

La dextranasa a lo largo de la industria azucarera

Efraín Rodríguez Jiménez

División Química-Física, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (537) 271 47 64; E-mail: efrain.rodriguez@cigb.edu.cu

RESUMEN

En la producción de azúcar, las dextranas son compuestos indeseables, sintetizados por microorganismos contaminantes a partir de la sacarosa, que provocan pérdidas significativas al incrementar la viscosidad en los flujos y reducir el recobrado industrial. El empleo de la enzima dextranasa es el método más eficiente para la hidrólisis de las dextranas en el central azucarero. Se han identificado cepas de bacterias, hongos filamentosos y un pequeño número de levaduras que producen dextranasa. Las dextranasas fúngicas manifestaron la mayor velocidad de reacción y encontraron las condiciones más favorables de reacción a bajo Brix, con valores de pH y temperatura próximos a 5.0 y 50 °C, respectivamente, es decir, condiciones existentes en el procesamiento de los jugos de los centrales. Algunas de estas dextranasas formuladas en preparados enzimáticos se han empleado para hidrolizar de manera eficiente las dextranas en los jugos. En estados más avanzados del proceso, en los que ya las dextranas han provocado pérdidas, las condiciones de temperatura y de Brix son elevadas. Sin embargo, aunque los volúmenes con que se ha de trabajar son inferiores, el tratamiento con estas enzimas en la meladura hizo necesario el incremento de la dosis, hasta llegar a igualar el consumo de dextranasa. Algunas dextranasas termotolerantes de bacterias, identificadas hasta el momento, manifestaron la actividad específica muy reducida, lo cual hace impracticable su uso industrial. Las dextranasas fúngicas de *Chaetomium sp.* han mostrado los mejores resultados en el tratamiento de las dextranas, tanto en los jugos como en la meladura. La búsqueda de nuevas dextranasas, ya sean naturales o recombinantes, debe dirigirse a la obtención de una dextranasa comparable con la enzima de *Chaetomium sp.*

Palabras claves: dextranasa, enzimas industriales, aplicación industrial, dextrana

Biotecnología Aplicada 2005;22:11-19

ABSTRACT

The dextranase along sugar-making industry. In sugar production, dextrans are undesirable compounds synthesized by contaminant microorganisms from sucrose, increasing the viscosity of the flow and reducing industrial recovery, bringing about significant losses. The use of the dextranase enzyme is the most efficient method for hydrolyzing the dextrans at sugar mills. Some bacterial strains, filamentous fungi and a small number of yeasts have been shown to produce dextranase. The fungal dextranases showed the highest reaction rate at low Brix, with pH and temperature close to 5.0 and 50 °C, respectively, that is, conditions existing in juice extraction. Some of these dextranases formulated in enzymatic preparations have been efficiently used for hydrolyzing dextrans in sugar mill juices. In more advanced points of the process, where the dextrans have already caused losses, the conditions of temperature and Brix are high. However, although the volumes are smaller, the treatment with these enzymes in syrup showed the need to increase the dose, equaling dextranase consumption. Some thermo tolerant bacterial dextranases identified up to now showed a much reduced specific activity that makes their industrial use unfeasible. The fungal dextranases from *Chaetomium sp.* have shown the best results on dextrans treatment both in juices and syrups. Any attempt to obtain a new natural or recombinant dextranase enzyme, must be comparable with the *Chaetomium* enzyme.

Keywords: dextranase, industrial enzymes, industrial application, dextran

Introducción

Las dextranas son polisacáridos de elevado peso molecular, formados por glucosas unidas por enlaces α -1.6 al menos en el 50%, con ramificaciones enlazadas α -1.3 aunque también puede presentar otras unidas α -1.2 o α -1.4 [1]. Las ramificaciones son significativas en las dextranas de bajo peso molecular, en las que llegan a alcanzar hasta el 8% [2]. La solubilidad de las dextranas disminuye a medida que en ellas aumenta la proporción de otros enlaces α en relación con los α -1.6 [3].

Las dextranas no son compuestos propios de la caña, el contenido de estos polisacáridos en la caña es muy bajo o casi cero. Su formación ocurre por la acción de la enzima dextranasacarasa de microorganismos contaminantes que se alojan en la savia de la planta [1] o la atacan posteriormente al ser dañada

su corteza. La infestación de la caña por el insecto *Diatraea saccharalis*, conocido como "borer" y el ataque de roedores favorecen la contaminación microbiana de la gramínea en el campo [4]. El *Leuconostoc mesenteroides* es la bacteria láctica que fundamentalmente agrede a la caña. El nivel de exposición del tejido interno de la caña se incrementa con el corte mecanizado, el trozado o por la quema, lo cual provoca la inactivación de las enzimas fenol oxidadas de acción protectora o bactericida en la planta [1]. Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextranasacarasa hidroliza la sacarosa y forma dextranas. Junto con el jugo, estas dextranas se extraen en los molinos y contaminan los flujos del central, y su nivel en el jugo llega a exceder las 10 000 ppm (1%) en los casos extremos [5].

1. Cuddihy JA, Porro ME, Rauh JS. The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/polysach.pdf>.

2. Morel du Boil PG, Wienese S. Enzymatic reduction of dextran in process- Laboratory evaluation of dextranases. Proc S Afr Sug Technol Ass 2000;76:435-43.

3. Imrie FKE, Tilbury RH. Polysaccharides in sugar cane and its products. Sugar Technology Reviews 1972;1:291-361.

4. Rampaud M. Manejo de los roedores en la caña de azúcar. Sugar y azúcar 1993:46-7.

Algunas estadísticas realizadas durante 5 años en Louisiana, aportaron que en el 60% del tiempo de zafra, el contenido de las dextranas no excedió los 250 ppm en el jugo de la caña cortada sin trozar, mientras que la caña trozada exhibió mayor velocidad de formación de dextranas, debido a la mayor área de tallos expuestos y, por lo tanto, mayor grado de infección bacteriana [6]. Por otro lado se reportó que en la caña trozada, después de dos horas de acopiada, se observó la infección masiva con *Leuconostoc* y otras bacterias, hasta a seis pulgadas de distancia de los extremos [7, 8]. En la caña quemada se observó el rápido aumento del nivel de dextranas en casi diez veces desde las 12 a las 48 horas, hasta alcanzar las 3 200 ppm [7]. También se reportó que el contenido de las dextranas en la caña quemada aún sin cortar, se incrementó de manera rápida de 280 ppm presentes al tercer día a 2 900 ppm, al cabo de la semana [1].

Efecto perjudicial de las dextranas en la producción de azúcar

Una vez que las dextranas están en el proceso de producción de azúcar, la viscosidad de la solución se incrementa en dependencia de la concentración y del peso molecular de los polímeros formados, el cual puede oscilar entre 10^5 y 10^7 o más [3]. Las dextranas de peso molecular muy elevado son insolubles. Las de menor peso y solubles aportan mayor dificultad al proceso de producción de azúcar [6, 9].

El control de las dextranas en la agroindustria azucarera se ejecuta mediante el riguroso ajuste entre la quema, si esta se realiza, el corte, mecanizado o manual, y la entrega de la caña fresca al central. También se emplean las técnicas de saneamiento con vapor del equipamiento productivo cada 8 horas durante el funcionamiento del central, y el uso de biocidas sobre la caña en el tándem [1]. Cualquier eventualidad que retarde el arribo de la caña cortada al central, por encima de 14 horas en un ambiente cálido y húmedo, actúa de forma favorable en la formación de las dextranas [3], las cuales alcanzarán los molinos y entrarán con el jugo al flujo industrial. El contenido de las dextranas se incrementa progresivamente a lo largo del proceso, del jugo diluido a la miel final [1].

El efecto perjudicial de las dextranas comienza desde el momento en que estas se forman, ya que para ello se consume sacarosa de manera irreversible. Un estudio para evaluar tales pérdidas aportó que la presencia de 0.05% de dextranas en el azúcar crudo para su formación consumió 0.2 kg/t de azúcar o 0.02 kg/t de caña procesada [1].

Algunos estudios recientes muestran que una cepa de *L. mesenteroides*, aislada en un central de Argentina, durante las primeras 6 horas de crecimiento a 30 °C consumió la sacarosa a razón de 8.46 g/L/h [1]. El consumo de la sacarosa se redujo con el incremento de la temperatura.

Las pérdidas económicas ocasionadas por las dextranas son continuas a lo largo del proceso de producción de azúcar, ya que desde temprano su presencia en los jugos incrementa, de manera falsa, el valor de la cantidad de azúcar calculada para estos y altera los indicadores productivos de la fábrica. Ello se debe a la característica dextrorrotatoria de las

dextranas que polarizan alrededor de tres veces más que la sacarosa y generan un elevado y falso valor de Pol [1]. Un estudio acerca de la adición de dextranas patrones a soluciones de sacarosa pura aportó que por cada 180 ppm del polisacárido, el incremento promedio de la polarización fue de 0.05 °S [10].

La elevada viscosidad de los jugos y la presencia en ellos de dextranas de elevado peso molecular junto a otros sólidos insolubles, obstruyen las mallas filtrantes y provocan pérdidas de los jugos por derrames de los molinos a los drenajes, que generalmente son subestimadas.

La viscosidad de la solución durante la clarificación del azúcar reduce la velocidad de la precipitación de las impurezas, forma incrustaciones, disminuye la eficiencia calorífica del flujo y empobrece, de manera general, ese proceso. El jugo que proviene de las cañas deterioradas con valores de pH más ácidos, consume mayor cantidad de cal para su neutralización, lo cual le aporta mayor turbiedad y genera mayor volumen de cachaza con características pegajosas que tupen los filtros prensa [3].

Durante la evaporación, la presencia de las dextranas provoca el aumento de incrustaciones en las superficies de calentamiento y con ello un mayor gasto energético. El tiempo de cocción de las masas también se incrementa y el agotamiento de estas se reduce.

Debido al incremento del tiempo de cristalización del azúcar, la masa cocida en los cristalizadores se enfría más de lo apropiado y aumenta aún más la anormal viscosidad del fluido, se incrementan los tiempos de lavado en las centrífugas para alcanzar la calidad requerida del azúcar, así como los tiempos totales de la centrifugación y de la purga [9]. El azúcar crudo, derivado de tales masas cocidas, es pegajoso, difícil de manipular, secar y envasar [1]. Algunos estudios confirmaron que la calidad de la masa cocida afectó significativamente el rendimiento de los cristales de azúcar, pues se redujo al 86% en el caso de 755 ppm de dextranas en las masas cocidas con 84.3% de pureza [9].

La reducción de la velocidad de cristalización del azúcar se manifiesta específicamente en la disminución de la velocidad de crecimiento del cristal en los ejes *a* y *b*. Es decir, los cristales de azúcar se deforman en el eje *c*, y adquieren una forma alargada con las dextranas ocluidas en ellos [3]. Este cristal, llamado “de aguja”, reduce la eficiencia de la purga de las masas cocidas durante la centrifugación, lo cual provoca la pobre separación del cristal de las mieles y decae la calidad de refinación del azúcar [1].

Varios estudios mostraron que en presencia de concentraciones bajas de dextranas, cerca del 10% de estas se incluyeron en los cristales de azúcar, mientras que cuando la concentración en meladura sobrepasó las 5 000 ppm, la inclusión llegó hasta el 30% [6, 9].

El azúcar crudo, con contenido de dextranas superior a las 250 ppm [5], está sujeto al pago de la penalidad de magnitud igual a 0.007% del precio, multiplicado por la cantidad de las toneladas vendidas. El valor de la multa se incrementa gradualmente en 0.002% con el aumento de la concentración de dextranas cada 160 ppm, hasta llegar al 0.013% para el contenido, igual o superior a las 1 010 ppm [6].

5. Cuddihy JA, Rauh JS, Porro ME. Improving sugar recovery with sugar process chemicals. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] 1998. Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/sugrcvry.pdf>.

6. Cuddihy JA, Day DF. The process and financial impact of dextran on sugar factory. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] 1999. Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexfinan.pdf>.

7. Cuddihy JA, Mendez F, Bernhard C. Dextranase in sugar production: factory experience. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] 1999. Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf>.

8. Midland Research Laboratories, Inc. Recovery of additional sucrose with an integrated program using biocide and dextranase to reduce undetermined losses. [Publicación periódica en línea] 1998. Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/biodxtrn.pdf>.

9. Rauh JS, Cuddihy JA, Falgout RN. Analyzing Dextran in the Sugar Industry: A Review of Dextran in the Factory and a New Analytical Technique. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] 1999. Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexreview.pdf>.

10. De la Rosa RD. Las dextranas: su efecto sobre la polarización de la sacarosa y la economía azucarera. II. International Sugar Journal 1998;100(1192):198-203.

Ciertos estudios en centrales de Louisiana aportaron que el contenido de azúcar en la miel final se elevó en 0.6 puntos por cada 1 000 ppm de dextranas en mieles, equivalentes a 250 ppm en jugo mezclado, lo que generó la pérdida de 0.6 libras (0.272 kg) de azúcar por tonelada de caña [9].

A esa cantidad de azúcar perdida se debió adicionar la cantidad consumida para la formación de las 250 ppm de dextranas, que, según los datos anteriormente mencionados, correspondió a 0.022 libras (0.01 kg) por tonelada de caña. Es decir, en presencia de 250 ppm de dextranas en jugo mezclado, se perdieron 0.282 kg de azúcar por tonelada de caña procesada, lo cual, extrapolado linealmente a la presencia de 1 000 ppm de dextranas en el jugo mezclado, generó la pérdida de 1.128 kg de azúcar por tonelada de caña.

Como resultado de otro estudio con datos conservativos de diferentes partes del mundo, se demostró que cada 0.1% de incremento de dextranas en los jugos (1 000 ppm), se perdieron 8.8 libras (4 kg) de azúcar por tonelada de azúcar producida sin tomar en cuenta el recobrado industrial [5]. Esto significó la pérdida de 0.77 libras (0.35 kg) de azúcar adicional por tonelada de caña molida asumiendo el recobrado de 88%.

Un análisis para la determinación de las pérdidas de azúcar por las dextranas resultó, de manera general, entre 7.4 y 8 kg por tonelada de caña molida [5].

Otros estudios en etapas más avanzadas del proceso determinaron que por cada 300 ppm de dextrana en sirope, la pureza en las mieles se incrementó en 1% [11]. Además, se concluyó que cada 1 punto de incremento de la pureza en la miel final, la pérdida era de 0.454 kg de azúcar por tonelada de caña procesada [8].

Como puede apreciarse, es muy difícil determinar los datos exactos de las pérdidas de azúcar causadas por las dextranas, ya que son muchos los factores que influyen en ello, desde los valores falseados del contenido inicial de sacarosa y la variabilidad entre los métodos para la determinación de dextranas, hasta la variación de los criterios tomados en cuenta al analizar estas pérdidas [9].

De manera general, los resultados de estos estudios arrojan que las pérdidas generadas por las dextranas oscilan desde 0.35 kg de azúcar por tonelada de caña molida por la presencia de cada 1 000 ppm de dextranas en el jugo mezclado, hasta 8 kg. Cualquiera que sea el resultado, es evidente la necesidad de eliminar las dextranas del proceso de producción de azúcar.

Los métodos físicos como la ultrafiltración, la diálisis y la ósmosis reversa son muy útiles para ello, pero tecnológicamente no están aún desarrollados para su aplicación económica en el proceso azucarero [2]. Algunos ya han sido introducidos en la industria azucarera de los Estados Unidos, pero con un costo capital significativo y aún no se ha demostrado el retorno de la inversión [5].

Hasta hoy, el único método aplicable en la industria azucarera es la hidrólisis enzimática de las dextranas. La dextranasa EC 3.2.1.11 (α -D-1.6-glucano-6-glucanohidrolasa) es la enzima encargada de realizar esta hidrólisis, ya que es específica para los enlaces α -1.6, mayormente presentes en el polisacárido de las dextranas, los cuales rompe al formar moléculas de oligosacáridos de menor tamaño.

Un estudio en los Midland Research Laboratories, Inc., de Kansas, Estados Unidos, planteó que si bien la decisión del empleo de la dextranasa tiene primeramente un carácter económico, con el uso de la enzima se puede esperar, al menos, la mejoría mínima del costo de producción del azúcar alrededor de 3.00 dólares por tonelada de caña [6].

Cronología del aislamiento de microorganismos productores de dextranasa

Los hongos y las bacterias se identificaron, desde el inicio, como las principales fuentes enzimáticas capaces de hidrolizar las dextranas. A comienzo de los años 50, un grupo de investigadores japoneses identificaron cepas de los hongos *Penicillium lilacinum* y *Penicillium funiculosum*, productoras de dextranasa en presencia de dextranas y, posteriormente, en los años 60, se caracterizaron otras cepas de los hongos *Chaetomium gracile* y *Gibbellea funiculosum* [12]. La dextranasa del *P. lilacinum* mostró su máxima actividad con el pH entre 5.0 y 5.5 y la temperatura entre 53 y 60 °C [13].

Tras la amplia búsqueda que continuó en Japón durante los años 70, se identificó una cepa del hongo *Aspergillus carneus* que acumuló la enzima al crecer en dextranas, y otra del *Penicillium luteum* [12]. Ambas se caracterizaron detalladamente, la enzima pura del *P. luteum* presentó su máxima actividad con el pH entre 4.0 y 6.0 y la temperatura óptima igual a 50 °C. También se purificó y caracterizó la dextranasa de *P. funiculosum*, que mostró la mayor actividad con el pH igual a 6.0 y se inactivó rápidamente al ser sometido a una temperatura superior a 40 °C [14].

Hasta ese entonces eran pocas las bacterias identificadas como productoras de dextranasa, entre ellas, cepas de *Lactobacillus bifidus*, dos especies de *Bacillus* y bacterias intestinales identificadas desde los años 50. La dextranasa del *Brevibacterium fuscum* de la variedad *dextranlyticum*, descubierta en 1974 por investigadores japoneses, posee características diferentes a las ya estudiadas. Su actividad máxima sucede con el pH entre 7.0 y 7.5 y es estable con el pH entre 5.0 y 11.0 [15]. Por esa fecha, en algunos aislamientos de placas dentales se identificaron cepas bacterianas de *Fusobacterium fusiforme*, *Actinomyces israeli*, *Bacteroides ochraceus* y *Streptococcus mutans* productoras de dextranas [16]. La dextranasa de *Streptococcus mutans* presentó el pH óptimo igual a 5.5 y la temperatura de 37 °C.

Los siguientes reportes, surgidos de nuevos productores de dextranasa en presencia de dextrana como inductora, correspondieron a cepas de los hongos *Fusarium miniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum* y *Penicillium roquefortii*, en 1975 por investigadores estadounidenses [17]. La dextranasa del *Fusarium miniliforme* presentó como valores óptimos: el pH igual a 5.5 y la temperatura de 55 °C, y resultó totalmente inactivada a los 15 minutos de exposición a 80 °C y con el pH igual a 6.0 [18].

En 1978 se dió a conocer la identificación de una cepa de *Flavobacterium sp. M-73*, productora de dextranas, que posteriormente se caracterizó [19]. La enzima resultó ser estable con el pH entre 6.5

11. Clarke MA, Edye L, Cole F, Kitchar J. Sugarcane factory trials with dextranase enzyme. Sugar Journal 1997;20-2.

12. Fukumoto J, Tsuji H. Studies on dextranases. I. *Penicillium luteum* dextranase: Its production and some enzymatic properties. J Biochem 1971;69:1113-21.

13. Novo Nordisk A/S. Dextranase Novo 25L. A dextran decomposing enzyme for the sugar industry. Product data information 112-GB, Novo Enzyme Division, Dagsvaerd, Denmark; 1977.

14. Sugiura M, Ito A, Ogiso T, Kato K, Asano H. Studies on dextranase. Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. Biochimica et Biophysica Acta 1973;309:357-62.

15. Sugiura M, Ito A, Yamaguchi T. Studies on dextranase. II. New exo-dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*. Biochimica et Biophysica Acta 1974;350:61-70.

16. Ellis DW, Miller CH. Extracellular dextran hydrolase from *Streptococcus mutans* strain 6715. J Dent Res 1977; 56(1):57-69.

17. Simonson LG, Liberta AE. New sources of fungal dextranase. Mycologia 1975; 67:845-51.

18. Simonson LG, Liberta AE, Richardson A. Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium miniliforme*. Applied Microbiology 1975;30(5):855-61.

19. Kobayashi M, Takagi S, Shiota M, Mitsuishi Y, Matsuda K. An isomaltotriose-producing dextranase from *Flavobacterium sp. M-73*: Purification and properties. Agric Biol Chem 1983;47(11): 2585-93.

y 12.0, y su máximo de actividad, con el pH igual a 7.0 y la temperatura de 35 °C.

En 1981, investigadores japoneses de la compañía Sankyo publicaron la caracterización de las dextranasas producidas por una cepa del hongo *Chaetomium gracile*, aislada desde los años 60 [20]. Las dos enzimas identificadas resultaron ser estables con el pH entre 5.5 y 11.0, con el óptimo de actividad con el pH igual a 5.5, la temperatura de 65 °C, y muy estables a temperaturas inferiores a esta.

Desde esos momentos iniciales, entre las dextranasas identificadas y caracterizadas, producidas por bacterias y hongos, la del *C. gracile* toleró la temperatura más elevada y tuvo funcionalidad en un rango bastante amplio del pH.

El primer reporte de una dextranasa producida por levadura, específicamente por una cepa de *Lipomyces starkeyi* en presencia de dextrana, se realizó en 1983 y, seguidamente, investigadores de la Universidad de Louisiana, obtuvieron un mutante de esta, que produjo la dextranasa en presencia de glucosa, como sustrato más barato [21]. La enzima producida fue estable con el pH entre 2.5 y 7.0 y alcanzó la máxima actividad con el pH igual a 5.0 y a 55 °C.

En 1984 apareció publicada por investigadores de la India, la identificación de la dextranasa secretada por una cepa del hongo *Penicillium aculeatum* [22]. Por vez primera en la nota introductoria del trabajo apareció el significado de la aplicación de la dextranasa en la industria azucarera. La enzima resultó muy estable en su estado crudo, con el máximo de actividad con el pH entre 4.5 y 5.6, y la temperatura igual a 50 °C.

En 1984, investigadores soviéticos publicaron los estudios con nuevas dextranasas de cepas de los hongos *Penicillium piscarium*, *Aspergillus insuetus* y *Aspergillus ustus* [23].

En lo adelante, continuaron las publicaciones de estudios del aislamiento y la caracterización de dextranasas de diversos hongos y bacterias, así como su evaluación en la hidrólisis de los polisacáridos existentes tanto en el entorno bucal como en el proceso azucarero.

En 1986, investigadores estadounidenses reportaron el aislamiento de una cepa de *Streptococcus sobrinus* del entorno bucal, productora de dextranasa, con el objetivo, entre otros, de que una vez lograda la enzima pura, se pudiera obtener un inmunógeno contra los *Streptococcus* orales causantes de las caries dentales.

En 1987, investigadores nigerianos publicaron la producción de dextranasa por una cepa del hongo toxigénico *Aspergillus clavatus*, encontrada en el pienso de aves de corral [24].

Varios estudios desarrollados en Cuba en 1988 posibilitaron aislar cepas productoras de dextranasa a partir de los hongos *Penicillium funiculosum* y *Penicillium purpurogenum* [25, 26]. La caracterización posterior de la cepa de *P. funiculosum* aportó su reidentificación como *Penicillium minioluteum* [27]. La enzima producida por este hongo en presencia de dextrana presentó la máxima actividad con el pH entre 4.5 y 5.0 y la temperatura igual a 35 °C [28].

En 1988, investigadores japoneses reportaron la producción de dextranasa por una cepa de *Arthrobacter globiformis*, la cual presentó ligera termotolerancia al mantener el 20% de su actividad enzimática a 70 °C

[29]. Este fue el primer reporte sobre una dextranasa bacteriana que toleró una temperatura superior a 40 °C.

Las técnicas de la recombinación genética disponibles ya en la década de los 80 se aplicaron en este campo. El primer reporte de una dextranasa recombinante apareció en 1991, por investigadores del Colegio de Medicina de la Universidad de Florida, acerca de la expresión del gen de *Streptococcus salivaris* en *Escherichia coli* [30].

Seguidamente, en 1993, investigadores japoneses dieron a conocer la expresión de la dextranasa de la cepa CB-8 de *Arthrobacter sp.* en la bacteria *Streptococcus gordinii* del entorno bucal, con el objetivo de emplearla para realizar terapia preventiva de caries [31].

El desarrollo alcanzado por la biología molecular en Cuba, posibilitó que en 1993 un grupo de investigadores del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, obtuvieran una cepa de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, que expresó el gen del hongo *Penicillium minioluteum* y secretó, al medio de cultivo, un elevado nivel de la dextranasa recombinante de forma activa [32]. Esta constituyó la primera levadura productora de dextranasa recombinante que se obtuviera. La enzima lograda incrementó el valor de la temperatura óptima a 57 °C en relación con la dextranasa natural del propio hongo; pero, de forma similar en ambas dextranasas, a temperatura superior a la óptima, la actividad enzimática cayó drásticamente. El rango del pH en el cual alcanzó la máxima actividad se conservó entre 4.0 y 5.0.

En 1994, investigadores japoneses publicaron estudios acerca de la expresión intracelular en *E. coli* de la dextranasa de *Arthrobacter globiformis* [33], e investigadores estadounidenses, acerca de la expresión, en el mismo hospedero, de la dextranasa de *Streptococcus sobrinus* [34]. La enzima recombinante de *S. sobrinus* presentó la actividad específica igual a 4 000 U/mg de proteína y la actividad máxima la alcanzó con el pH igual a 5.3 y temperatura de 39 °C.

A pesar de la aparición de dextranasas recombinantes, la identificación de cepas productoras de dextranasa continuó. En 1994, investigadores polacos dieron a conocer el aislamiento de una cepa del hongo *Penicillium notatum* como una nueva fuente de la enzima [35]. La dextranasa producida por este resultó ser relativamente estable en estado crudo y alcanzó la actividad máxima con el pH igual a 5.0 y a 50 °C.

Los trabajos de expresión de genes bacterianos codificantes para la dextranasa continuaron en Japón durante 1995, y se publicó la expresión intracelular en *E. coli* de la enzima de *Streptococcus mutans* [36].

En Australia, entre 1995 y 1997 por primera vez se reportaron los ingeniosos trabajos de selección de fuentes de la enzima dextranasa tolerante de mayor temperatura [37]. Se aislaron cuatro cepas productoras de dextranasas, con temperatura óptima superior a 60 °C y el pH óptimo entre 5.0 y 5.5, pero a diferencia de las dextranasas conocidas hasta el momento, presentaron muy baja actividad específica, inferior a 0.7 U/mg de proteínas, es decir, inferior en tres órdenes a la del *Chaetomium gracile*. La caracterización de una de las cepas aisladas la incluye en el género de *Thermoanaerobacter*, con la relación filogenética más próxima, del 98.8% de homología del ARNr, con el *Thermoanaerobacter wiegelsii* [38]. La dextranasa de esta cepa alcanzó la

20. Hattori A, Ishibashi K, Minato S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. *Agric Biol Chem* 1981;45(11):2409-16.

21. Koenig DW, Day DF. Induction of *Lipomyces starkeyi* dextranase. *Appl Environ Microbiol* 1989;55(8):2079-81.

22. Madhu GLS, Prabhu KA. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. *Enzyme Microb Technol* 1984;6:217-20.

23. Zinchenko ON, Lobanok AG, Shishlo VI. Hydrolysis of streptococcal polysaccharides by microcycete dextranases. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 1984;20:369-72.

24. Ogundero VW, Adebajo LO. Polysaccharide degrading enzymes of a toxigenic strain of *Aspergillus clavatus* from Nigerian poultry feeds. *Nahrung* 1987;31:993-1000.

25. Guilarte B, Cuervo R, Rodríguez J, Pacheco N. Aislamiento y caracterización de microorganismos productores de dextranasa. *Cuba Azúcar* 1988;13-9.

26. Guilarte B, Cuervo R, Rodríguez J, Puente L. Biosíntesis de dextranasa por el *Penicillium funiculosum*. *Cuba Azúcar* 1985;9-12.

27. Guilarte B, Cuervo R, inventors; ICIDCA, assignee. Método para la producción de dextranasa. *CU 22546 A1*. 1999.

28. Raíces M, Moleiro MC, Li IM, Roca H, Delgado J, Cremata J, Herrera L. Purificación y caracterización parcial de una enzima dextranasa de una cepa de hongo del género *Penicillium*. *Biotecnología Aplicada* 1991;8(2):248-55.

29. Okada G, Takayanagi T, Miyahara S, Sawai T. An isomalto-Dextranase accompanied by isopullulanase activity from *Arthrobacter globiformis* T6. *Agric Biol Chem* 1988;52:829-36.

30. Lawman P, Bleiweis AS. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* 1991;173:7423-8.

31. Kubo S, Kubota H, Ohnishi Y, Morita T, Matsuya T, Matsushiro A. Expression and secretion of an *Arthrobacter* dextranase in the oral bacterium *Streptococcus gordinii*. *Infect Immun* 1993;61:4375-81.

32. Roca H, García B, Margóllez E, Curbelo D, Delgado J, Herrera L, et al. (inventors CIGB, assignee). Dextranase enzyme, method for its production and DNA encoding the enzyme. *European patent 0 663 443 B1*. 1998.

33. Iwai A, Ito H, Mizuno T, Mori H, Matsui H, Honma M, et al. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. *J Bacteriol* 1994;176:7730-4.

34. Wanda SY, Curtiss R. Purification and characterization of *Streptococcus sobrinus* dextranase produced in recombinant *Escherichia coli* and sequence analysis of the dextranase gene. *J Bacteriol* 1994;176:3839-50.

35. Szczodrak J, Pleszczyńska M, Fiedurek J. *Penicillium notatum* 1 a new source of dextranase. *J of Ind Microb* 1994;13:315-20.

actividad máxima con el pH igual a 5.5 y a 70 °C. Otro de los ejemplares aislados se incluyó en el mismo género de los *Thermoanaerobacter* y produjo la dextranasa que exhibió actividad máxima con el pH entre 4.5 y 5.5 y la temperatura igual a 80 °C, mientras que en estado crudo fue a 85 °C [39]. Las dextranasas producidas por este género son hasta hoy las que han manifestado mayor termotolerancia entre todas las dextranasas estudiadas, tanto naturales, procedentes de hongos, levaduras y bacterias, como recombinantes.

Como resultado de los trabajos de recombinación, en 1995 se conoció la expresión de la dextranasa de la bacteria del entorno bucal *Streptococcus salivarius* en el propio organismo como hospedero, publicada por investigadores de la Universidad de Osaka [40]. En 1997, investigadores canadienses publicaron la construcción de una "librería" recombinante del gen codificante para la dextranasa del *Streptococcus suis* realizada en fago [41].

En 1998, investigadores japoneses publicaron la identificación de la producción de dextranasa en bacterias Gram negativas del entorno bucal: *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella melaninogenica* y *Prevotella oralis* [42], e investigadores canadienses reportaron la síntesis de dextranasa en el hongo dimorfo y patógeno *Sporothrix schenckii*, durante la fase tipo levadura de las células [43]. Esta última enzima presentó el pH igual a 5.0 como valor óptimo para alcanzar la máxima actividad.

En 1999, investigadores japoneses presentaron la expresión de las dextranasas de otra cepa de *Arthrobacter globiformis* [44] y del *Brevibacterium fuscum* de la variedad *dextranlyticum* en *E. coli* [45].

En el año 2000 se hizo público el resultado de investigadores daneses acerca de la clonación de un fragmento de ADN del hongo *Paecilomyces lilacinum*, codificante para la enzima dextranasa en diferentes especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Griberella* [46]. La temperatura óptima de la enzima recombinante lograda fue igual a 60 °C, es decir, no se diferenció de la enzima natural producida por el propio *P. lilacinum*.

En lo adelante, continuó la búsqueda de fuentes de dextranasa que aportaran enzimas con características que permitieran generar nuevos usos. Así, en el año 2001, investigadores alemanes publicaron el aislamiento de una cepa de la bacteria termófila, Gram positiva y anaerobia estricta *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, productora de dextranasa [47]. La enzima producida mostró la máxima actividad con pH igual a 5.5 y la temperatura entre 65 y 70 °C.

En 2003, investigadores norteamericanos publicaron el aislamiento de una cepa de *Streptomyces anulatus*, productora de dos dextranasas alcalinotolerantes durante el crecimiento en dextranas [48]. Las enzimas logradas presentaron tolerancia con el pH entre 5.0 y 9.5, a temperatura óptima igual a 40 °C para una, y 50 °C para la otra, mientras que el pH fue igual a 7.0 en ambos casos. Estas características orientaron el empleo de las enzimas fundamentalmente hacia la formulación de detergentes.

La tabla 1 resume las principales propiedades de algunas de las dextranasas antes mencionadas. La diferencia de los rangos del pH y la temperatura óptimos entre estas en relación con la fuente de origen es

Tabla 1. Valores óptimos del pH y la temperatura de dextranasas sintetizadas por diferentes microorganismos.

Dextranasas	Fuente		Valor óptimo	
			pH	Temperatura
Naturales	Hongos	<i>Penicillium lilacinum</i> [13]	5.0-5.5	53-60 °C
		<i>Penicillium luteum</i> [12]	4.0-6.0	50 °C
		<i>Penicillium funiculosum</i> [14]	6.0	NR
		<i>Penicillium aculeatum</i> [22]	4.5-5.6	50 °C
		<i>Penicillium minioluteum</i> [28]	4.5-5.0	35 °C
		<i>Penicillium notatum</i> [35]	5.0	50 °C
		<i>Chaetomium gracile</i> (dos enzimas) [20]	5.5-11.0	55 y 65 °C
		<i>Fusarium miniliforme</i> [18]	5.5	55 °C
		<i>Sporothrix schenckii</i> [43]	5.0	NR
	Bacterias	<i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>dextranlyticum</i> [15]	7.0-7.5	NR
		<i>Streptococcus mutans</i> [16]	5.5	37 °C
		<i>Streptomyces anulatus</i> (dos enzimas) [48]	7.0	40 y 50 °C
		<i>Flavobacterium</i> sp. M-73 [19]	7.0	35 °C
Levaduras	<i>Thermoanaerobacter wiegelsii</i> [38]	5.5	70 °C	
	Cepa del género <i>Thermoanaerobacter</i> [39]	4.5-5.5	80 °C	
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> [47]	5.5	65-70 °C	
	<i>Lipomyces starkeyi</i> [21]	5.0	55 °C	
	Recombinantes	Hongos	<i>Paecilomyces lilacinum</i> en <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Griberella</i> [46]	NR
<i>Penicillium minioluteum</i> en <i>Pichia pastoris</i> [32]			4.0-5.0	57 °C
Bacterias		<i>Streptococcus sobrinus</i> en <i>Escherichia coli</i> [34]	5.3	39 °C

NR: No reportado

evidente. En el caso de las dextranasas fúngicas, los valores óptimos del pH son, por lo general, ligeramente ácidos y en el caso de las bacterianas, el pH se encuentra más cercano al valor neutro. De forma excluyente solo se encuentran las enzimas del hongo *Chaetomium gracile* que mantiene su actividad óptima en el amplio rango del pH entre 5.5 y 11.0, y las enzimas de las bacterias del género *Thermoanaerobacter*, cuya actividad máxima se presenta con el pH próximo a 5.5, es decir, lo manifiestan como las dextranasas fúngicas.

Por lo general, la temperatura óptima de las dextranasas de los hongos se comporta entre 50 y 60 °C, ligeramente superiores a la de las bacterias que oscilan alrededor de 40 °C, con excepción, nuevamente, de las cepas de bacterias termotolerantes del género *Thermoanaerobacter*, que sobrepasan los 65 °C, y de una de las enzimas del hongo *Chaetomium gracile*, cuya temperatura máxima es igual a 65 °C.

En cuanto a las enzimas recombinantes, el comportamiento de los valores óptimos de temperatura y pH se reportó similar al de la enzima natural en el caso de la dextranasa de *Paecilomyces lilacinum* expresada en diferentes hospederos fúngicos, pero la enzima del *Penicillium minioluteum* expresada en la levadura *Pichia pastoris*, como se mencionó, elevó favorablemente su temperatura óptima de 35 a 57 °C y amplió el rango del pH entre 4.0 y 5.0.

36. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Characterization of the dextranase gene (dex) of *Streptococcus mutans* and its recombinant product in an *Escherichia coli* host. *Microbiol Immunol* 1995;39:387-91.

37. Wynter CVA, Galea CF, Cox LM, Dawson MW, Patel BKC, Hamilton S, et al. Thermostable dextranase: screening, detection and preliminary characterization. *J Appl Bacteriol* 1995;79:203-12.

38. Wynter CVA, Patel BKC, Bain P, de Jersey J, Hamilton S, Inkerman PA. A novel thermostable dextranase from a *Thermoanaerobacter* species cultured from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. *FEMS Microbiology Letters* 1996;140(2-3):271-6.

39. Wynter CVA, Chang M, De Jersey J, Patel BKC, Inkerman PA, Hamilton S. Isolation and characterization of a thermostable dextranase. *Enzyme and Microbial Technology* 1997;20:242-7.

40. Onishi Y, Kubo S, Ono Y, Nozaki M, Gonda Y, Kano H, et al. Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from *Streptococcus salivarius*. *Gene* 1995;156:93-6.

41. Serhir B, Dugourd D, Jacques M, Higgins R, Harel J. Cloning and characterization of a dextranase gene (dexS) from *Streptococcus suis*. *Gene* 1997;190(2):257-61.

Preparados enzimáticos de dextranasa para su empleo en la industria azucarera

El uso de la dextranasa en la industria azucarera fue argumentado por Tilbury [3] hace más de 30 años, cuando la enzima solo era estudiada para la elaboración de dextranas médicas que se empleaban como sustitutas del plasma sanguíneo y, más recientemente, en formulaciones dentífricas, para hidrolizar las dextranas presentes en las placas dentales.

Muchos han sido los preparados enzimáticos disponibles en el mercado, varias las compañías que los han producido y diversas las fuentes de enzima que se han utilizado, desde que en 1972 Inkerman y James presentaron sus resultados tras el empleo de la dextranasa para mejorar el procesamiento de la caña deteriorada en los centrales de Queensland [49]. En esos estudios iniciales de aplicación industrial, se utilizó el preparado enzimático Glucanase D-1, producido por la compañía Pfizer Chemicals para la hidrólisis de elevadas concentraciones de dextranas en el jugo mezclado.

Durante la década de los años 80, las compañías productoras de enzimas industriales comenzaron a producir preparados de dextranasa para su empleo en el proceso azucarero.

En 1986 surgió en el mercado el preparado enzimático Dextranex, producido por la compañía norteamericana Miles Laboratories, a partir de una cepa de *Chaetomium sp.* [32]. Este compuesto se propuso para utilizarlo en la industria azucarera, sin embargo, no aparece información disponible sobre su empleo.

Entre los primeros preparados enzimáticos de dextranasa lanzados al mercado, aparecieron también el DN 25 L y, posteriormente, el DN 50 L, ambos de la compañía danesa Novo Nordisk A/S, producidos con el empleo de una cepa de *Penicillium lilacinum* [13], la que posteriormente apareció renombrada como *Paecilomyces lilacinum* en el preparado enzimático Dextranase 50 L.

Ninguno de los preparados enzimáticos de la Novo Nordisk A/S obtuvo la aprobación de uso seguro (GRAS) por parte del órgano regulatorio de Estados Unidos para drogas y alimentos (FDA) y no pudieron ser comercializados en ese país, por lo que poco a poco se vieron reducidos sus mercados.

En las especificaciones de los preparados enzimáticos DN 25 L y DN 50 L de la Novo Nordisk A/S no se diferenciaron las ventajas de la dosificación en los jugos o en los siropes, y se sugirió que se emplearan en cualquiera de los casos, siempre que la temperatura estuviera entre 50 y 60 °C y el valor del pH entre 5.0 y 6.0 [13]. Según los datos disponibles, se sugirió que el preparado enzimático Dextranase 50 L, de la propia compañía, se empleara, específicamente, para hidrolizar las dextranas en los jugos.

En Cuba, el aislamiento de la cepa de *Penicillium minioluteum* como fuente de dextranasa activa, en condiciones industriales de temperatura y pH, permitió a los investigadores obtener, en 1988, un preparado enzimático que se empleó durante varios años en diferentes centrales del país [27].

El desarrollo del proceso de producción en *Pichia pastoris* de la dextranasa recombinante del *P. minioluteum*, llevado a cabo por investigadores cubanos, concluyó en la formulación del preparado enzimático

Hebertec-Dextranase, que se empleó en estudios de aplicación industrial en diferentes centrales azucareras del país, durante los años 1995 y 1999.

En estudios de laboratorio para la concentración inicial de dextranas igual a 1 500 ppm en presencia del 15% de sacarosa, a 50 °C y con el pH igual a 5.0 se obtuvo que la dosis de 16 ppm de Hebertec-Dextranase hidrolizó el 90% del polisacárido en 10 minutos. El tratamiento de concentraciones superiores de dextranas en iguales condiciones alcanzó un nivel inferior de hidrólisis. Se observó, asimismo, que la reducción de la temperatura de reacción a 35 °C provocó también la disminución del nivel de hidrólisis, el que alcanzó el 90% para la concentración inicial de dextranas igual a 500 ppm. Los estudios industriales en los que se dosificó este preparado enzimático en el jugo a 16 ppm, con un tiempo de reacción de 10 minutos, aportaron la hidrólisis del 85% de las 1 600 ppm de las dextranas presentes en él.

Con el empleo de las avanzadas técnicas de biología molecular, continuaron los trabajos de los diferentes grupos de investigación por mejorar los preparados enzimáticos de dextranasa, disponibles por las compañías productoras de enzimas industriales; pero no existen reportes que demuestren haber logrado otro preparado de dextranasa recombinante.

Las investigaciones en los laboratorios de la compañía Novo Nordisk A/S por lograr la expresión del gen codificante para la dextranasa del hongo *Paecilomyces lilacinum* en diferentes hongos filamentosos, no concluyeron con la presentación de un nuevo preparado enzimático aplicable en la industria azucarera, aunque sí en una patente para su uso en preparados dentífricos [46].

La enzima producida por el hongo *Chaetomium gracile*, caracterizada por la compañía Sankyo, se empleó en estudios de hidrólisis de las dextranas en centrales de Australia, se formuló en un preparado enzimático, producido por la compañía norteamericana Genencor, con el nombre de Dextranex™ y se evaluó en estudios en Louisiana durante las zafras de 1996 y 1997 [11].

En el año 1999, la compañía Sankyo obtuvo la aprobación GRAS emitida por la FDA para la enzima dextranasa producida por el *Chaetomium gracile* [50]. A pesar de la poca información disponible acerca del preparado enzimático Dextranase® producido a partir de este hongo, la compañía Sankyo informó el comienzo de su exportación a refinadores de Europa y Estados Unidos durante los años fiscales 2000 y 2001 [51, 52].

Durante el año 2002, apareció en el mercado el nuevo preparado enzimático Dextranase Plus L de la compañía Novo Nordisk A/S, con características mejoradas de termoestabilidad hasta 85 °C y pH más amplio, entre 3.0 y 7.0, producido a partir del hongo *Chaetomium erraticum* [53].

Las características de la enzima y del microorganismo fuente del preparado enzimático Dextranase Plus L, son similares a las de Dextranase L que se reportaron, ofertado en el mercado desde 1998, por la compañía japonesa Amano [54]. Este último puede ser empleado tanto en el jugo como en el sirope, pero se sugirió que en este segundo caso la dosis fuera diez veces superior, es decir, entre 50 y 100 mL por tonelada de sirope tratado, con el tiempo de reacción en el rango de 30 a 60 minutos, prolongado tres veces más que el planteado para el tratamiento del jugo.

42. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Detection of dextranase-producing gram-negative oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:382-6.

43. Arnold WN, Nguyen TBP, Mann LC. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenckii*. *Arch Microbiol* 1998;170:91-8.

44. Oguma T, Kurokawa T, Tobe K, Kitao S, Kobayashi M. Cloning and sequence analysis of the gene for glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044 and expression in *Escherichia coli* cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:2174-82.

45. Mizuno T, Mori H, Ito H, Hirokazu M, Kimura A, Chiba S. Molecular cloning of isomaltotriose-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. dextranolyticum strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63(9):1582-88.

46. Christensen T, Fuglsang CC, Halkier T, Johansen D, inventors; Novo Nordisk A/S, assignee. Recombinant enzyme with dextranase activity. US 6,156,553. 1998.

47. Hoster F, Daniel R, Gottschalk G. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. *J Gen Appl Microbiol* 2001;47:187-92.

48. Decker SR, Adney WS, Vinzant TB, Himmel ME, inventors; Midwest Research Institute, assignee. Alkaline tolerant dextranase from *Streptomyces anulatus*. US 6,509,184. 2003.

49. Inkerman PA, James GP. Dextranase II, Practical application of the enzyme to sugar mills. Proc Queensland Soc Sugar Cane Technologists. 43rd Conf, Watson Ferguson and Co, Brisbane, Queensland, Australia 1976. p. 307-15.

50. CFSAN/Office of Food Additive Safety. Summary of All GRAS Notices. [Publicación periódica en línea] 2004. Available from URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>.

51. Sankyo Co. Sankyo Review of Operations. Special Merchandise. P 20. Sankyo Co., Ltd., Japan. [Publicación periódica en línea] 2000. Available from URL: <http://www.sankyo.co.jp/english/tr/information/annual/2000/pdf/010.pdf>.

52. Sankyo Co. Sankyo Review of Operations. Health Care Department. P 21. Sankyo Co., Ltd., Japan. [Publicación periódica en línea] 2001. Available from URL: <http://www.sankyo.co.jp/english/tr/information/annual/2001/pdf/19-21.pdf>.

53. Novo Nordisk A/S. Ficha técnica Dextranase Plus L®. 2002. 2002-19760-01 10 14 2002 © Novozymes A/S, Kroghshøjvej 36, 2880 Bagsvaerd, Denmark. 2002.

54. Amano. Dextranase L "Amano". Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan. 1998.

En cambio, no se definió el uso específico (para jugo o sirope) del preparado enzimático Dextranase Plus L de la compañía Novo Nordisk A/S, lo que amplía la posibilidad de ser usado en presencia de mayor temperatura por la termotolerancia manifestada.

El Talozyme D es un preparado enzimático del que se publicaron noticias en Internet desde el año 2002. Se recomendó para usarlo en jugos con el pH entre 5.0 y 7.0, y la temperatura entre 50 y 60 °C, pero no se reportó la fuente enzimática empleada [55].

Desde que se identificó el empleo de la dextranasa en la industria azucarera, las compañías productoras se encargaron de hacer disponibles los preparados enzimáticos, cuyos precios se mantuvieron cercanos a los 30 000 dólares por tonelada durante 20 años, aproximadamente. Ese alto precio fue ajustado al beneficio que generaba su uso para evitar un exceso en el nivel de dextranas en los cristales de azúcar, por encima del valor permisible por los refinadores.

Aunque los preparados enzimáticos estuvieron disponibles, el alto precio imposibilitó su generalización para ser empleados en la industria azucarera. Desafortunadamente, no son muchos los resultados publicados acerca de su aplicación industrial, y muchos de los importantes juicios que pudieron ser emitidos por especialistas azucareros quedaron silenciados y solo subsistieron los criterios a voluntad de los productores de los propios preparados enzimáticos.

Tratamiento enzimático sobre jugos

A partir de los primeros estudios de aplicación industrial de preparados enzimáticos de dextranasa, desde el punto de vista económico se consideró suficiente hidrolizar las dos terceras partes de las dextranas presentes en el proceso, lo cual aportó una formidable mejora económica a la producción de azúcar [49]. Se asumió que el consumo de mayor cantidad de enzima solo generaría gastos irre recuperables.

A pesar de que los estudios pioneros con el preparado enzimático Glucanase D-1, en Australia, no especificaron la magnitud de la dosis empleada, reportaron la hidrólisis del 70% de las dextranas presentes en el jugo con la menor dosis estudiada [49]. Esto permitió concluir que, desde el punto de vista económico, la completa eliminación de las dextranas no sería esencial para lograr mayores ventajas en la aplicación de la enzima.

Los trabajos preliminares de evaluación de la dextranasa de *P. aculeatum* en jugos extraídos de diferentes partes de cañas cosechadas en diversas condiciones, definieron, de manera muy certera, que el empleo de la enzima fue especialmente útil en casos de estado crítico o de suministro de caña agria [56]. También indicaron que las condiciones favorables para la hidrólisis enzimática fueron los tiempos de reacción prolongados y con bajos Brix, y sugirieron añadir la enzima lo antes posible en el proceso, ya fuera en los molinos o durante la evaporación.

El criterio para calcular la dosis de dextranasa para el nivel de hidrólisis necesario apareció publicado por primera vez en los manuales de los preparados enzimáticos DN 25 L y DN 50 L de la Novo Nordisk A/S [13].

Un factor muy importante tomado en cuenta para favorecer la hidrólisis, fue la definición del tiempo de

residencia de la enzima, que en el caso de la dosificación en jugos osciló entre 10 y 15 minutos [11].

Durante las zafras de 1996 y 1997, se realizaron en Louisiana estudios de aplicación industrial con el preparado Dextranex™, dosificado sobre jugo mezclado a razón de 6 g/t de jugo, con un tiempo de reacción entre 12 y 15 minutos [11]. Como resultado se obtuvo la reducción del nivel de dextranas entre el 50 y el 85%, a la vez que se observó la reducción de la viscosidad en los tachos, la disminución de la pureza de las mieles a los valores normales y la caída del contenido de dextranas en los cristales de azúcar de 3 200 a 630-780 ppm.

Recientemente, los precios de los preparados enzimáticos disponibles en el mercado disminuyeron en casi ocho veces [7]. Debido a ello, cambió el punto de vista de hidrolizar solo las dos terceras partes de las dextranas y se retomó como objetivo lograr la mayor hidrólisis posible. Sin embargo, la conclusión a la cual se arribó desde épocas tempranas sobre el uso puntual de la enzima solo en los momentos de elevado nivel de dextranas en el proceso, quedó vigente [56].

El Audubon Sugar Institute informó el empleo durante el año 2002 de la dextranasa en todos los centrales de Louisiana, cada vez que fue requerido [57].

Tratamiento enzimático sobre sirope

Los resultados experimentales demostraron que con el aumento de la concentración de azúcar en la solución a 65 °Brix, las enzimas dextranasas producidas por los hongos *Chaetomium gracile* y *C. erraticum*, incrementaron la estabilidad térmica hasta 85 °C, pero este aumento del Brix redujo la velocidad de la hidrólisis de la dextrana [53, 54]. Se planteó entonces que cuando la concentración de azúcares es de 60 °Brix, la actividad enzimática se reduce entre el 30 y el 40% [1].

El aumento de la tolerancia térmica de la dextranasa propició a los investigadores el interés de evaluar su uso en sirope o meladura, con el objetivo fundamental de reducir el consumo de la enzima al aplicarla en sitios procesadores de menor volumen.

Tratamientos realizados en Australia mostraron que la viscosidad de la miel B con alto contenido de dextranas se redujo en 20% como resultado de la hidrólisis enzimática en etapas avanzadas del proceso [1].

En Louisiana, en el ensayo de suministro del preparado Dextranex™ al cuarto (último) evaporador a 85 °C y 65 °Brix [11], aunque no se reportó la dosis empleada, se propició la reducción del nivel de dextranas entre el 70 y el 75% en la meladura, mientras que la disminución en la miel A fue entre el 20 y el 60% y el contenido de dextranas en el azúcar disminuyó de 2 450 a 780 ppm. También se reportó que estudios de aplicación industrial en el central de Alma Plantation aportaron resultados similares [7].

Para alcanzar el nivel satisfactorio de hidrólisis de las dextranas, con esta enzima que mostró incrementada la termotolerancia en sitios del proceso posteriores a los evaporadores, fue necesario realizar la corrección de la dosis por la pérdida de actividad, causada por el elevado Brix. Como resultado, la dosis por unidad de volumen aumentó hasta seis veces, lo que igualó el consumo diario de la enzima y, por ende, no disminuyó el costo del tratamiento enzimático, a pesar de la concentración del flujo industrial a lo largo del proceso

55. CYTEC. Talozyme D. Liquid dextranase concentrate for the sugar industry. WTT-1216. CYTEC Industries Inc., 1.5k 9/02 HOR. 2002. [Sitio en Internet] Available from URL: <http://www.cytec.com>, 2002.

56. Madhu GLS, Prabhu KA. Application of dextranase in the removal of dextran from cane juice, International Sugar Journal 1984;86(1025):136-8.

57. Audubon Sugar Institute. Annual Report 2002-2003; p. 15. [Publicación periódica en línea] 2003. Available from URL: <http://www.lsuagcenter.com/Inst/Research/Departments/audubonsugar/PDF/Audubon%20annual%2003.pdf>.

en similar magnitud, desde la etapa de extracción a la de sirope [7]. Esto eliminó la posibilidad de economizar el preparado enzimático, al emplearlo en puntos del proceso donde la reducción del volumen del material a tratar combinó la mayor concentración de azúcar con el aumento de la temperatura.

En Cuba, los estudios con el preparado enzimático de dextranasa natural del hongo *Penicillium minio-luteum* indicaron la necesidad de incrementar la dosis en 6 y 50 veces, para el tratamiento de la meladura y de la miel B, respectivamente, así como duplicar el tiempo de reacción en relación con el empleado en el tratamiento del jugo [58].

Se determinó también que el preparado enzimático de dextranasa recombinante Hebertec-Dextranase incrementó su termotolerancia con el aumento del Brix en la solución tratada. La actividad residual de la enzima fue del 85%, después de ser sometida a 65 °C, durante 30 minutos en presencia de 65 °Brix. La evaluación del empleo de la enzima recombinante en soluciones de sacarosa con mayor Brix, aportó mayor consumo de la enzima, igual que se obtuvo para la enzima natural. Estudios de laboratorio demostraron que 160 ppm del Hebertec-Dextranase, hidrolizaron el 80% de 1 500 ppm de dextranas en presencia de sacarosa al 60%, en 15 minutos de reacción a 65 °C y pH igual a 6.0. Para mayor concentración inicial de dextranas, la hidrólisis fue inferior.

Otros intereses de desplazar erróneamente el empleo de la dextranasa a las etapas posteriores del proceso se emiten en trabajos promotores del uso de productos biocidas [59]. La importante función que desempeña la enzima en el proceso de producción no contrarresta el uso de biocidas, sino que lo complementa, para lograr recobrar todo el azúcar presente. Mientras más rápido se reduce la viscosidad en el proceso, mayor cantidad de azúcar se recupera, y por lo tanto, menores las pérdidas económicas generadas. Por citar un ejemplo, aún con el empleo del biocida en el tándem y, por lo tanto, la ausencia de contaminación bacteriana en los molinos, las dextranas potenciales pueden ser formadas en la caña durante su traslado hacia el central, por causa de factores climáticos inevitables, lo cual ejerce el nefasto efecto al proceso, que solo es eliminado por la acción de la dextranasa desde el mismo inicio del proceso. Recientemente se publicó que la situación de las dextranas ha empeorado en los últimos años en Sudáfrica, comparado con datos de archivos [2].

A diferencia de la aplicación inmediata del preparado enzimático sobre los jugos, al realizarse su dosificación en puntos más avanzados del proceso, las etapas anteriores toleraron las perturbaciones generadas por la elevada viscosidad, por lo que las pérdidas económicas asociadas con esos trastornos, así como las mermas iniciales sufridas por la sacarosa hidrolizada a dextranas, tienen que ser adicionadas al costo total del tratamiento enzimático. Es decir, el desplazamiento del tratamiento enzimático hacia etapas avanzadas del proceso lo encarece, y solo se circunscribe al estado crítico generado por las dextranas, que llega inevitablemente a los tachos por causa de descuidos. En este caso, el efecto de la adición directa en ese punto se obtiene antes, que si se dosifica desde el jugo.

El punto ideal para la aplicación de la enzima aparece poco discutido en los diferentes estudios publicados. Estos se limitan a mencionar el sitio empleado, sin ilustrar con un análisis comparativo. La información más explicativa al respecto la emitió el Audubon Sugar Institute en el año 2003, en la cual se afirmó que el sitio más efectivo para la adición de la enzima fue bajo los molinos [57]. Se planteó que en ese punto las condiciones de temperatura, pH e hidratación fueron tales que permitieron la rápida acción de la enzima. El tratamiento sobre sirope o meladura se suscribió como un punto secundario para la aplicación, muy útil en el reciclaje de azúcar C con alto contenido de dextrana.

Reportes recientes de estudios de laboratorio con el objetivo de establecer las condiciones favorables de reacción para tres dextranasas diferentes: los preparados de la Novo Nordisk A/S, Dextranase 50 L (*P. lilacinum*) y Dextranase Plus L (*C. erraticum*) y de la Genencor, Dextranex L-4 000 (*C. gracile*) [2], indicaron la posibilidad del empleo en sirope de las dos enzimas provenientes de *Chaetomium sp.* a 60 °C, con el reajuste de la dosis por el aumento del Brix y la temperatura, sugeridos por los productores. Sin embargo, a 70 °C resultó necesario duplicar la dosis, por lo que no se consideró factible su empleo en esas condiciones.

De forma general, los datos publicados acerca del efecto económico del empleo de la dextranasa son insuficientes, ya sea en el tratamiento sobre el jugo desde la etapa inicial de los molinos, como sobre el sirope, la meladura o miel, en las etapas posteriores del proceso. Lo que sí resulta evidente después de este análisis, es que las pérdidas irreversibles del azúcar convertido en dextranas y las pérdidas en los sitios previos al tratamiento enzimático (donde quiera que este se haya realizado), son irre recuperables y tienen que ser tomadas en cuenta para los estimados estrictos.

Como resultado de un análisis de hace varios años por investigadores cubanos, se planteó la posibilidad que con el empleo de la dextranasa se pudiera recuperar 0.8 kg de azúcar por tonelada de caña molida, a partir de la disminución de la pureza de la miel final en 8%, durante los 30 días de más lluvias durante la zafra [60]. Según lo analizado, para el cálculo exacto de la relación costo-efectividad del empleo de la dextranasa, es necesario, al valor del azúcar recuperado, sustraer el costo del preparado enzimático consumido, la cuantía de las pérdidas de azúcar incurridas por la conversión a dextranas y los derrames, así como realizar la corrección del contenido inicial de azúcar en el jugo por el factor de reajuste del Pol falseado.

El costo aproximado del empleo del preparado enzimático para las condiciones actuales, es decir, con el valor de la tonelada del preparado enzimático alrededor de los 3 500 dólares, la dosis de empleo en jugo de 16 ppm, que hidrolizan el 90% de hasta 1 600 ppm de dextranas presentes, y con la recuperación de 0.8 kg de azúcar por tonelada de caña molida afectada por dextranas, muestra resultados más atractivos. Tomando en cuenta además, que la cantidad de jugo generado por tonelada de caña es aproximadamente de 1.075 m³, significa que por cada tonelada de caña tratada, se aplican 14.88 ppm del preparado enzimático y, si este tiene la densidad igual a 1 g/mL, su coste corresponde a 0.052 dólares. Por otra parte, si se asume que en el mercado el precio de la libra de azúcar es 0.05 dólares, el valor de la

58. Guilarte B, Cuervo R. Aplicación de dextranasa. Quimización de la industria azucarera. ICINAZ-MINAZ; 1990.p. 43-60.

59. Cuddihy JA, Day DF. Biocide usage at Louisiana factories. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] 1998. Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/biouseage.pdf>.

60. Namer I, Pérez JR, Dávila H. Análisis de los beneficios económicos del empleo de las enzimas en la producción del azúcar de exportación cubana. Atac 1988;3:34-8.

cantidad de azúcar recuperada es de 0.088 dólares. Por tanto, el efecto económico del empleo de la enzima en el jugo desde la etapa inicial del proceso de producción de azúcar, dado como la correlación del dinero recuperado en azúcar con el gastado en el preparado enzimático, es aproximado a 1.7 veces. A esto se sumarán, además, los ahorros por no pagos de las penalidades y los atarugamientos y paradas, que convergen en la estabilidad de la producción del central, aspectos muy importantes que deben tomarse en cuenta.

Según los datos que presenta este trabajo, no ocurre de manera igual si se dosifica el preparado enzimático

en puntos más avanzados del proceso de producción de azúcar, donde inevitablemente ocurrieron ya otras pérdidas por la acción de las dextranas y además se necesita la dosis diez veces superior para el tratamiento.

Agradecimientos

A todos aquellos que de una forma u otra colaboraron en la confección de este documento, en especial a los doctores José Cremata y Manuel Raíces, por haber dispuesto su tiempo para revisar el manuscrito, por sus útiles consejos al respecto y por haber trabajado también en esta temática durante varios años.

Recibido en agosto de 2004. Aprobado en noviembre de 2004.