

Biosíntesis de dextranos de alto peso molecular mediante la inoculación con *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830) de jugos residuales de la agroindustria de la piña: síntesis y caracterización de hierro-dextranos

Biosynthesis of high molecular weight dextrans by inoculation with *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830) residual juice from pineapple agroindustry: synthesis and characterization of iron-dextrans

Vega Baudrit, José Roberto ^(1,2), Sibaja Ballester, María del Rosario ⁽¹⁾, Lopretti, Mary ⁽³⁾

⁽¹⁾Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica - ⁽²⁾Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANO-TEC-CeNAT, Costa Rica - ⁽³⁾Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay

Contacto: jvegab@hotmail.com, maria.sibaja@gmail.com

Recibido: 13/6/2012 - Aprobado: 20/11/2012

Resumen

En este trabajo se muestran los estudios realizados para obtener dextranos a partir de desechos de la agroindustria de piña. La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor (10 L), se inoculó con un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830). Se centrifugó y se precipitó y purificó con etanol. Fue caracterizado por medio de viscosidad, peso molecular y grupos funcionales por espectroscopía infrarroja. Este dextrano fue tratado con el fin de obtener hierro-dextranos.

Palabras clave: Polímeros, dextrana, hierro-dextrana.

Abstract

In this work we report studies for dextrans from pineapple agroindustrial-wastes. Fermentation was carried out in a bioreactor (10 L) where the juice was inoculated with a culture of *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830). It was centrifuged, and precipitated and purified with ethanol. It was characterized by viscosity, molecular weight and functional groups by infrared spectroscopy. This dextran was treated to obtain iron-dextran.

Keywords: Polymer, dextran, iron-dextran.

Introducción

Dextrano es el nombre que colectivamente se le da a un gran grupo de exopolisacáridos bacterianos. Químicamente son α -D-glucanos con predominio de enlaces glucosídicos 1-6 (Figura 1). La estructura, el peso molecular y otras propiedades de los dextranos son muy específicas de acuerdo al microorganismo utilizado para su obtención (Monsan, 1981).

Los dextranos son producidos por acción de la enzima dextranasa, que actúa sobre la sacarosa generando glucosa, y que se enlaza mediante radicales libres con la consiguiente liberación de la fructosa. Microbiológicamente son producidos por bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* y por algunos hongos del género *Penicillium* (Barker y Ajongwen, 1990).

Este tipo de material es ampliamente usado en el tratamiento clínico-terapéutico de animales y humanos y en la industria alimenticia y farmacéutica. Los altos precios en los mercados internacionales convierten a estos productos en una línea importante de desarrollo,

sobre todo si la materia prima a utilizar es un desecho (Lía et al., 1996).

En los últimos años la industrialización de la biomasa genera gran cantidad de desechos (Tabla 1), los cuales son dispuestos en rellenos sanitarios, zanjas o en las riveras de los ríos, convirtiéndose de esta manera en una fuente de contaminación ambiental. Sin embargo, estos desechos muestran un alto potencial para ser utilizados como materia prima en otros procesos industriales (Vega, 1998).

Dentro de los desechos agroindustriales se encuentran los originados por el procesamiento de la piña, cuyo cultivo y exportación como producto no tradicional ha venido en aumento en los últimos años (Figura 2). Para 2010 y 2011, el crecimiento ha sido exponencial. Las exportaciones de piña aumentaron un 4.9 % para abril de 2011 en comparación con el mismo período de 2010.

En Costa Rica la industrialización de la piña genera un 50 % de desechos; el corazón y la cáscara representan el 30 %, equivalente a una cantidad cercana a las 3.000 toneladas anuales (Vega, 1997, 1998; Bell, 1995). En la Tabla 2 se presentan algunas estadísticas relacionadas con la producción de desechos.

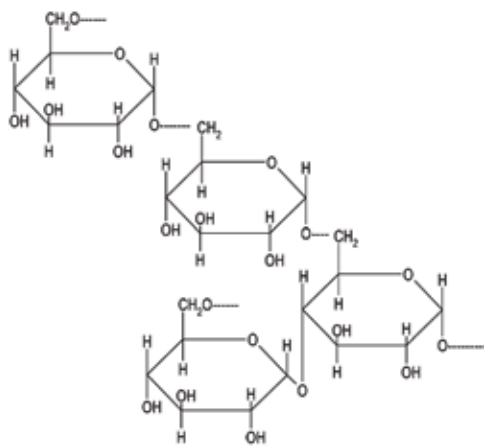


Figura 1. Molécula de dextrano.

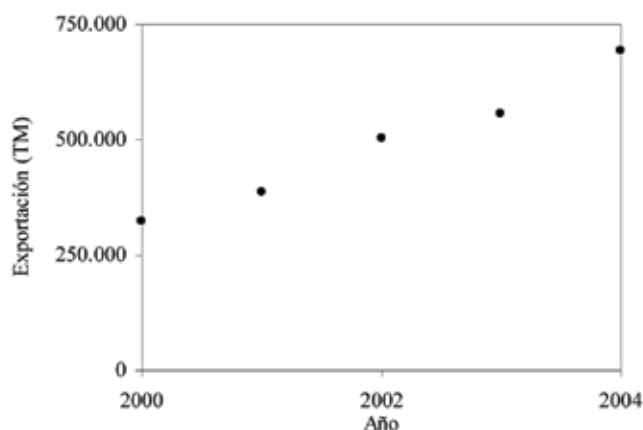


Figura 2. Volúmenes de exportación de piña entre 2000 y 2004. Fuente: CENPRO.

Tipo de desecho	Porcentaje (± 0.5)
Ordinario	13,6
Peligroso	0,4
Agroindustriales	86,0

Tabla 1. Producción de desechos en Costa Rica (Vega, 1998).

Tipo de desecho	Porcentaje
Área sembrada	7.000 Ha
Producción anual	240.000 T.M.
Exportación	90%
Aprovechamiento del fruto	35-50%
Corona	12%
Corazón	9%
Cáscaras	32%

Tabla 2. Estadísticas relacionadas con la industrialización de la piña (1994). Fuente: CENPRO.

En el caso de las cáscaras de piña, se ha aprovechado su parte fibrosa en la obtención de derivados lignocelulósicos (Bell, 1995; Lopretti, 2002) y el líquido resultante queda como un desecho que ha sido poco evaluado. Dicho jugo presenta un contenido de sacarosa de aproximadamente 5 %, lo que lo convierte en un sustrato adecuado para la obtención de dextranos utilizando una cepa del género *Leuconostoc*.

El objetivo de este trabajo es la producción biotecnológica de dextranos de alto peso molecular, utilizando como sustrato la sacarosa presente en el jugo de las cáscaras de piña y como inóculo la cepa *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* ATCC 10830 (NRRL B-512F).

Materiales y Métodos

Sustrato

El jugo se obtuvo del prensado de los desechos del procesamiento de la piña (*Ananas comusus*), en una de las plantas procesadoras de la fruta. El jugo fue pretratado con hidróxido de sodio 1N, hasta un pH de 5,5 y se pasteurizó calentándolo a 61,5 °C por 3 minutos con enfriamiento hasta la temperatura inicial. Este proceso se realizó tres veces consecutivas.

Análisis químicos del sustrato

El porcentaje de sacarosa y otros azúcares fue determinado mediante HPLC (Shimadzu 10A, columna y precolumna de aminos, fase móvil acetonitrilo/agua en una relación 80/20, a 30 °C, flujo 2 mL/min, detector de índice de refracción). La determinación de ácidos totales se realizó por titulación con hidróxido de sodio 0.100 N, los metales traza por absorción atómica, proteínas por el método de Biuret,

cenizas por ASTM D1102- 84 y pH por medio de un peachímetro calibrado.

Análisis microbiológicos

La caracterización microbiológica del jugo de las cáscaras de piña fresco y sin recibir tratamiento previo incluyó la determinación del índice de coliformes fecales y totales, con la técnica de tubos múltiples (Bell y Carrera, 1992), conteo total de aerobios y mesófilos, utilizando las técnicas por vaciado y rayado, y conteo de hongos y levaduras (Bell, 1970).

Microorganismo empleado

Se utilizó la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* ATCC 10830.

Inóculo

El jugo de piña fue inoculado con un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* incubado durante 18 horas a 29 °C en un medio de cultivo artificial, el cual contiene para 1 L de agua: 20 g de triptona, 4 g de cloruro de sodio, 1,5 g de acetato de sodio, 0,5 g de ácido ascórbico, elementos traza (Ca, Mn, Fe, Mg), 15 g de sacarosa y 8,76 g de extracto de levadura y 20 g de agar. El pH del medio se ajustó a 5,5 con ácido clorhídrico (Vega, 1998) antes de autoclavarse (121 °C, 20 minutos).

Obtención y purificación de dextranos

El jugo del desecho de piña inoculado se incubó por 18 horas a 29 °C, sin agitación. Al finalizar el período de incubación se centrifugó por 30 minutos a 5000 rpm, para eliminar las células. Al sobrenadante se

le adicionó etanol al 95 % hasta una proporción 1 a 1 en volumen. Se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos (Vega, 1998).

El sobrenadante se descartó y al precipitado blanco se le agregó agua hasta disolverlo, para iniciar el proceso de purificación. Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y al sobrenadante se le agrega etanol (1/1 volumen). Se realizó la curva de precipitación para comprobar esta relación 1:1. El proceso se repite dos veces más.

El dextrano obtenido se secó, se determinó el rendimiento de producción, su viscosidad, el peso molecular por viscosidad y grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo.

Caracterización de dextransos

Viscosidad y peso molecular viscosimétrico

Los análisis se realizaron según el ASTM D445 y D2515 (5) con viscosímetros Cannon-Fenske, en un baño de agua a una temperatura de 40 °C.

Grupos funcionales

Se utilizó un equipo de Espectroscopía de infrarrojo (FTIR) PARAGON 1000 PERKIN ELMER.

Hidrólisis del Dextrano

Lopretti (2002). Se preparó una disolución del dextrano al 6 % P/V en agua destilada. Se le añadió HCl concentrado hasta alcanzar una concentración de 0.1 N. Se calentó entre 80-90 °C con agitación.

Al inicio de la hidrólisis se tomó una alícuota de la disolución. El proceso se repite cada cierto tiempo, se coloca en un balón aforado y se lleva a un pH de 7 con NaOH. Se le determina la viscosidad.

Síntesis y caracterización de Hierro-dextrano

(Bell, 1995). La metodología abarca tres etapas. En la primera ocurre la hidrólisis del dextrano técnico en solución al 10 % de ácido clorhídrico (32-37 %). La hidrólisis se regula por medio de análisis de viscosidad intrínseca hasta valor 0,05-0,1 y se detiene neutralizando y enfriando la mezcla de reacción. Finalmente se filtra utilizando ayuda filtrante. Este proceso de hidrólisis permite obtener una solución de dextrano de bajo peso molecular, homogéneo y adecuado para ser acoplejado sin dar lugar a dextransos libres de alto peso molecular.

En la segunda etapa se realiza la síntesis del hierro-dextrano, partiendo de la reacción lenta entre el FeCl_3 0,5-2 M y el Na_2CO_3 a 10-20 %. Se ajusta pH en 8-12 con hidróxido sódico al 20 %. La solución se estabiliza con calor. Se enfría y se ajusta el pH con HCl 1:1 hasta valores entre 4-7. La ejecución de esta etapa, según se señala, reduce el contenido de hierro libre que afecta la estabilidad del complejo.

En la tercera etapa se filtra el producto empleando ayuda filtrante y se añade propil y metil parabenos en relación 1:4 como preservantes. Se caracteriza su contenido de hierro y su pH.

Resultados y Discusión

Con respecto a la caracterización del jugo de piña, se procedió a hacer el análisis por separado del jugo extraído de las cáscaras de la piña y del corazón del fruto. Como los resultados obtenidos no indican diferencias apreciables en cuanto al pH y al contenido de sacarosa, en posteriores usos se utilizan indistintamente, sin separar los residuos (Tabla 3).

La selección del sustrato se realizó con base en los requerimientos de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la cual necesita para su reproducción un pH de 5,5, 20-30 °C y 2 % de sacarosa. El contenido de sacarosa del jugo de piña posterior a la esterilización queda en 1,4 %. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos con respecto a algunos elementos traza.

El análisis de sacarosa al final de la obtención de dextrano fue de 0,13 %, lo que demuestra que durante el proceso de fermentación la mayoría de la sacarosa presente fue consumida por el microorganismo y parte de ella transformada en dextransos y fructuosa.

El rendimiento de dextransos obtenido fue de 6,3 g/l de jugo de las cáscaras de piña. Este rendimiento es superior si se compara con el obtenido utilizando otros sustratos (Lopretti, 2002).

En la Figura 3 se observan los resultados obtenidos en la determinación de la curva de precipitación para la purificación del dextrano. Se comprobó que la cantidad necesaria para precipitar la máxima cantidad de un dextrano en medio acuoso utilizando alcohol 95 % corresponde a una relación de 1:1 agua-etanol.

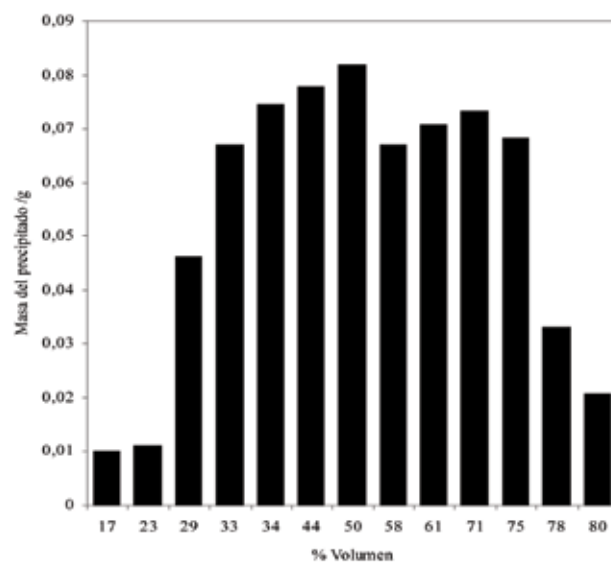


Figura 3. Resultados obtenidos en la determinación de la curva de precipitación para la purificación del dextrano.

Desecho	pH ($\pm 0,05$)	Acidez* ($\pm 0,05$)	Sacarosa ($\pm 0,05\%$)	Cenizas ($\pm 0,05\%$)	Proteína ($\pm 0,1$ mg/mL)
Cáscara de piña	3,70	70,56	4,16	0,43	10,4
Corazón de pina	3,90	47,62	5,89	0,26	4,4

Tabla 3. Caracterización de los desechos de piña sin tratar. *mL de NaOH 0.1 N/100 g de jugo

Elemento	Ca	Mg	Fe	Mn
%	0,015 \pm 0,001	0,009 \pm 0,001	0,0004 \pm 0,0001	0,0011 \pm 0,0001

Tabla 4. Determinación de elementos traza de los desechos de piña.

Con respecto a los resultados de la viscosidad relativa (Tabla 5), la diferencia observada entre el resultado teórico del peso molecular y el obtenido experimentalmente corresponde al ancho de la curva de peso molecular, es decir, parte de la viscosidad depende de las fracciones de menor peso molecular, de un material monodisperso. El resultado corresponde, por lo tanto, al máximo pico observado. Se calculó que el peso molecular del dextrano de piña es cercano a 1 millón de Daltons.

Muestra	Viscosidad relativa	Resultado MW (Daltons)
Dextrano de piña	6,4	960 000.00
Patrón de 40000	1,6	35 000
Patrón de 70000	1,7	60 000

Tabla 5. Resultados obtenidos en la determinación de la viscosidad y de los pesos moleculares viscosimétricos de los dextranos.

El espectro de infrarrojo mostró los picos característicos de un material celulósico a 3300 y 2900 cm^{-1} , correspondientes a los grupos OH. Con los resultados observados en los espectros de infrarrojo, se concluye que el material producido corresponde al dextrano.

Finalmente, el hierro dextrano sintetizado presentó un color rojo oscuro, con un pH cercano a 5, un contenido de 10 % p/v de hierro, muy similar al descrito en la literatura (Bell, 1995; Bell, 1992).

Conclusiones

Se concluye que la metodología usada para la obtención de dextranos y de hierro dextranos a partir de la sacarosa presente en los desechos de cáscara de piña da buenos resultados, incluso superiores con respecto a los mencionados en la literatura.

Además, eventualmente se aprovecharían materiales considerados como subproductos de procesos industriales, económicamente subutilizados, y que producen alta contaminación ambiental para la obtención de materiales de mayor valor agregado.

De esta manera se pretende que con el aporte de los centros de investigación, las compañías industrializadoras de esta fruta disminuyan el porcentaje de sus desechos y, por ende, su impacto negativo en el medio ambiente, y que a la vez se beneficien con una entrada extra con la obtención de productos de un mayor valor agregado que el de los desechos. Se combina de esta manera un mejoramiento en la calidad de vida del costarricense y un incremento en las ganancias de los productores de la fruta.

Referencias

- ASTM INTERNATIONAL (United States). D1102: *Standard test method for ash in wood*. Conshohocken: ASTM, 2007.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D445: *Standard test method for kinematic viscosity of transparent and opaque liquids (and calculation of dynamic viscosity)*. Conshohocken: ASTM, 2012.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D2515: *Standard specification for kinematic glass viscosity*. Conshohocken: ASTM, 1996.
- BARKER, P.E.; AJONGWEN, N.J. The productions of the enzyme

dextranucrase using nonaerated fermentation techniques. En: *Biotechnol. Bioeng.* 1990, 37:703-707

- BELL GARCÍA, Antonio. *Producción del complejo de dextrana de hierro de uso antianémico*. Cuba. 22490. A61K. 1998-12-30.
- BELL, A.; CARRERA, E. Optimización de la hidrólisis química de la Dextrana técnica cubana para la obtención de dextrana con bajo peso molecular. En: *Revista ICIDCA*. 1992, XXVI(2):[s.p.]
- BELL, A.; MALEK, J. *Boletín sobre los derivados de la caña de azúcar*. 1970, 7(2):[s.p.]
- CENPRO. Información consultada en el “Centro para la Promoción de las Exportaciones y de las Inversiones”, San José, Costa Rica.
- GONZÁLEZ, E.; MONCTEZUMA, A. Biotechnology for the processing of pineapple waste. En: *Industry and Environment*. 1985, 8(4):20.
- LÍA TORRES, L.; SIBAJA, M.; MOYA, M.; LUQUE, J.; LOPRETTI, M. *Conversión del jugo de cáscaras de piña a biopolímeros*. [s.l.]: [s.n.], 1996.
- LOPRETTI, M. *Producción simultánea de dextrano y fructosa a partir de desechos agroindustriales en Iberoamérica, aspectos científicos, técnicos y económicos*. [s.l.]: CYTED, 2002.
- MONSAN, P. On the production of dextran by free and immobilized sucrosa. En: *Biotechnol. Bioeng.* 1981, 23:2027-2037.
- VEGA, J. *Informe anual producción de dextranos de desechos agroindustriales*. Heredia: POLIUNA, 1997.
- VEGA, J. *Informe del Curso Internacional Obtención de Dextranos a partir de agua de Coco*. [s.l.]: [s.n.], 1998.