viscosímetro capilar, mostrándose una tendencia asintótica posterior a una drástica disminución de la viscosidad en las condiciones de hidrólisis (ver figura 19).

EVOLUCION DE LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS.

Los productos enzimáticos de la reacción de degradación de la dextrana grado industrial de alto peso molecular fueron analizados por HPLC. Se examinaron los productos de distintos

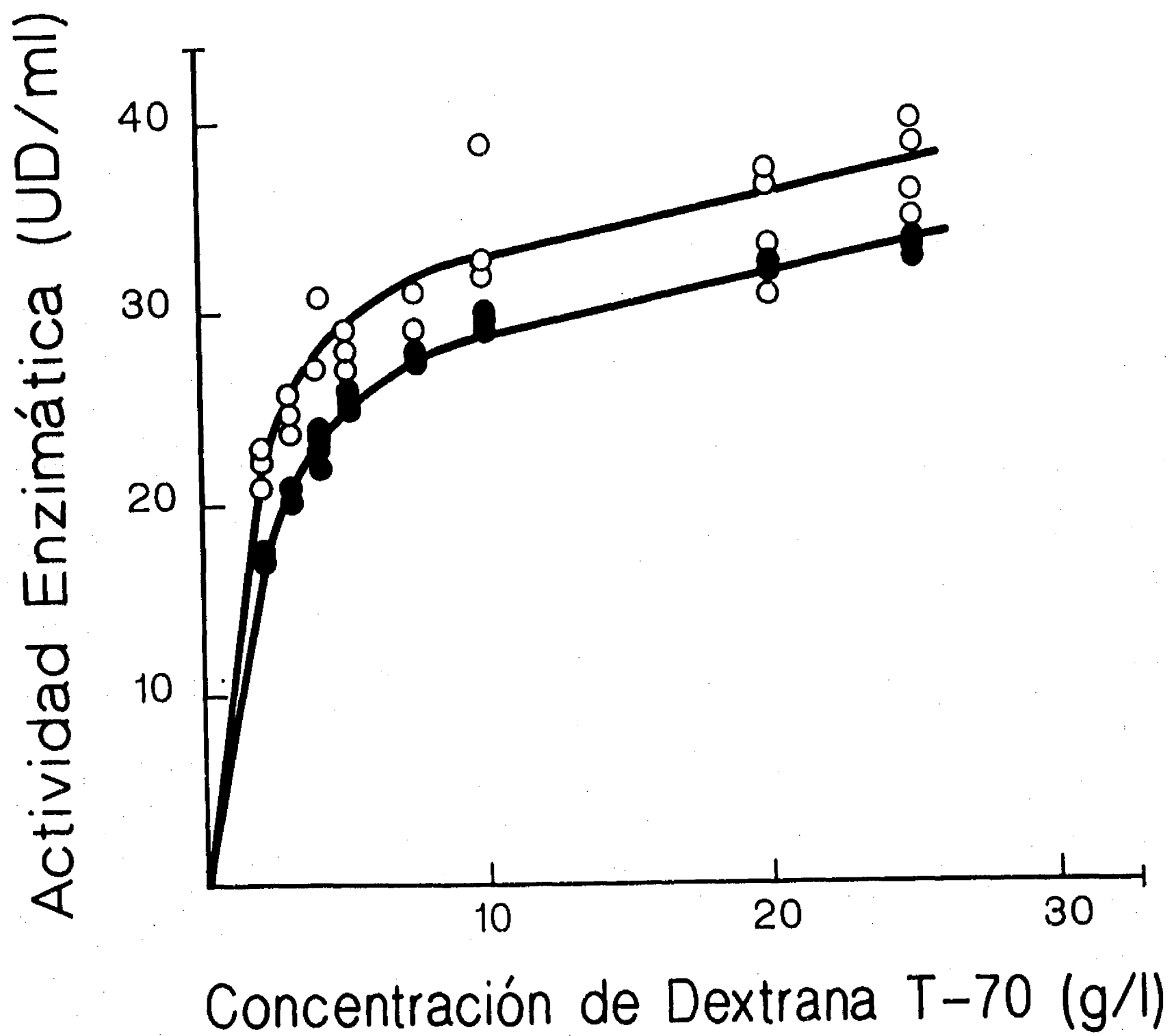


Fig. 18. Efecto de la isomaltosa sobre las velocidades iniciales de la dextranasa 6R.
-●- Control, -○- 4.29 g/l isomaltosa, $[E] = 0.733$ UD/ml,
 $T = 40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5.4$

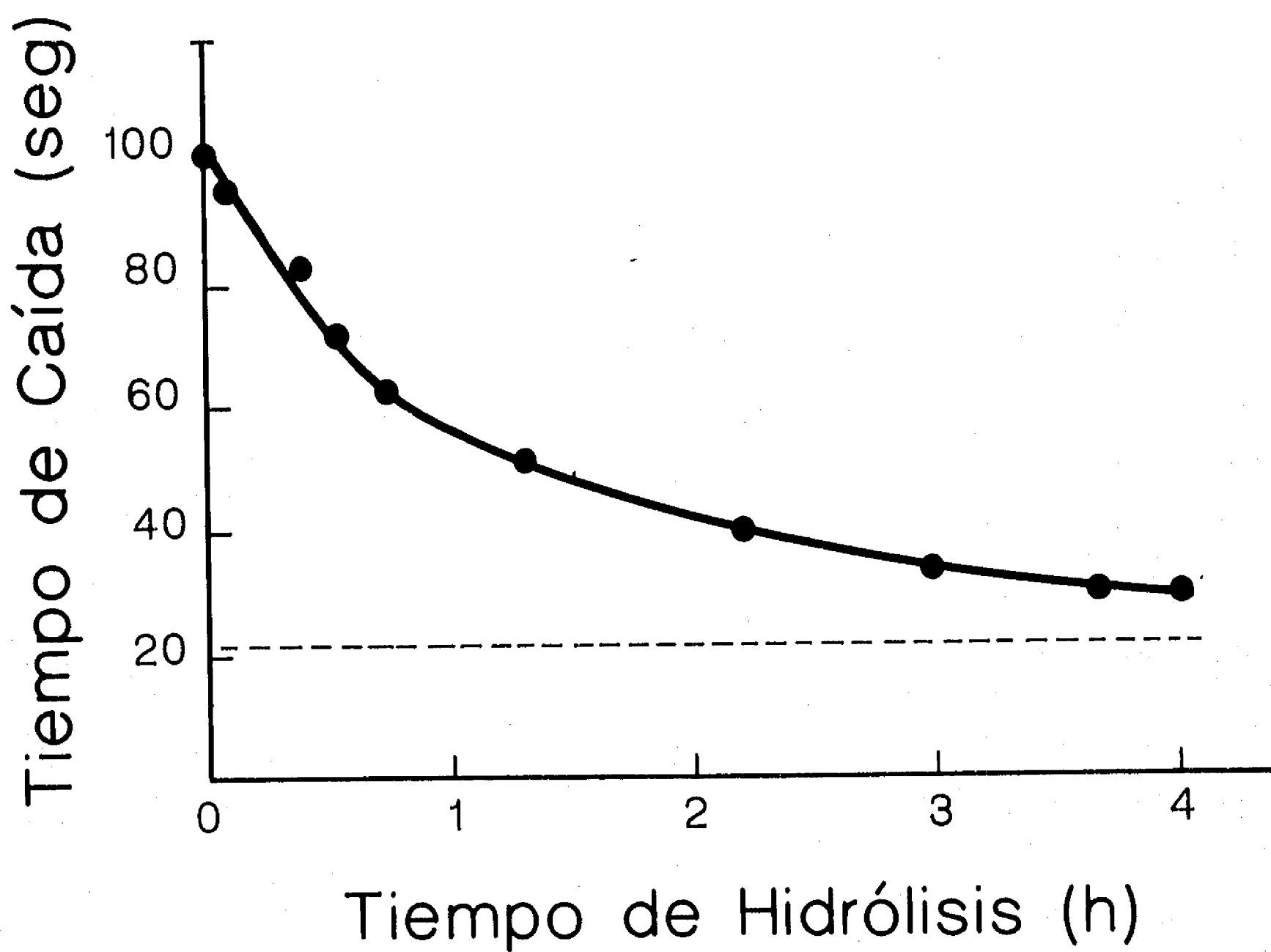


Fig. 19. Disminución del tiempo de caída de jugo de caña adicionado con dextrana industrial (15 g/l) en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske No. 50. $T = 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.0$ (natural del jugo de caña)

grados de conversión y se muestran los diagramas en la figura 20. El diagrama II de baja conversión ($X = 0.06$) muestra dos picos característicos: isomaltosa y la fracción de alto peso molecular del sustrato original. Enseguida del pico de isomaltosa, a 9 ml de volumen de retención, aparece un pico que concide con el estándar de dextrana T70 (entre 8 y 9 ml) mientras que el pico de alto peso molecular disminuye. Cuando la conversión es del 23% la mayor parte del material ahora se agrupa alrededor de los 10 ml mostrando la presencia de isomaltosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. Para $X = 0.37$ el patrón de comportamiento es similar y finalmente, para $X = 0.95$ se muestra el pico de isomaltosa y una fracción no degradable como únicos productos finales de la reacción. Estos patrones de hidrólisis sugieren que la dextranasa de Paecilomyces lilacinus 6R no es una típica enzima endo, considerando que los principales productos de reacción son, siempre, isomaltosa y oligosacáridos de bajo peso molecular.

La dextranasa 6R no fue activa sobre otros polisacáridos como alginato o pectina. Con almidón "soluble" mostro 1/48 de la actividad original. Con dextrana insoluble de L. mesenteroides NRRL B-523 la enzima sólo mostró un 5% de la actividad original con T70, y este mismo comportamiento se observó con una dextranasa comercial (Dextranasa Amano, Enzimas y Productos Químicos SA de CV).

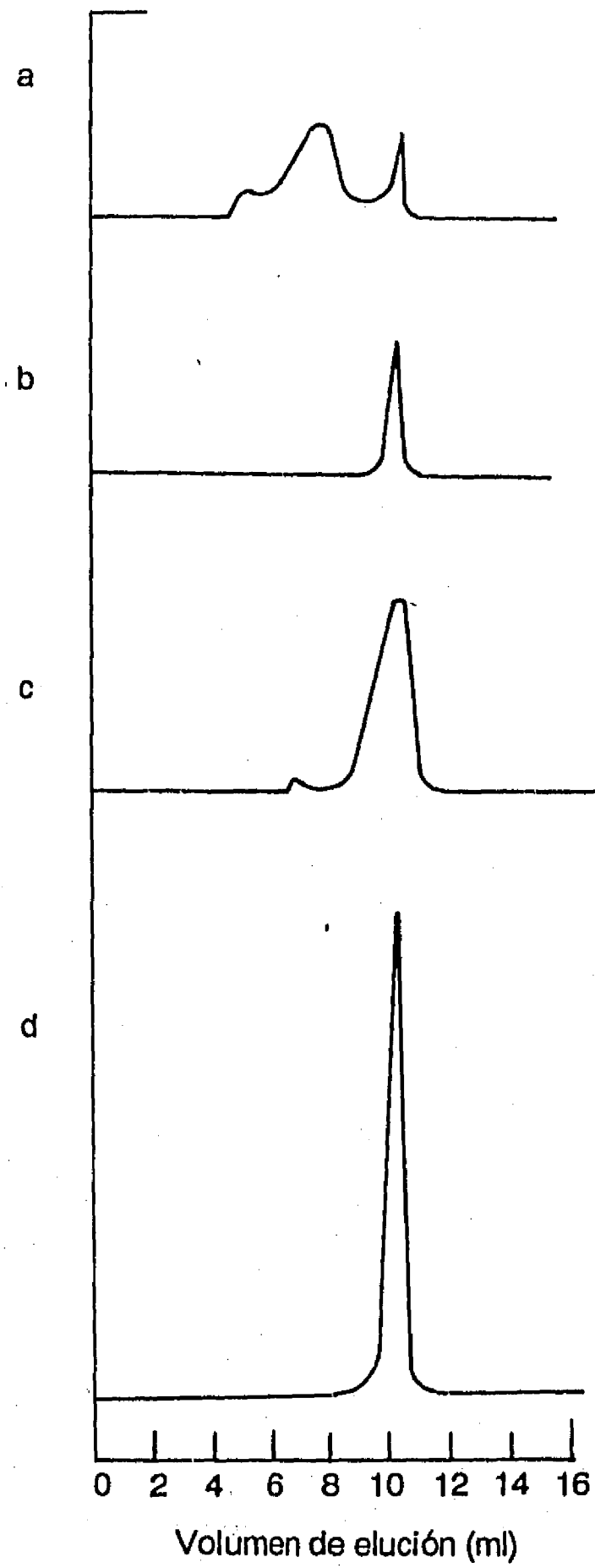


Fig. 20A. Cromatograma de los estándares correspondientes a:
a. dextrana 500,000 daltons
b. Isomaltosa
c. Dextrana T70
d. Dextrana T70 hidrolizada exhaustivamente

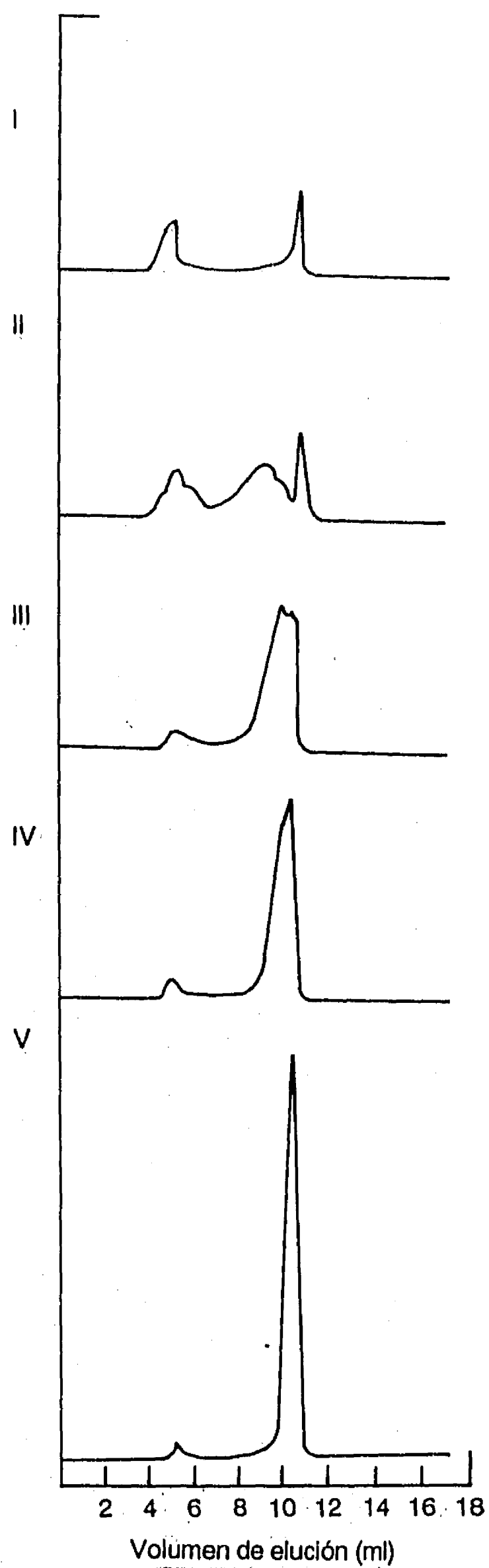


Fig. 20B. Evolución de los productos de hidrólisis de dextrana industrial de PM 5-40 millones de daltons con dextranasa 6R ($T = 60^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.4$).

- I. Dextrana intacta
- II. $X = 0.06$
- III. $X = 0.23$
- IV. $X = 0.37$
- V. $X = 0.95$

CONCLUSIONES

1. Se diseñó un medio de selección de cepas dextranolíticas y se aplicó en el aislamiento de 23 cepas capaces de crecer en dextrana como única fuente de carbono. En una primera etapa se seleccionaron 4 cepas por su alta capacidad de producción extracelular.
2. La cepa aislada e identificada como Paecilomyces lilacinus y denominada 6R fue seleccionada para producir dextranasa en cultivo por lotes. El medio de producción fue optimizado con un diseño factorial, demostrando el importante efecto de las fuentes de nitrógeno y carbono en la producción enzimática. Después de la optimización, la producción de dextranasa fue aumentada obteniéndose actividades entre 36 y 42 UD/ml.
3. La dextranasa de la cepa 6R tiene una excelente estabilidad térmica, considerando los requisitos para su aplicación en ingenios azucareros ya que es estable a 60°C por períodos mayores de 90 min. Esta propiedad le proporciona una ligera ventaja sobre las dextranasas comerciales actuales.

4. La actividad de la enzima no se ve afectada por la sacarosa, ni por el peso molecular del sustrato. Tampoco presenta inhibición por exceso de sustrato, hasta concentraciones de 60 g/l, y tampoco se detectó un efecto inhibitorio de la isomaltosa. Por el contrario, la velocidad inicial de reacción aumentó.

5. La aplicación de la enzima se comparó con la ecuación integrada del modelo de Michaelis-Menten como un control, lo que permitirá definir más la relación $[E]$ - tiempo de acuerdo a las necesidades específicas de la aplicación. Es importante considerar que la dextrana industrial contiene una fracción no-degradable de aproximadamente un 5.3%, porcentaje calculado a partir de las áreas integradas del HPLC.

6. Al estudiar el efecto de varios sustratos se encontró que la enzima no es activa sobre alginato, pectina y almidón, y mostró un 5% de la actividad original con dextrana insoluble.

7. Con este trabajo se contribuye en general al desarrollo de sistemas enzimáticos con capacidad hidrolítica sobre polisacáridos microbianos. En particular se ponen de manifiesto aspectos relevantes de su cinética con respecto al tamaño relativo del sustrato y productos de la reacción. Del mismo modo se describen los efectos de la sacarosa, la isomaltosa y los productos de la reacción sobre la cinética de la dextranasa.

R E F E R E N C I A S

- Bloom, W.L. and Wilhelmi, A.E. 1952. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 81:501
- Barker, S.A., Bourne, E.J., Bruce, G.T., and Stacey, M. 1958. J. Chem. Soc. 4414
- Bevan, D. and Bond, J. 1971. Microorganisms in field and mill - a preliminary survey. Proc. Conf. Queensl. Soc. Sugar Cane Technol., 38th Pp. 137-143 .
- Bolton, W.M., 1961. Pat. 2,970,064
- Bourne, E.J., Hutson, D.H. and Weigel, H. 1962. Studies on dextrans and dextranases. 2. The action of mould dextranases on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis. Biochem. J. 85:158.
- Borisberger, M. 1969. Structure of the dextran of the tibi grain. Carbohydrate Res. 10:379-385 .
- Box, G.E.P., Wilson, K.B. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. J. Royal Statistica; Soc. Ser. B. 13(1):1-45.
- Brown, R.G. 1979. Stimulation of dextranase production by oxydized dextran. Can. J. Microbiol. 16:841-844
- Cheetham, P.S.J. 1987. Screening for novel biocatalysts. Enzyme Microb. Technol. Vol. 9. April. 194-213.
- Duncan, C.L. and Colmer, A.R. 1964. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. Appl. Microbiol. 12: 173-177.
- Durán, E. 1990. Tesis Maestría. UNAM. Fac. de Química. Producción y caracterización de glucosiltransferasas de L. mesenteroides. p .65
- Enmex SA de CV. 1988. Enzimas para la industria azucarera. Boletín Técnico.
- Fisher, E.H. and Stein, E. 1960. Cleavage of O- and S-glycosidic bonds (Survey). En: The Enzymes Vol. 40 (Eds.) Boyer, P., Lardy, H. and Myrback. K. Academic Press. N.Y. Parte A. Pp. 301-312.
- Godfrey, T. and Reichelt, J. 1983 Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry. The Nature Press.
- Gray, I. 1953. Am. J. Physiol. 174:462

- Guilarte, B., Rodriguez, J., Cuervo, R. y Pacheco, N. 1986. Aislamiento y caracterización de microorganismos productores de dextranasa. Rev. Lat-amer. Micobiol. 28: 331-337.
- Hattori, A. and Ishibashi, K. 1981. Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45(10):2347-2349.
- Hehre, E.J. 1946. Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. J. Biol. Chem. 163:221-233.
- Hehre, E.J. and Hamilton, D. 1949. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71:336
- Hehre, E.J. and Sery, T.W. 1952. J. Bacteriol. 63:424
- Hultin, E. and Nordstrom L. (1949). Investigations on dextranase. I. On the occurrence and the assay of dextranase. Acta Chem. Scand. 30:1405-1417.
- Hutson, D.H. and Weigel, H. 1963. Studies on dextrans and dextranases. 4. Mechanism of the actions of intra- and extra-cellular mould hydrolases. Biochem. J. 88, 588-591.
- Koenig, D.W. and Day D.F. 1988. Production of dextranase by Lipomyces starkeyi. Biotechnol. Letters. 10(2):117-122.
- Kornerup, A., and Wanscher, J.H. 1978. Methuen Handbook of Colour. 3rd edition. Eyre-Methuen, London, UK.
- Lee, J.M. and Fox, P.F. 1983. Proc. 6th Int. Cong. Food Sci. & Technol., Dublin, Sept. 18-23. Boole Press, Dublin. Vol. 2, P.1.
- London, E. and Twigg, G.D. 1956. British Patent 748,024
- Lopez-Munguía, C. A. and Monsan, P. 1980. Dextran synthesis by immobilized dextransucrase. Biochimie 62:323-329.
- Louisiana St. Univ. Pat.No. WO 8705324
- Madhu and Prabhu, K.A. 1984. Studies of dextranases from Penicillium aculeatum. Enz. Micorb. Technol. 6(5):217-220.
- Monaghan, P.H. and Gidley, J.L. 1959. Oil Gas J. 57:100-103
- Monaghan, P.H. and Dumbauld, G.K. 1962. U.S. Pat. 3,065,170
- Mueller, E.P. and Agnew, Z. 1963. Geol. 9:213-217

- Nissin-Food. 1988. Pat.No.JP 63185381
- Novak, L.J. 1956. U.S. Pat. 2,748,774
- Novo Nordisk a/s. 1990. Technical Bulletin. 2880 Baegsverd, Denmark.
- Owen, W.L. 1952. U.S. Pat. 2,602,002
- Paigen, K. and Williams, B. 1970. Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrates utilization. Adv. Microbiol. Physiol. 4:251-324
- Peake, P.Q. 1956. U.S. Pat. 2,764,843
- Peterson, G.L. 1997. A simplification of the protein assay method of the Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem, 83:346.
- Pitt, J.I. 1979. The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces. Academic Press. London, U.K.
- Pohland, A.E. and Misljevic, P. 1976. Metabolites of various Penicillium species encountered in foods. In. Rodricks J.V.(ed) In Mycotoxins and other Related Food Problems. Advances in Chemistry Series No. 149. FDA, Am. Chem. Soc. USA.
- Preobrazhenskaya, M.E. and Manikova, A.I. 1975 Dextranase of Penicillium purpurogenum. Dokl. Acad. Nauk. SSSR Ser. Biol. 224:483.
- Reese, E.T., Lola, J.E. and F.W. Parrish. 1969. Modified substrates and modified products as inducers. J. Bacteriol. 100, 1551
- Reese, E.T. 1972. Enzyme production from insoluble substrates. Biotechnology and Bioengineering Symposium. No. 3:43-62.
- Rowlands, R.T. 1984. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. Enz. Microb. Technol. 6:3-10.
- Rozenfeld, E.L. 1958. Biokhimiya 23:635.
- Samson, R.A. 1974 Paecilomyces and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology No. 6. Inst. of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Netherlands.

- Scully, N.J., H.E. Stavely, Skok, J. and Stanley, A.R.
1952. Science. 116:187
- Seymour, F.R. and Knapp, R.D. 1980. Structural analysis of insoluble D-glucans by Fourier transform infrared difference spectrometry: correlation between structures of dextrans from strains of Leuconostoc mesenteroides and α -D-glucans from strains of Streptococcus mutans. Carbohyd. Res. 86:227-246.
- Sugiura, M., Ito, A., Yamaguchi, T. 1974. New exodextranase form Brevibacterium fuscum var. dextranolyticum. Biochem. Biophys. Acta. 350:61-70.
- Shukla, G.L., Madhu, and Prabhu, K.A. 1989. Study of some parameters for the production of dextranase by Penicillium aculeatum Enz. Microb. Technol. 11(8):533-536.
- Smith, D. 1984. Maintenance of fungi. In. Kirsop B.E. and Snell J.J.S. (eds.) Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press Inc. p. 83.
- Smith, J.E. 1985. Mycotoxins hazards in the production of fungal products and by-products. En: Moo-Young, M. (Ed.) Comprehensive Biotechnology. Vol. 4 Pergamon Press. USA. p. 543.
- Sparks, W.J. 1962 U.S. Pat. 3,053,765
- Sugiura, M., Ito, A., Yamaguchi, T. 1974. New exodextranase from Brevibacterium fuscum var. dextranolyticum. Biochem. Biophys. Acta. 350:61-70.
- Sumner, J.B. and Howell S.T. 1934. A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem. 108:51-54
- Sun, J., Cheng, X., Zhang, Y., Yan, Z. and Zhang, S. 1988. A strain from Paecilomyces lilacinus producing high quality dextranase. Purification and characterization. Ann. N.Y. Acad. Sci. 542:192-194.
- Suzuki, H., Yamane, K. and Nisikawa, K. 1969. Extracellular and cellbound cellulase components of bacteria. Adv. Chem. Ser. 95
- Tsuchiya H.M., Jeanes A., Bricker H.M. and Wilham C.A. (1952) Dextran degrading enzymes from molds. J. Bacteriol. 64:513-519.
- Von Arx J.A. 1971. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. J. Cramer, Lehre.
- de Waals, A. 1945. Chem. Ind. 32:253

Wadsworth, D.V. and Hughes M.F. 1946. U.S.Pat. 2,409,816

Ward, O.P. 1989. Fermentation Biotechnology. Principles, processes and products. Open University Press. Milton Keynes. Great Britain.

Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L. 1962. Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. I Academic Press. N.Y.

Yamaguchi, Y., Watanabe, I. and Satoh, Y. 1981. UK Pat. Appl. 2 054 563A

A P E N D I C E I

Medio CYA. (Pitt, 1979)

Compuesto	Peso (g)
K ₂ HPO ₄	1.0
Solución Czapek*	1.0 ml
Extracto de levadura	5.0
Sacarosa	30.0
Agar	15.0

+ 1 l de agua destilada

Medio EMA. (Pitt, 1979)

Compuesto	Peso (g)
Extracto de malta	20.0
Peptona de soya	1.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0

+ 1 l de agua destilada

Medio G25N. (Pitt, 1979)

Compuesto	Peso (g)
K ₂ HPO ₄	0.75
Solución Czapek	7.5 ml
Extracto de levadura	3.75
Glicerol	250.0
Agar L.I.	12.0

+ 750 ml de agua destilada

Medio H&N. Modificado de
Hultin & Nórdstrom, 1949

Compuesto	Peso (g)
Dextrana G.I.	10.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄	0.1
Agar L.I.	18.0

+ 1 l de agua destilada

* Solución Czapek:	NaNO ₃	30.0 g
	KCl	5.0g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.0g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g

En 100ml de solución con H₂O destilada

Procedencia de los reactivos utilizados:

Dextrana G.I. = dextrana grado industrial. Sigma Chemical Co. Inc. St, Louis MO, USA
 Extracto de levadura. Bioxon de México SA. Oaxaca, Oax.
 Extracto de malta. Bioxon de México SA. Oaxaca, Oax.
 Agar = Agar bacteriológico. Bioxon de México SA. Oaxaca, Oax.
 Agar L.I. = Agar Bacteriológico Libre de Inhibidores. Merck de México SA. Edo. de México.
 Los demás reactivos utilizados son de grado analítico (R.A.)

Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain

Amanda Galvez-Mariscal¹ and Agustín Lopez-Munguía²

¹ Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, 04510, D.F. México

² Departamento de Bioingeniería, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271 México

Received 12 April 1991/Accepted 2 July 1991

Summary. Several environments were sampled in a screening procedure to obtain 23 different dextranase-producing fungal strains. The most productive strains were identified as *Penicillium purpurogenum* and *Paecilomyces lilacinus*. The culture medium for *P. lilacinus* strain 6R was optimized, increasing the initial productivity twofold. The enzyme showed optimal activities at pH 5.4 and 65°C, as well as excellent thermal stability at 60°C. An average K_m value of 0.26 g/l was found for dextran over a wide range of substrate molecular mass. The enzyme did not show substrate or product inhibition. From HPLC chromatograms, the 6R dextranase was found to readily reduce dextran to low molecular mass oligosaccharides and isomaltose. An integrated kinetic equation is used to describe batch reactions and application dose.

Introduction

Dextran is a glucose polymer joined mainly by α ,1,6-glucosidic bonds synthesized from sucrose by the enzyme dextranase (E.C. 2.4.1.5.), a glucosyl transferase produced mainly by *Leuconostoc* and *Streptococcus* lactic bacteria. *L. mesenteroides* NRRL B-512F dextran has a linear structure with 95% of α 1,6 linkages and 5% of branching in α 1,3 linkages. However linkages may also be found in the α 1,2- and α 1,4-positions depending on the strain. The presence of dextrans in sugar cane mills is a source of serious problems due to the high viscosity they impose on sugar cane juice, as well as deposits of insoluble polymers on the processing equipment. One of the current solutions applied to deal with this contamination is the use of dextranase, α 1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.11.), which hydrolyses the α 1,6-linkages in dextran, rapidly reducing the molecular mass and therefore the viscosity of the juice.

Offprint requests to: A. Lopez-Munguía

Different microorganisms have been reported for dextranase production. In general, fungi are the most widely distributed microorganisms with dextranolytic activity, the genus *Penicillium* being the most frequently found in screening procedures. Commercially available dextranases are mainly produced from *Chaetomium gracile* (Hattori et al. 1981) whereas *Paecilomyces* genus enzymes have recently been shown to bear interesting properties for application in sugar mills (Lee and Fox 1985; Sun et al. 1988). Bacterial strains are also reported as dextranase producers: *Arthrobacter globiformis* (Sawai et al. 1976) and some *Flavobacterium*, *Pseudomonas* and *Bacteroides* species. In the effort to produce endodextranases from sources other than moulds, the yeast *Lipomyces starkeyi* is an interesting alternative, although its reported activity is quite low (Koenig and Day 1988). Dextranase is an inducible enzyme and there are no reports on the existence of a constitutive mutant.

The application of dextranases in sugar cane mills to modify contaminated juices is expensive. For instance, the consumption of dextranase by the Mexican sugar cane industry was 4 tons in 1989, applied only in 40% of the mills. The usual enzyme dosage varies between 10 and 120 ppm depending on the time available for treatment and the degree of contamination, which increases to 15000 ppm in the worst cases. This represents between U.S. \$ 0.11-1.32 per ton of sugar cane juice, which is equivalent to U.S. \$ 1.00-13.00 per ton of refined sugar.

The use of dextranases has also been extended to other fields, such as dental care as a toothpaste additive, since it has been shown that dextran is involved in dental plaque formation. Dextranases have also been applied in structural studies of glucose polymers and purification processes (Pelenc et al. 1991).

In this work we present the optimization results of a dextranase production process using an isolated strain of *Paecilomyces lilacinus* obtained by screening of various environments. Several interesting properties of the enzyme are also presented including its characterization and the effect of substrate and products, as well as evidence concerning the hydrolysis patterns.

Materials and methods

Isolation and strain selection. The screening process was carried out on samples of cane juice from a Mexican sugar cane mill, samples of contaminated dextran solutions, soil and air. Microorganisms showing extracellular dextranase activity were selected on a solid medium containing blue dextran as a carbon source: industrial grade dextran (Sigma, St. Louis, Mo., USA), 5 g/l; blue dextran (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 5 g/l; agar, 15 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l; KH_2PO_4 , 0.5 g/l; MgSO_4 , 0.1 g/l. The enzyme-producing strains were selected according to their ability to form a transparent halo, which is an indication of extracellular enzyme production. Dextranase productivity was evaluated in submerged liquid cultures with a semi-defined medium containing dextran as the sole carbon source, modified from that of Kosaric et al. (1973). Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 50 ml medium, were inoculated with 1 ml spore suspension in 0.1% Tween 80 sterile saline containing 10^7 spores/ml. Taxonomic identification of *Penicillium* was achieved using a key for genus level (Von Arx 1971) and one at species level (Pitt 1979). *Paecilomyces* identification at genus level was performed according to Samson (1974). *P. lilacinus* strain 6R was maintained by two methods: (a) preservation of spores in dry sterile soil kept at 4°C and (b) preservation of spores in 20% glycerol at -20°C.

Dextranase activity measurement. Enzyme activity was determined following the release of reducing sugars with the DNS (dinitrosalicylic acid) reagent. A 2.5% T70 dextran solution (Pharmacia) in 0.1 M acetate buffer, pH 5.4, was used as substrate. One dextranase unit (UD) is defined as the amount of enzyme that liberates 1 μmol glucose equivalent/min at 40°C.

Culture medium optimization and fermentation kinetics. Optimization of the culture medium was performed using the Box-Wilson technique (Box and Wilson 1951) with a 2^n factorial design. Fermentation kinetics were described in terms of enzyme and biomass production by measuring the amount of dry mycelial weight. Protein was measured by the modified Lowry technique (Peterson 1977) and total carbohydrates by the phenol-sulphuric acid method (Whistler and Wolfrom 1962). Dextran and dextran hydrolysates prepared with dextranase (30 and 50 isomaltose equivalent: IE) were used as inducers.

Enzyme properties. Dextranase was characterized for its optimal pH and temperature of activity, thermal stability, as well as its basic kinetic parameters. Activity towards substrates of different molecular mass was assessed using different dextrans: T10, T40 and T70 (10, 40 and 70 kDa average molecular mass, respectively) from Pharmacia, as well as industrial grade dextran (5000-40000 kDa) from Sigma. The effect of product inhibition (isomaltose) was also evaluated. Dextranase activity was evaluated in the presence of 12% sucrose in order to observe any effect on the initial rates. Complete enzymatic dextran hydrolysis was described according to Michaelis-Menten kinetics, with product, K_m and V_{max} values expressed in the corresponding isomaltose concentrations. The Enzyme dose was 1 UD/ml, acting on 25 g/l substrate solutions at pH 7.0 and 50°C. Hydrolysis product characterization was carried out by HPLC in an Isco Model 2350 chromatograph (Medford, Mass., USA), equipped with an Altex (Palo Alto, CA) refractive index detector with a PW-5000 Altex column using water as the eluent.

Results and discussion

Enzyme production

Strain isolation. We isolated a total of 23 strains able to grow on dextran with extracellular dextranase activities

ranging from 0.4 to 20 UD/ml in preliminary submerged fermentations. Two of them, due to their relatively high activity, were characterized and their taxa identified. The most productive strain was identified as *Penicillium purpurogenum*, showing maximum activity after 90 h of culture. The other strain, identified as *Paecilomyces lilacinus* strain 6R, showed different behaviour since the enzyme was produced at a later stage in the culture.

Penicillium purpurogenum has been previously reported as a dextranase producer (Kosaric et al. 1973; Preobrazhenskaya and Manikova 1975). However, it is also known as a rubratoxin producer (Pitt 1979; Smith 1985). There are some antibiotics produced by strains of *Paecilomyces* (Samson 1974) but until now there have been no reports on toxins production by this species. Nevertheless a GRAS status has not been assigned to *P. lilacinus*, nor to *Chaetomium*. The latter is now in use for industrial dextranase production. *P. lilacinus* strain 6R was therefore selected for this research. Preliminary fermentations of *P. lilacinus* 6R resulted in 19 UD/ml, dextranase production being clearly non-associated with growth. The maximum dextranase activity was obtained 4 days after the maximum biomass was reached.

Culture medium optimization. The culture medium composition was optimized by an experimental design following the Box-Wilson technique, with variation units of 5, 2, 0.1 and 0.05 g/l for dextran, yeast extract, CaCl_2 and MgCl_2 , respectively. In Table 1 the composition of 16 media is shown including the enzyme activity results for each experiment. The correlation equation that includes the resulting variation coefficients required for optimization is:

$$Y = 24.17 - 0.45X_1 + 0.04X_2 + 3.572X_3 - 2.802X_4$$

where Y is enzyme activity (UD/ml), X_1 is dextran (g/l), X_2 is yeast extract (g/l), X_3 is CaCl_2 (g/l) and X_4 is MgCl_2 (g/l).

Each regression coefficient multiplied by its corresponding variation unit suggests that only dextran and yeast extract are significant for the final optimization experiments, due to the low response variation for the calcium and magnesium salts. The optimized medium composition after a second set of experiments was: dextran, 16 g/l; yeast extract, 9.12 g/l; CaCl_2 , 0.40 g/l; MgCl_2 , 0.25 g/l, resulting in dextranase production increased to 36.05 UD/ml supernatant. The fermentation kinetics of *P. lilacinus* 6R in the optimized medium is shown in Fig. 1. The microorganism showed the same behaviour, reaching maximum activity in this particular case around 42 UD/ml. The specific growth rate was found to be 0.25 h^{-1} . No differences in enzyme productivity were found when the initial fermentation pH was fixed in the range 5.4-7.0.

Use of dextran and/or hydrolysed dextran as inducer. A dextran hydrolysate was used either as the only carbon source, or mixed with dextran to obtain 50 and 30 IE and comparing the results with 100% dextran as a car-

Table 1. Dextranase activity results on sixteen media different of composition

Medium no.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(UD/ml)	Medium no.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(UD/ml)
I	-	-	-	-	27.82	IX	-	-	-	+	19.50
II	+	-	-	-	16.88	X	+	-	-	+	11.68
III	-	+	-	-	27.72	XI	-	+	-	+	30.63
IV	+	+	-	-	31.94	XII	+	+	-	+	26.93
V	-	-	+	-	27.59	XIII	-	-	+	+	29.72
VI	+	-	+	-	14.76	XIV	+	-	+	+	16.86
VII	-	+	+	-	30.03	XV	-	+	+	+	22.79
VIII	+	+	+	-	20.25	XVI	+	+	+	+	31.67

X₁ = dextran; X₂ = yeast extract; X₃ = CaCl₂; X₄ = MgCl₂; UD = dextranase units; +, upper level; -, lower level

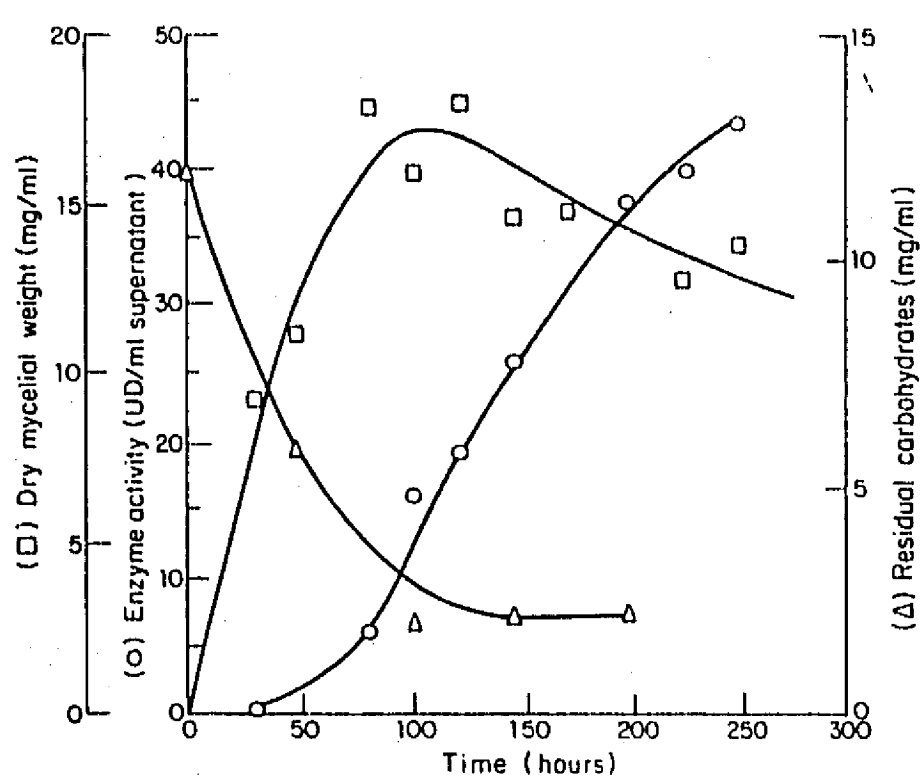


Fig. 1. Growth kinetics and dextranase production by *Paecilomyces lilacinus* 6R on optimized culture medium (industrial dextran, 16 g/l; yeast extract, 9.10 g/l; CaCl₂, 0.4 g/l; MgCl₂·6H₂O, 0.25 g/l) at 28°C and pH 5.8. UD, dextranase units

bon source fermentation control. Dextran was the best inducer for dextranase production, giving 41 UD/ml versus 27, 23 and 16 UD/ml when the mixtures were 30 IE, 50 IE, and 100 (only isomaltose) IE, respectively. Isomaltose was also an inducer but with a lower capacity, giving less than 50% induction when compared to dextran. This result confirms the requirement, although not absolute, of dextran for dextranase production.

Enzyme characterization

pH and temperature effects. *P. lilacinus* 6R dextranase showed optimum activity at pH 5.4. This value is similar to the optimum found for other *Paecilomyces* strains. The optimal temperature for activity was 60°C in a 9-min assay. Commercial dextranases show optimal temperatures between 50 and 60°C (Godfrey and Reichelt 1983). The 6R dextranase showed excellent thermal stability at 60°C: after 90 min at this temperature almost 100% activity was retained. At 65°C, half of the activity was lost after 45 min exposure. Thermal sta-

bility at 60°C was assayed at different pH values: the optimum pH for enzyme stability was 5.4. The behaviour is similar to that reported for *P. lilacinus* ATCC 10144 (Lee and Fox 1985). The enzyme shows, however, better stability than the *P. lilacinus* 8523 reported by Sun et al. (1988). These results agree with the behaviour required for commercial dextranases adequate for applications in the sugar industry, where the enzyme is added to the juice before clarification, requiring an agitated tank operating between 55 and 60°C at pH 5.5, for periods of 10–20 min. When no retention tank is available the enzyme can be added to the concentrated syrup or, as the enzyme is stable enough, to the last or the next to last multiple effect evaporator.

Enzyme kinetics and substrate molecular mass effect. The effect of substrate concentration (T70 dextran) on the initial reaction rate was studied. From the Lineweaver-Burk type plot a K_m value of 2.51 g/l was determined at pH 5.4 and 40°C. In these experiments the substrate concentration was increased to 60% without reduction in the reaction rate. This kinetic characteristic is of major relevance for enzyme application in sugar mills where the amount of substrate (dextran) can be as high as 15 g/l in the worst cases of contamination.

Very often, dextranases are characterized with substrates of a given molecular mass. Considering that *L. mesenteroides* dextranase synthesizes dextran with a wide molecular mass distribution (López-Munguía and Monsan 1980) we studied the effect of substrate molecular mass on dextranase activity, determining the Michaelis-Menten constant. There were no differences in enzyme specificity of different substrate molecular mass in the range 10–40 000 kDa, as the K_m values were not significantly different (average value 2.69 g/l dextran).

Considering the final application of the enzyme, and based on the independence of K_m from the molecular mass, we used a kinetic model to describe dextran degradation with time. The batch reactor equation with Michaelis-Menten kinetics was used with substrate K_m and V_{max} values transformed to the equivalent isomaltose concentrations. The experimental results for 70 kDa dextran and higher molecular mass dextrans are shown in Fig. 2, compared with the predicted values.

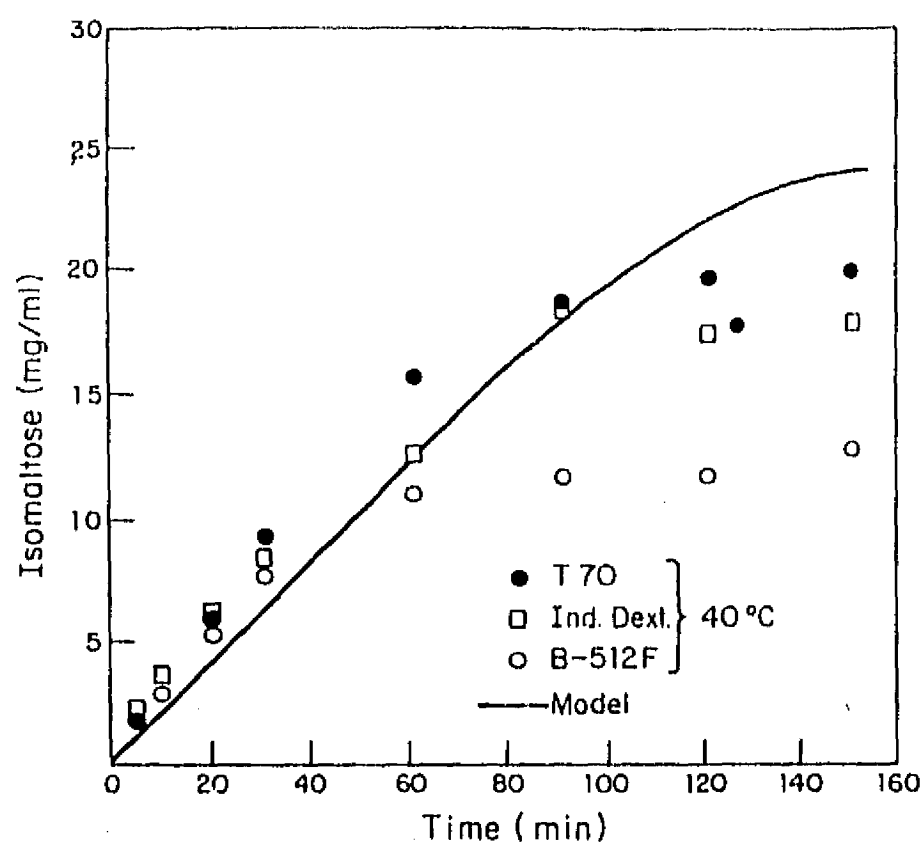


Fig. 2. Evolution of the hydrolysis of various types of dextran (see text) as described by the integrated Michaelis-Menten equation. Reaction conditions: 1 UD/ml, initial dextran concentration = 25 g/l, pH 7.0, 50°C

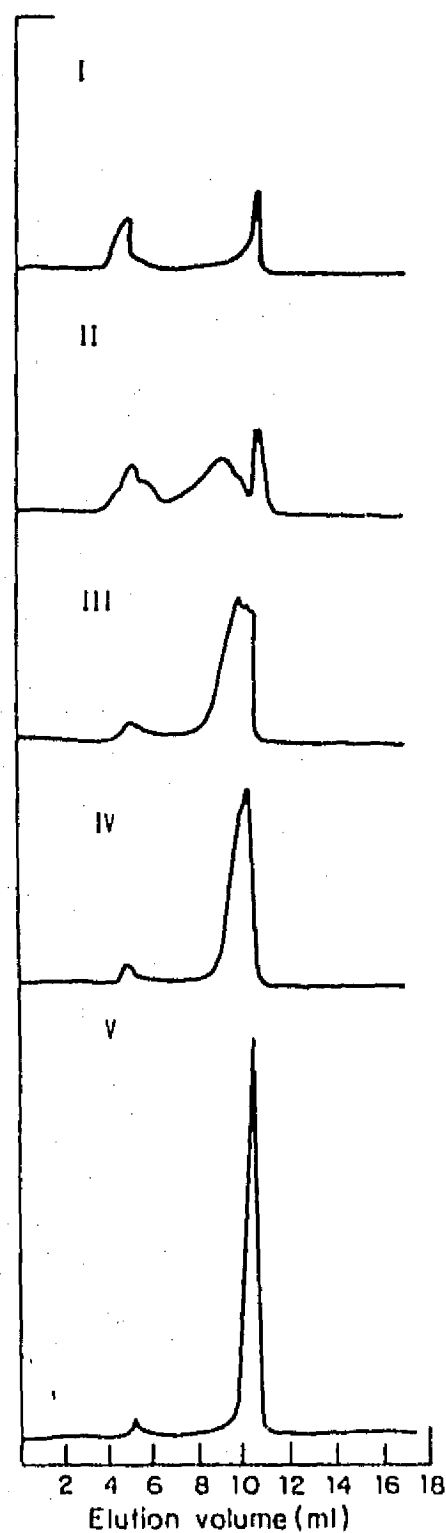


Fig. 3. Chromatograms showing evolution of dextran hydrolysis products by 6R dextranase: I, intact dextran; II, $X=0.06$; III, $X=0.23$; IV, $X=0.37$; V, $X=0.95$, all at 60°C and pH 5.4

The experimental data showed some deviation, due in part to the presence of a non-degradable fraction of polysaccharides in the substrate, as shown by the chromatograms in Fig. 3. Nevertheless this model may be used as a more accurate design for dextranase applications.

Finally, while looking at the effect of end-products on enzyme activity an interesting activating effect of isomaltose was found. In a comparison of initial rates at different substrate concentrations with and without isomaltose, a constant increase of around 17% was found in the presence of 43 g/l of isomaltose at all substrate concentrations. Also, the activity of 6R dextranase was not affected by sucrose, as no difference in activity was found in the presence of 12% sucrose, the amount usually found in sugar cane juice.

Evolution of hydrolysis products. The enzymatic reaction products were followed by HPLC analysis at different conversions: the chromatograms are shown in Fig. 3. The low degree conversion diagram II ($X=0.06$) shows the two characteristic peaks of isomaltose and a decreased high molecular mass fraction of the original substrate: next to the isomaltose peak, a 9-ml retention volume peak appears, similar to the T70 standard peak. At $X=0.23$ most of the material is now clustered at approximately 10 ml, showing isomaltose and low molecular mass oligosaccharides. Finally isomaltose and a non-degradable fraction are shown as end-products. These reaction patterns suggest that *P. lilacinus* dextranase is not a typical endo-enzyme, considering that the main products of the reaction are, at any time during the reaction, isomaltose and low molecular mass oligosaccharides. Dextranase did not show activity towards alginate, pectin or soluble starch. Against *L. mesenteroides* NRRL B-523 insoluble dextran the enzyme showed only 5% of the activity towards T70 dextran, and this same behaviour was observed with a commercial dextranase.

In conclusion, dextranase from isolated *P. lilacinus* 6R has excellent thermal stability for application in sugar cane mills, its kinetics are not affected by sucrose, nor by dextran molecular mass. There is no substrate inhibition and its application may be described by the Michaelis-Menten integrated equation.

Acknowledgements. This research was partially financed by the International Foundation for Science (I.F.S.) grants nos. E/1289-1 and 2. The authors wish to express their gratitude to Sergio Trejo and Beatriz Bustos for their collaboration in the isolation and characterization of strains, and to Augustin Reyo for HPLC analysis.

References

- Box GEP, Wilson KB (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. *J R Stat Soc Ser B* 13:1-45
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Godfrey T, Reichelt J (1983) *Industrial enzymology. The application of enzymes in industry.* Nature Press, N. York, NY

- Hattori A, Ishibashi K, Sadamasa M (1981) The purification of the dextranase of *Chaetomium gracile*. *Agric Biol Chem* 45:2409-2416
- Koenig DW, Day DF (1988) Production of dextranase by a *Lipomyces starkeyi*. *Biotechnol Lett* 10:117-122
- Kosaric N, Yu K, Zajic JE (1973) Dextranase production from *Penicillium funiculosum*. *Biotechnol Bioeng* 15:729-741
- Lee JM, Fox PF (1985) Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. *Enzyme Microb Technol* 7:573-577
- Lopez-Munguia CA, Monsan P (1980) Dextran synthesis by immobilized dextranase. *Biochimie* 62:323-329
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346
- Pelenc V, López-Munguía CA, Remaud M, Biton J, Michel JM, Paul F, Monsan P (1991) Enzymatic synthesis of oligoalters. *Sci Aliments* 11:465-476
- Pitt JI (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states. *Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, London
- Preobrazhenskaya ME, Manikova AI (1975) Dextranase of *Penicillium purpurogenum*. *Dokl Acad Nauk SSSR Ser Biol* 224:483
- Samson RA (1984) *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. *Studies in mycology*, no. 6. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, The Netherlands
- Sawai T, Ikagi I, Nawa A (1976) Identification of an isomaltodextranase producing bacterium *Arthrobacter globiformis*. *Agric Biol Chem* 40:1249
- Smith JE (1985) Mycotoxins hazards in the production of fungal products and by-products. In: *Comprehensive Biotechnology*. Moo-Young M (ed) Vol. 4 Pergamon Press, Elmsford, NY, p 543
- Sun J, Cheng X, Zhang Y, Yan Z, Zhang S (1988) A strain of *Paecilomyces lilacinus* producing high quality dextranase. Purification and characterization. *Ann NY Acad Sci* 542:192-194
- Von Arx JA (1971) The genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer, Lehre