



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LAS PROPIEDADES FISICAS  
(FORMA, DIAMETRO, DIFUSION Y RESISTENCIA A  
LA COMPRESION) DE ESFERAS DE ALGINATO DE  
CALCIO PARA SU UTILIZACION COMO SOPORTE  
DE INMOVILIZACION DE LA LEVADURA  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y SU EFECTO  
SOBRE LA VIABILIDAD

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**INGENIERO EN ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**JUAN ANTONIO JASSO HERNANDEZ**

ASESORES: C.F.B. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO  
M. EN C. VIRGINIA LARA SAGAHON  
I.B.D. FRANCISCO MONTIEL ROSA

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis:  
Evaluación de las propiedades físicas (forma, diámetro, difusión y resistencia a la compresión) de esferas de alginato de calcio para su utilización como soporte de inmovilización de la levadura Saccharomyces cerevisiae y su efecto sobre la viabilidad que presenta el pasante: Juan Antonio Jasso Hernández con número de cuenta: 9061643-3 para obtener el TITULO de: Ingeniero en Alimentos.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de septiembre de 1997

PRESIDENTE	<u>M.enC. Clara Ines Alvarez Mancique</u>
VOCAL	<u>Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Norma L. Delgado Buenrostro</u>
2do. SUPLENTE	<u>I.B.Q. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza</u>

**A mis padres:**

Rosa María Hernández Vázquez  
Juan Manuel Jasso García

Por su cariño, apoyo y fuerza espiritual que han hecho  
sobrepasemos las situaciones difíciles a lo largo de  
nuestra vida gracias.

**A mis hermanos:**

Jaime Manuel Jasso Hernández (con Dios estes)  
Patricia Jasso Hernández  
Victoria Jasso Hernández  
Magdalena Jasso Hernández  
Guillermo Jasso Hernández

Por sus consejos y hermandad que han permitido  
integrarnos como una gran familia gracias.

**A mis asesores:**

Susana Patricia Miranda Castro  
Virginia Lara Sagahon  
Francisco Montiel Sosa

Por su amistad y apoyo didáctico que facilitó el desarrollo de este trabajo gracias.

**A mis maestros:**

Maria Esther Revuelta Miranda  
Clara Ines Alvarez Manrique  
Gloria López Correa  
Juan Antonio Montaraz

Por su amistad y orientación recibida para un mejoramiento personal gracias.

**A mis amistades:**

**Gracias por su amistad e impulso moral que he  
recibido de ustedes.**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA LEVADURA.....</b>	<b>2</b>
1.1.1.- Clasificación.....	2
1.1.2.- Características de las Levaduras.....	2
1.1.3.- Géneros de levaduras.....	4
<b>1.2.- SACCHAROMYCE.....</b>	<b>5</b>
<b>2.- INMOVILIZACIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.- TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN.....</b>	<b>6</b>
2.1.1.- Atrapamiento.....	7
2.1.2.- Adsorción física.....	8
2.1.3.- Unión con metales o quelación.....	8
2.1.4.- Enlaces covalentes.....	8
2.1.5.- Entrecruzamiento.....	9
<b>2.2.- APLICACIONES.....</b>	<b>9</b>
2.2.1.- Aplicaciones de células inmovilizadas.....	10
2.2.1.1.- Producción de aminoácidos.....	10
2.2.1.2.- Producción de antibióticos.....	10
2.2.1.3.- Producción de ácidos orgánicos.....	10
2.2.1.4.- Producción de saborizantes y aromatizantes.....	11
2.2.1.5.- Otros productos.....	11
2.2.2.- Elección del método de inmovilización.....	11
<b>2.3.- SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN.....</b>	<b>12</b>
2.3.1.- Alginato como soporte.....	12
2.3.1.1.- Fuentes y estructura de alginato.....	12
2.3.1.2.- Formación de partículas de alginato.....	12
2.3.1.3.- Aplicaciones del alginato como soporte.....	14
2.3.1.4.-Ventajas y desventajas del alginato como soporte.....	14
2.3.2.- Importancia de las características físicas del gel de alginato.....	15
<b>3.- CUADRO METODOLÓGICO.....</b>	<b>17</b>

4.- OBJETIVOS.....	19
4.1.- OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
5.- HIPÓTESIS.....	21
6.- METODOLOGÍA.....	23
6.1.- FORMACIÓN DE ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.....	24
6.2.- DETERMINACIÓN DE CALCIO ABSORBIDO POR ESFERAS FORMADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO DE SODIO Y CaCl <sub>2</sub> .....	25
6.3.- DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CALCIO DURANTE LA FORMACIÓN DE ESFERAS.....	26
6.4.- ABSORCIÓN DE CALCIO DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE ESFERAS.....	26
6.5.- FORMA DE LAS ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.....	27
6.6.- DIÁMETRO DE ESFERA DE ALGINATO DE CALCIO.....	27
6.7.- RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN DE LAS ESFERAS.....	28
6.8.- DIFUSIÓN DE GLUCOSA EN LAS ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.....	29
6.9.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
6.10.- OBTENCIÓN DE LA BIOMASA.....	30
6.11.- MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN.....	30
6.12.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD.....	31
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1.- DETERMINACIÓN DE CALCIO ABSORBIDO POR ESFERAS FORMADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO Y CaCl <sub>2</sub> .....	33
7.2.- TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CALCIO.....	36
7.3.- ABSORCIÓN DE CALCIO DE LA SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO.....	37
7.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO Y CaCl <sub>2</sub> Y ALTURA DE GOTEO SOBRE LA FORMA DE LAS ESFERAS.....	42
7.5.- EFECTO DEL LA CONCENTRACION DE ALGINATO Y CaCl <sub>2</sub> SOBRE EL DIAMETRO DE LA ESFERA.....	44
7.6.- RESISTENCIA A LA COMPRESION DE LAS ESFERAS.....	45
7.7.- EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO Y CaCl <sub>2</sub> SOBRE LA DIFUSIÓN DE GLUCOSA EN LAS ESFERAS.....	47
7.8.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVICIAL</i> .....	49



7.9.- VIABILIDAD.....	50
8.- CONCLUSIONES.....	53
9.- GLOSARIO.....	56
10.- APENDICE.....	59
11.- BIBLIOGRAFÍA.....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

1.- Productos a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
2.- Aminoácidos a partir de células inmovilizadas.....	10
3.- Ácidos orgánicos a partir de células.....	11
4.- Inmovilización de microorganismos en gel de alginato.....	14
5a.- Condiciones de formación de esferas de alginato.....	24
5b.- Condiciones de formación de esferas de alginato.....	24
6.- Condiciones de evaluación de la absorción de calcio durante la formación de esferas de alginato de calcio .....	25
7.- Condiciones de evaluación de la absorción de calcio en el almacenamiento de esferas de alginato de calcio .....	26
8.- Condiciones de evaluación de la Forma de las esferas de alginato de calcio.....	27
9.- Condiciones de evaluación del diámetro de esferas de alginato de calcio.....	28
10.- Condiciones de evaluación de la resistencia a la compresión de las esferas de alginato de calcio.....	28
11.- Condiciones de evaluación de la difusión de glucosa en las esferas de alginato de calcio.....	29
12.- Composición de la solución de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .....	30
13.- Efecto de la concentración de alginato y calcio sobre la absorción de calcio .....	33
14.- Análisis de varianza...del modelo de regresión.....	35
15.- Absorción ó desorción de calcio durante el almacenamiento.....	37
16.- Análisis de varianza de las condiciones de almacenamiento.....	38

17.- Prueba de Tukey para absorción o desorción de calcio a diferentes concentraciones de alginato y $\text{CaCl}_2$ en el almacenamiento.....	40
18.- Forma de las esferas a diferentes concentraciones de alginato, $\text{CaCl}_2$ y altura de goteo.....	41
19.- Evaluación de la forma de las esferas a diferentes condiciones experimentales.....	42
20.- Evaluación de la forma de las esferas de alginato a diferentes concentraciones de alginato.....	43
21.- Atributos para evaluar la resistencia a la compresión de las esferas.....	46
22.- UFC a diferentes concentraciones de $\text{CaCl}_2$ y células inmovilizadas.....	50

#### ÍNDICE DE GRÁFICAS

1.- Absorción de calcio en la formación de esferas.....	34
2.- Tiempo de estabilización en la absorción de calcio.....	36
3.- Interacción de la concentración de alginato y $\text{CaCl}_2$ de goteo en la absorción/desorción de calcio.....	39
4.- Efecto del $\text{CaCl}_2$ de almacenamiento en la absorción/desorción de calcio.....	40
5.- Efecto de la concentración de alginato sobre el diámetro de esfera.....	44
6.- Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .....	49
7.- UFC/ml de <i>S. cerevisiae</i> inmovilizada en un 10 % en alginato.....	51
8.- UFC/ml de <i>S. cerevisiae</i> inmovilizada en un 15 % en alginato.....	51

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>1.- Estructura de una levadura.....</b>	<b>3</b>
<b>2.- Estructura del alginato de sodio.....</b>	<b>13</b>

**RESUMEN**

En el presente trabajo se realizó la evaluación de las propiedades físicas (forma, diámetro, resistencia a la compresión y difusión) en la formación de esferas de alginato de calcio así como su estabilización en soluciones de  $\text{CaCl}_2$ . Para evaluar dichas propiedades se variaron la concentración de alginato de sodio,  $\text{CaCl}_2$  y altura de goteo. Se determinó la concentración de  $\text{CaCl}_2$  (contraón) para formar las esferas, encontrándose que la absorción de calcio (Ca) es dependiente de la concentración de alginato y de  $\text{CaCl}_2$ , además de que se obtuvo un modelo con el que se puede predecir la cantidad de calcio que puede absorber el alginato durante la formación de esferas.

Se encontró que la forma de las esferas de alginato de calcio depende de la concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  y altura de goteo. Las propiedades de diámetro, difusión y resistencia a la compresión fueron dependientes de la concentración de alginato sin que se demostrara el efecto de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre estas propiedades. Las condiciones de almacenamiento en las que las esferas permanecieron estables fueron a  $4^\circ\text{C}$  en una solución de  $\text{CaCl}_2$  de 0.025, 0.05 y 0.1 M.

Las condiciones iniciales para la inmovilización fueron 2% de alginato, 0.05 y 0.1 M de  $\text{CaCl}_2$  y una altura de goteo de 5 centímetros, en estas condiciones se tiene una forma esférica, un diámetro de  $2.27 - 2.63$  mm, una difusión de  $0.01259 \text{ cm}^2/\text{segundo}$  -  $0.010719 \text{ cm}^2/\text{segundo}$  y buena resistencia a la compresión. Las condiciones de almacenamiento fueron a  $4^\circ\text{C}$  y en una solución 0.025  $\text{CaCl}_2$  M. Bajo estas condiciones se evaluó la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La concentración celular que se inmovilizó fue de 10 y 15 % peso húmedo. Se determinó las UFC/ml de levadura presentes en las esferas de alginato de calcio por un periodo de un mes en intervalos de 1 semana. Se encontró que la viabilidad no se ve afectada por la concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  y la concentración de células inmovilizada.

1.  $\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x) dx = 1$

## 1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LAS LEVADURAS

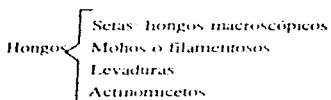
La levadura del género *Saccharomyces* ha sido referida como el microorganismo más antiguo que el hombre ha cultivado. En verdad, la historia de la cerveza, vino y del pan con el uso fortuito de levadura, es tan antigua como la historia del hombre mismo, en años recientes se ha visto la transición de la levadura como el caballo de batalla en los alimentos tradicionales y bebidas industriales y en forma adicional es uno de los organismos seleccionados para efectuar manipulación genética [1].

La levadura se encuentra clasificada dentro del grupo de los hongos que a continuación se describe

### 1.1.1.- Clasificación

Reino Fungae.

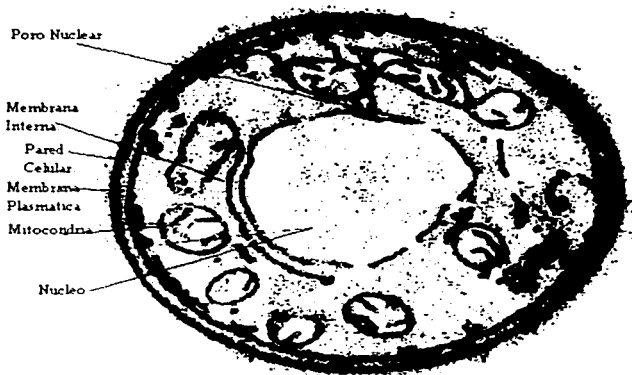
La primera clasificación que surgió fue la empírica, que divide a los hongos en cuatro grupos de acuerdo al aspecto macroscópico que presentan[10].



### 1.1.2.- Características de las Levaduras

Las levaduras son organismos microscópicos que se diferencian de las bacterias por su gran tamaño, que varía de 5 - 8 micras de diámetro, aunque otras pueden llegar incluso hasta las 100 micras de longitud. Son células eucarióticas, presentan diversos grados de localización de funciones en estructuras intracelulares membranosas características llamadas orgánulos celulares (figura 1)

Figura 1. Estructura celular de una levadura<sup>(2)</sup>.



También tienen diferentes formas que varían desde forma de huevo y elongadas hasta esféricas.

Las levaduras pueden crecer dentro de amplios márgenes de pH (3.0 - 3.5 hasta 7.0), en presencia de sacarosa al 55 % o a concentraciones superiores. Estos organismos producen pigmentos, siendo los más comunes el color crema, amarillo, rojo, café y negro.

El principal mecanismo de reproducción asexual en las levaduras es la gemación, aunque algunas especies pueden dividirse por fisión (fisión de las levaduras). Mientras que en la fisión (mecanismo reproductor habitual en la mayor parte de las bacterias) la célula madre se divide en dos células hijas de tamaño aproximadamente igual, en la gemación la célula hija es en principio, mucho menor que la célula madre. Como la yema crece hacia afuera a partir de la célula madre, el núcleo de esta última se divide, y uno de los núcleos



resultantes de tal división pasa a la yema. La pared celular se va estructurando entre la yema y la célula madre y, por último, ambas se separan.<sup>11</sup>

Las células vegetativas fijas y aisladas en general, son inmóviles, rígidas, ovoides o, en ciertas condiciones fisiológicas, más o menos alargadas en forma de hilas. Entre las estirpes de *S. cerevisiae* conservadas en los laboratorios y utilizadas en estudios genéticos, unas se mantienen en haplotise durante el ciclo vegetativo (estirpe hindegen) y otras en diplofase (estirpe *Carlsberg*). Las levaduras de poblaciones industriales están siempre constituidas por una mezcla de las dos formas. En algunos casos (*S. cerevisiae*, var. *ellipsoideus*), las células haploides se distinguen con facilidad por su forma globosa y su menor tamaño, de las células diploides que son elipsoidales. Esta diferencia ha llevado a veces a separarlas, incluyendo en un género distinto (*Zygosaccharomyces*) la forma haploide de una levadura diploide.<sup>11</sup>

Las levaduras en condiciones óptimas tienen una velocidad de crecimiento rápido (20-30 minutos) a temperaturas entre 16 y 18 °C; algunas levaduras se desarrollan de igual manera en presencia o ausencia de oxígeno.

Las levaduras intervienen en el deterioro de alimentos, particularmente los que contienen azúcares, alimentos en salmuera y frutas. Algunas variedades son importantes en la fermentación de bebidas alcohólicas, en la industria pastelera, en la producción de proteínas, y en el tratamiento de aguas residuales.<sup>12</sup>

### 1.1.3.- Géneros de levaduras

- |                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1. <i>Brettanomyces</i> . | 8. <i>Schizosaccharomyces</i> . |
| 2. <i>Candida</i> .       | 9. <i>Torulopsis (torula)</i> . |
| 3. <i>Debaromyces</i> .   | 10. <i>Pichia</i> .             |
| 4. <i>Hansenula</i> .     | 11. <i>Hanseniaspora</i> .      |
| 5. <i>Mycoderma</i> .     | 12. <i>Kloeckera</i> .          |
| 6. <i>Rhodotorula</i> .   | 13. <i>Trichosporum</i> .       |
| 7. <i>Saccharomyces</i> . | 14. <i>Kluyveromyces</i> .      |

**1.2.- SACCCHAROMYCES**

Son levaduras ascospórogénas que producen células alargadas, ovoides o esféricas. Se reproducen por gemación multipolar o por formación de ascas, en la que se encuentran de 1-4 esporas. Este grupo representa a las levaduras de mayor importancia industrial, entre las que se encuentra *S. cerevisiae*, empleada en la elaboración de la cerveza, del pan y en las industrias de la destilación. Estos organismos están ampliamente extendidos en las frutas (especialmente en las uvas) y en las verduras, en las que producen la fermentación de los azúcares con desprendimiento de CO<sub>2</sub> y liberación de etanol. Son levaduras osmófilas (*Saccharomyces rouxi* y *S. melis*) crecen bien en medios con presión osmótica elevada, así como en concentraciones altas de azúcar, sal u otros solutos, dando lugar a alteraciones en productos secos, zumos de frutas concentrados, miel, jarabes de azúcar y otras soluciones fuertemente azucaradas.

Utilizando la levadura no solo se puede obtener etanol sino también otros productos que a continuación se mencionan (tabla 1).

**Tabla 1. Productos producidos por *Saccharomyces cerevisiae*.**

Organismo	Producto	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	17
	Fructuosa, ácido gluconico	17
	Glutacion	7
	Biomasa	

Esta levadura, es de importancia personal tomando en cuenta la aplicación que tiene al aprovechar subproductos de la industria alimentaria como es el caso de la melaza de caña del cual se puede obtener un producto con un valor agregado más alto como es el caso del etanol, de ahí la importancia de obtener un soporte con características adecuadas con el cual posteriormente se pueda aplicar a un sistema fermentativo.

## 2.- INMOVILIZACIÓN

El desarrollo de la sociedad industrializada ha creado una necesidad, que se ha incrementado en los últimos años, esto es, cuantificar el proceso metabólico de microorganismos para que puedan ser explotados más eficientemente. Los beneficios han sido ciertamente más grandes incremento en los productos, de tipo microbiológico, incremento de la velocidad de formación de productos, mantenimiento de las cualidades del producto y uniformidad del proceso.

En el desarrollo de nuevas tecnologías la "inmovilización" ha tenido gran aplicación en el campo de la microbiología. Se ha logrado inmovilizar biocatalizadores tales como enzimas, células microbianas y vegetales, así como organelos.

La inmovilización se define como el proceso por el cual el movimiento de las enzimas, células y organelos se ve restringido en el espacio total o parcialmente.

En la industria se usan frecuentemente enzimas o células inmovilizadas porque estos biocatalizadores se pueden usar en procesos continuos.

El uso de células inmovilizadas en lugar de células libres o enzimas inmovilizadas se ha popularizado recientemente. La forma más útil y empleada de inmovilizar células consiste en atraparlas en un medio gelificado.

## 2.1.- TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN

En los últimos años el número de técnicas disponibles para la inmovilización de enzimas se ha incrementado. Las células (viables o no viables) pueden inmovilizarse de la misma forma que las enzimas, aunque muchos de los métodos empleados con aquellas deben ser modificados y adaptados a la naturaleza de las células.

### 2.1.1.-Atrapamiento

El atrapamiento de células dentro de los espacios intersticiales de una matriz polimérica es uno de los principales métodos empleados, y utiliza los mismos métodos de producción de polímeros.

Entre los polímeros empleados se incluyen la poliacrilamida (D'Souza y Nadkarni, 1980), el alginato (Paul y Vignais, 1980; Larreta Garde, 1979), el gel de sílice (Rouxhet, 1981) y la gelatina (Park, 1980), de entre los cuales los más populares son los geles de polisacáridos debido a que se forman en condiciones suaves.

Sin embargo, el método tiene restricciones en su uso debido a los problemas de difusión existente en las preparación final, aun para reacciones de enzimas celulares que

impliquen tamaños relativamente pequeños de reactivos y productos. Las condiciones suaves de reacción y los efectos estabilizantes no tóxicos de las matrices polisacáridas dan lugar a sistemas de inmovilización de células muy estables que pueden operar a escala de planta piloto para producir materiales con gran potencial en las industrias farmacéuticas y alimentaria por ejemplo la isomaltilosa.

#### **2.1.2.- Adsorción física**

En estado natural, todas las células microbianas se encuentran adsorbidas a los suelos, a los sedimentos de los ríos, a la piel, etc. Tienen la propiedad de que se pueden unir a cualquier superficie con la que estén en contacto y, a la vez, hacer que esta superficie sea activa biológicamente. La adhesión de ciertos tipos de microorganismos puede atribuirse a la formación de *«pseudopodios»* que se unen a la superficie en tanto que otros tipos de células tienen en las paredes capas delgadas de materiales adhesivos que son las que producen la adsorción. Para la inmovilización de células se han utilizado muchos materiales, entre ellos compuestos orgánicos como intercambiadores de iones, cloruro de polivinilo, polipropileno, carbón y astillas de madera, y compuestos inorgánicos como vidrio, cerámica, tierra de diatomeas y acero inoxidable.

#### **2.1.3.- Unión con metales o quelación**

Algunas células se pueden inmovilizar mediante oxihidróxido de titanio (IV) e hidróxido de zirconio "per se" o celulosa activada con óxido de titanio, y se han utilizado en fermentadores a escala planta piloto. El método es suficientemente suave para no causar la disrupción celular, y además se ha demostrado que las células se unen firmemente.

#### **2.1.4.- Enlaces covalentes**

Aunque este método es el más usado en la inmovilización de enzimas debido a que se obtienen materiales con estabilidad operacional alta, no se utiliza mucho para la inmovilización de células por la toxicidad de los reactivos empleados, que en algunos casos pueden destruir tanto la actividad enzimática como la viabilidad de las células (Chiple, 1974). En los casos en los que se obtengan células inmovilizadas activas y viables, el producto no experimenta ninguna limitación por problemas de difusión y el sedimentado de células durante períodos largos de uso podría ser mínimo.

### 2.1.5.- Entrecruzamiento

El método de entrecruzamiento, aunque relativamente suave, tiene el inconveniente de que la toxicidad de los reactivos bifuncionales utilizados para la inmovilización de enzimas es tal, que la viabilidad de este método queda limitado severamente. El procedimiento se ha aplicado a células (*Cibotia* et al., 1974) y emplea glutaraldehído, diaminas diazotizadas y disocianato de tolueno que reaccionan con los grupos amino libre de los peptidoglicanos de las paredes celulares. El entrecruzamiento y el atrapamiento se han utilizado en forma combinada para inmovilizar células mediante glutaraldehído y alginato o poliacrilamida (Ziomek et al., 1982).

Se ha desarrollado un método más suave y menos tóxico basado en el entrecruzado físico por floculación, que da lugar a una concentración de células elevada por unidad de volumen, empleando para ello varios agentes de floculación (Lee y Long, 1974; Long, 1976), entre los que se incluyen polielectrolitos catiónicos como poliaminas, polietilamina y poliacrilamidas catiónicas, polielectrolitos aniónicos como poliacrilamidas carboxil sustituidas, sulfonatos de poliestireno y ácidos policarboxílicos y sales metálicas como los óxidos, hidróxidos, sulfatos y fosfatos de magnesio (II), calcio (II), hierro (II) y manganeso (II).<sup>14</sup>

### 2.2.- APLICACIONES

La inmovilización ha sido caracterizada como una técnica que es aplicada a la producción o degradación de compuestos para lo cual se han inmovilizado células de microorganismo o de vegetales y enzimas.

Muchos métodos de inmovilización han sido desarrollados para inmovilizar células microbianas, y en forma adicional se han corrido sistemas continuos inmovilizados con lo que se ha tenido la necesidad de incluir el escalamiento de reactores y procesos a nivel laboratorio. Grandes avances se han hecho en la utilización de células de plantas inmovilizadas para la producción de químicos útiles y muchos trabajos se han realizado para el perfeccionamiento de la inmovilización de biocatalizadores de plantas para la producción de componentes naturales en alimentos y aditivos via cultivo de tejidos de plantas. Se ha desarrollado un gran campo en la inmovilización de enzimas, lo que ha llevado a tener una gran variedad de enzimas inmovilizadas por diferentes métodos.<sup>15</sup>

### 2.2.1.- Aplicaciones de células inmovilizadas

#### 2.2.1.1.- Producción de aminoácidos

Los aminoácidos son ampliamente usados en los alimentos, medicina e industrias cosméticas y también como materias iniciadoras para síntesis química. En los alimentos tiene aplicaciones nutricionales, solamente los L- aminoácidos son activos.

Las células se han aplicado ampliamente en este ramo, a continuación se da una tabla de aplicaciones: (6,8)(7)

Tabla 2. Aminoácidos producidos por microorganismos<sup>(6)</sup>

Microorganismo	Substrato	Producto
<i>Aspergillus ochraceus</i>	N- Acetyl DL- metionina	L- Metionina
<i>E. Coli</i>	Fumarato de amonio	L- aspartato
<i>Erwinia herbicola</i>		Tirosina

#### 2.2.1.2.- Producción de antibióticos

Pocos estudios han sido publicados sobre la utilización de células inmovilizadas para su producción. Algunos antibióticos son penicilina G, cefalosporina C, bacitracina, nomicina, ampicilina y candocon<sup>(6,7,11)(14)</sup>

#### 2.2.1.3.- Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son ampliamente usados en alimentos y medicina, algunos son producidos por fermentación convencional. La inmovilización de células microbianas es ocasionalmente utilizada para mejorar la productividad. Los ácidos orgánicos producidos se enlistan en la tabla 3<sup>(6)(17)(18)</sup>

Tabla 3: Ácidos orgánicos producidos por células<sub>(6)</sub>.

Microorganismo	Substrato	Producto
Micrococcus	L-Histidina	ácido Uromico
Brevibacterium ammoniapens	Acido Fumárico	ácido L-Malaico
Penicillium cyaneofulvum		ácido Fityrbico
Lactobacillus delbrückii	Glucosa	ácido Láctico

#### 2.2.1.4.- Producción de saborizantes y aromatizantes

Estos tienen su mayor aplicación en el área de alimentos, uno de los desarrollos en esta área es la utilización de guanosina, adenosina e inosina proveniente de las levaduras, los cuales actúan como aromatizantes y saborizantes útiles que potencian el efecto sobre el aroma y sabor del glutamato monosódico cuando se añade en cantidades equimolares<sub>(18)</sub>.

#### 2.2.1.5.- Otros productos

Se puede obtener etanol, etileno, oxígeno, Coenzima A y electricidad<sub>(10)</sub>. Células de la planta *Asclepias syriaca* se ha utilizado para obtener proteasas, la producción de glucosa isomerasa se ha logrado a partir de *Actinoplanes missouriensis*, así como la producción de B- galactosidasa (lactasa) a partir de *Saccharomyces lactus*, mohos como *Aspergillus niger* u *oryzae*, o bacterias como *Escherichia coli*<sub>(15)</sub>.

#### 2.2.2.- Elección del método de inmovilización

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a muchos biocatalizadores, en la actualidad se reconoce que no existe un método universal, debido a las distintas características químicas y composición de los mismos, a las distintas propiedades de los sustratos y productos y a los diversos usos del producto. Por tanto, para cada aplicación de cada biocatalizador inmovilizado es necesario encontrar un procedimiento sencillo y barato con el que se obtenga un producto que conserve la actividad y que tenga una estabilidad operacional elevada. No obstante, a partir de la gran cantidad de información que existe acerca de las características de los soportes y de los efectos de los métodos utilizados, se pueden obtener generalizaciones utilizables como base para



seleccionar un método para un caso específico, aunque sin garantía de éxito, por lo que a veces hay que probar diversos métodos hasta encontrar el más apropiado (18).

Criterios para seleccionar el material de soporte para inmovilizar células microbianas (16) (17).

- 1) Alta actividad.
- 2) Disponibilidad en cantidad.
- 3) Bajo costo de inmovilización.
- 4) Fácil escalamiento de operación.
- 5) Fuerza mecánica para larga vida de operación.

En teoría el método debería ser suave, de forma de no desnaturalizar ninguna de las actividades enzimáticas útiles de las células. Por tanto, debe evitarse la generación de calor, los cambios de pH, o la presencia de radicales libres durante el proceso de inmovilización. El método de inmovilización debe ser permanente, seguro, barato, simple, versátil y fácil de aumentar de escala, y los reactivos no deben ser tóxicos, y además deben facilitar las aplicaciones a gran escala (18).

### 2.3.- SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN

En la inmovilización de biocatalizadores se han utilizado una gran variedad de soportes, ya sea de tipo orgánico o inorgánico y para cada aplicación se selecciona el soporte específico especializado. Se han utilizado una gran variedad de soportes para inmovilizar células. Como ejemplos se pueden mencionar la pectina, acrilamida, quitosán, carragenina y alginato de sodio.

#### 2.3.1.- Alginato como soporte

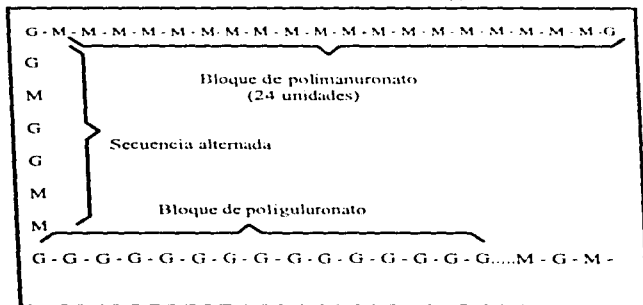
##### 2.3.1.1.- Fuentes y estructura de alginato

Hay varias fuentes comerciales de ácido algínico, principalmente de las algas *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria Ascophylum*, que se encuentra en las costas de USA, Europa, Japón, América del Norte Este, y Británicas.

El ácido algínico es un copolímero de Beta-D- Ac. Manurónico y Alfa-L-Ac. Gulurónico y enlaces glucosídicos 1-4, la fracción de cada ácido depende de la fuente de obtención. Este es extraído por digestión de la alga marina con hidróxido de sodio para producir una

solución diluida de alginato de sodio la cual puede ser filtrada para remover las partículas madre y purificarla después (figura 2).

Figura 2. Estructura Secundaria del ácido alginico<sub>(8)</sub>.



Algunos lotes de alginato de sodio retienen aroma marino distinto, algunas veces se vendía el resto como ácido alginico, alginato de amonio o propilen glicol, el ester de propilen glicol de ácido alginico. Algunos como alginato de calcio, potasio y magnesio, pueden ser removidos por diálisis de soluciones de alginato con 1% p/v NaCl + 1% p/v tetrasodio EDTA seguido de agua desionizada. Para un gel resistente se requieren altos contenidos de L-guluronato.

Para la inmovilización de células es más práctica la formación de esferas de alginato de calcio por goteo de alginato en una solución de sal de calcio. En estas circunstancias la gelación es instantánea, con precipitación de alginato de calcio en la superficie de goteo. Se tiene una gradual gelación en el interior conforme los iones de calcio se difunden apartir de la solución<sub>(8)</sub>.

### 2.3.1.2.- Formación de partículas de alginato

La suspensión de células en el alginato de calcio es goteada en una solución de  $\text{CaCl}_2$  (0.1 M) con ayuda de una bomba peristáltica con un tubo de 1 mm de diámetro.

Las esferas podrán ser retiradas de la solución después de 20 minutos y preferiblemente después de 1 hora, para dejar que la gelificación se efectúe adecuadamente. El atrapamiento físico en soportes poliméricos es indudablemente la técnica más exitosa usada para células completas. Es bastante simple de preparar y se obtiene una red completamente con las células retenidas, que es bastante porosa para el transporte de sustrato y producto<sub>s</sub>.

### 2.3.1.3.- Aplicaciones del alginato como soporte

El alginato de calcio ha sido utilizado como soporte en la inmovilización de varios microorganismos; a continuación se tiene una lista de aplicaciones (tabla 4)

Tabla 4. Microorganismos que se han inmovilizado en gel de alginato<sub>6</sub>.

Polímero	Organismo	Producto o conversión
Alginato de Calcio	<i>Mycobacterium</i>	Oxido de etileno
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	$\text{NH}_4^+$ a $\text{NO}_2^-$
	<i>Methanovarenum barkeri</i>	Metanol a metano
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Azúcar reducido

### 2.3.1.4.-Ventajas y desventajas del alginato como soporte

Desde el punto de vista de las propiedades físicas del alginato se han enlistado una serie de ventajas que se han observado al utilizar el alginato como soporte de inmovilización, las cuales son las siguientes:

- La formación de el gel es un proceso reversible. Por lo tanto, se debe de tener cuidado en la composición del medio de reacción con el biocatalizador.
- La estabilidad mecánica de las partículas es buena y excelente con relación a columnas empacadas y con agitación normal (lecho fluidizado)

- La formación de esferas regulares, incluyendo el control del tamaño de partícula, es fácil. Alguna otra geometría puede ser producida.
- El método de inmovilización es suave con lo que las células viables de muy diferente origen pueden ser efectivamente atrapadas.
- El gel puede resistir temperaturas elevadas.
- El sustrato y el producto se difunden con resistencia mínima.

### 2.3.2.- Importancia de las características físicas del gel de alginato

Las características seleccionadas con el objetivo de mantener las células atrapadas y la viabilidad de la levadura *saccharomyces cerevisiae* fueron el diámetro de esfera, difusión, forma y resistencia a la compresión.

La importancia se debe a que cuando una célula o enzima esta inmovilizada la velocidad de reacción esta gobernada por la velocidad de difusión de las moléculas de sustrato, cuya descripción responde a la ley de Fick la cual esta representada por la siguiente expresión matemática:

$$D = dS/dX$$

- donde: **D** = difusión (cm<sup>2</sup>/segundo)  
**X** = radio de la partícula  
**S** = concentración del sustrato

El radio de la partícula es determinante en la difusión de sustrato en la misma dado que las restricciones a la transferencia de la masa disminuyen a medida que disminuye el tamaño de partícula. Lo que representa una gran ventaja ya que permite que el sustrato y producto puedan ser liberados de las esferas con catalizador inmovilizado con mayor rapidez, además de que esto incrementa el área superficial con respecto a un volumen específico.

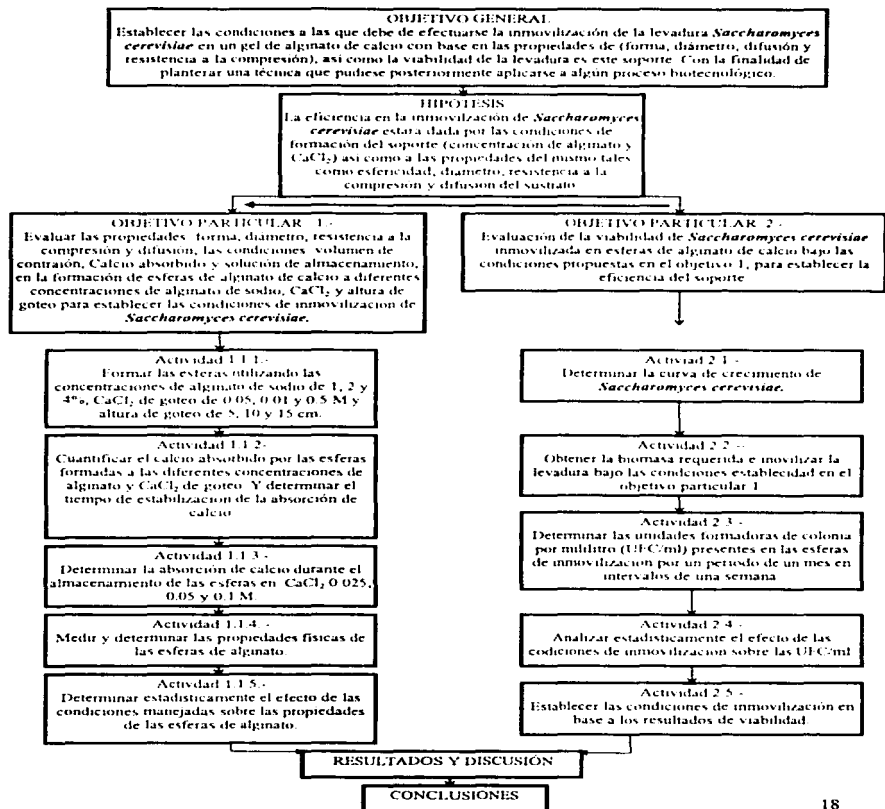
La abrasión, compresión de las partículas y la obstrucción del sistema (bioreactor) son fenómenos que se presentan y dependen de la forma de la partícula de biocatalizador inmovilizado y de la resistencia a la compresión.

La forma de partícula provoca que los fenómenos de abrasión aumenten cuando se utilizan partículas de forma irregular, dicho fenómeno puede ser controlado utilizando

partículas en forma esférica, lisas y con el aumento de la resistencia de las partículas de soporte.

La compresión de las partículas de biocatalizador en los bioreactores se produce cuando se genera en la columna una caída de presión excesiva debido a la fricción entre el fluido y las partículas de soporte o por bloqueo parcial del relleno por sólidos. La compresión aumenta cuando se tiene partículas de forma irregular o por que las partículas han estado sujetas a fuerzas relativamente pequeñas durante largos periodos lo que provoca que no resulten fracturada a menos que se ejerza una fuerza repentina muy elevadas, pero se deforman viscoelásticamente de tal forma que los espacios interpartículas de la columna se van perdiendo provocando finalmente una compresión. La compactación puede minimizarse usando soportes cuyas partículas sean relativamente grandes, incompresibles, lisas, esféricas. Con lo que se puede concluir que para obtener un sistema inmovilizado con una alta actividad catalítica se deben de conocer y evaluar las características físicas del soporte de inmovilización,  $R_{\text{cat}}$  (10).









#### 4.1.- OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones a las que debe de efectuarse la inmovilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un gel de alginato de calcio con base en las propiedades de (forma, diámetro, difusión y resistencia a la compresión), así como la viabilidad de la levadura en este soporte. Con la finalidad de plantear una técnica que pudiese posteriormente aplicarse a algún proceso biotecnológico.

#### 4.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1.- Evaluar las propiedades (forma, diámetro, resistencia a la compresión y difusión), las condiciones (volumen de contracción, Calcio absorbido y solución de almacenamiento) en la formación de esteras de alginato de calcio a diferentes concentraciones de alginato de sodio,  $\text{CaCl}_2$  y altura de goteo para establecer las condiciones de inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2.2.- Evaluación de la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en esteras de alginato de calcio bajo las condiciones propuestas en el objetivo 1 para establecer la eficiencia del soporte

**5. HIPÓTESIS**

La eficiencia en la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* estará dada por las condiciones de formación del soporte (concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$ ) así como a las propiedades del mismo tales como esfericidad, diámetro, resistencia a la compresión y difusión del sustrato.

La eficiencia en la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* estará dada por las condiciones de formación del soporte (concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$ ) así como a las propiedades del mismo tales como esfericidad, diámetro, resistencia a la compresión y difusión del sustrato.



**6.1.- FORMACIÓN DE ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.**

Un volumen de 50 ml de una solución de alginato de sodio de diferentes concentraciones fueron goteadas a través de una aguja hipodérmica con una bomba peristáltica. Las soluciones de alginato (1,2 y 4%) se dejaron gotear desde diferentes alturas (5,10 y 15 cm) en soluciones de cloruro de calcio de diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.5 M) con agitación magnética (tablas 5a y 5b).

**Tabla 5a. Condiciones a las que se formaron las esferas de alginato calcio.**

Alginato %	CaCl <sub>2</sub> de goteo [M]	Altura de goteo (cm)
1	0.05	5
2	0.1	10
4	0.5	15

Los volúmenes utilizados de las soluciones de CaCl<sub>2</sub> para las diferentes concentraciones de alginato se presentan en la tabla 5b.

**Tabla 5b. Volumen de CaCl<sub>2</sub> para cada concentración de alginato de sodio utilizada para formar esferas.**

Alginato %	Volumen de alginato de sodio (ml)	Volumen de CaCl <sub>2</sub> de goteo (ml) 0.05, 0.1, 0.5 [M]
1	50	50
2	50	100
4	50	200

## 6.2.- DETERMINACIÓN DE CALCIO ABSORBIDO POR ESFERAS FORMADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO DE SODIO Y $\text{CaCl}_2$ .

Una vez que se terminó de gotear el alginato en la solución de  $\text{CaCl}_2$  con la que se formaban las esferas de alginato, fueron mantenidas en ésta solución por un periodo de 2.20 horas, durante este tiempo se tomaron alícuotas de la solución de  $\text{CaCl}_2$  en intervalos de 30 minutos para determinar la concentración de calcio de dicha solución.

La determinación de Calcio absorbido por el alginato de sodio se efectuó por medio de una titulación con EDTA, que consistió en tomar una alícuota de un mililitro de solución de  $\text{CaCl}_2$  a la cual se le agregaron 10 ml. de agua destilada y 3 ml. de solución amortiguadora de pH 10 para posteriormente titular dicha mezcla con una solución de EDTA a una concentración de 0.0016 M. Finalmente conociendo la concentración inicial y final de la solución de  $\text{CaCl}_2$  en donde se goteó el alginato de sodio, se procedió a realizar los cálculos para determinar la cantidad de Calcio (Ca) absorbido por el alginato de sodio<sup>(1)</sup>.

Las concentraciones experimentales en las que se evaluó el calcio absorbido fueron: alginato de sodio 1, 2 y 4 % y  $\text{CaCl}_2$  0.05, 0.1 y 0.5 M (tabla 6)

**Tabla 6. Concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  en la absorción de calcio.**

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ de goteo [M]
1	0.05 0.1 0.5
2	0.05 0.1 0.5
4	0.05 0.1 0.5

Se evaluó el efecto de la concentración de alginato y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre la cantidad de Calcio absorbido mediante un análisis de varianza, con un experimento factorial  $3 \times 3$  completamente aleatorio con 9 repeticiones. Y se obtuvo el comportamiento de la absorción de calcio con respecto a las concentraciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$  de goteo aplicando un análisis de regresión múltiple.

### 6.3.- DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CALCIO DURANTE LA FORMACIÓN DE ESFERAS.

El tiempo necesario que deben permanecer las esferas de alginato de calcio en la solución de  $\text{CaCl}_2$  de goteo fue obtenido con base a la determinación de calcio absorbido con respecto al tiempo. El análisis de calcio absorbido fue hecho cuantificando el  $\text{CaCl}_2$  residual de la solución original de goteo<sub>11</sub>. Se aplicó el análisis de desviación estandar para obtener el intervalo de tiempo de estabilización.

### 6.4.- ABSORCIÓN DE CALCIO DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE ESFERAS.

Una vez formadas las esferas de alginato de calcio en la solución de goteo estas fueron pasadas a una solución de  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento donde permanecieron durante una hora en refrigeración a 4 °C. Durante la primera hora de almacenamiento se tomaron alícuotas de la solución de calcio en intervalos de 10 minutos para determinar la concentración de calcio en la solución.

La determinación de Calcio absorbido por el alginato de sodio se efectuó por medio de una titulación con EDTA, que consistió en tomar una alícuota de un mililitro de solución de  $\text{CaCl}_2$  a la cual se le agregaron 10 ml. de agua y 3 ml. de solución amortiguadora de pH 10 para posteriormente titular dicha mezcla con una solución de EDTA a una concentración de 0.0016 M. Finalmente conociendo la concentración inicial y final de la solución de  $\text{CaCl}_2$  se procedió a realizar los cálculos para determinar la cantidad de Calcio absorbido por el alginato de sodio durante el almacenamiento de las esferas de alginato de calcio<sub>11</sub>.

Se utilizaron las concentraciones de alginato de sodio de 2 y 4 %,  $\text{CaCl}_2$  de goteo 0.05, 0.1 y 0.5 M y  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento 0.025, 0.05 y 0.1 M para evaluar su efecto sobre la absorción de Calcio durante el almacenamiento (tabla 7).

Tabla 7. Concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  de goteo y  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento, en la absorción de calcio durante el almacenamiento de esferas de alginato

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ de goteo [M]	$\text{CaCl}_2$ de almacenamiento [M]
2	0.05	0.025
	0.1	0.05
4	0.05	0.025
	0.1	0.05



Se evaluó el efecto de la concentración de alginato de sodio y concentración de  $\text{CaCl}_2$  de goteo y almacenamiento sobre la cantidad de Calcio absorbido por las esferas de alginato de calcio durante el almacenamiento. Este efecto se valoró utilizando el análisis de varianzas y prueba de Tukey. Se efectuó un experimento factorial  $2 \times 3 \times 3$  con 3 repeticiones.

#### 6.5.- FORMA DE LAS ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.

A las esferas se les evaluó cualitativamente la forma dando los siguientes atributos: forma regular (esférica) e irregular (ovales, filamentos etc.). Se determinó si la concentración de alginato (1,2 y 4 %),  $\text{CaCl}_2$  de goteo (0.05, 0.1 y 0.5 M) y altura de goteo (5, 10 y 15 cm) tenían algún efecto sobre dicha propiedad. Las condiciones a las que se trabajó están indicadas en la tabla 8.

**Tabla 8.** Concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  de goteo y altura de goteo en la evaluación de la forma de esfera

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ [M]	Altura de goteo (cm)
1	0.05 0.1 0.5	5 10 15
2	0.05 0.1 0.5	5 10 15
4	0.05 0.1 0.5	5 10 15

#### 6.6.- DIÁMETRO DE ESFERA DE ALGINATO DE CALCIO.

Se seleccionó en forma aleatoria una muestra de 10 esferas de cada lote elaborado y se midió el diámetro de la esfera con un vernier. Se analizaron los efectos de la concentración de alginato (2 y 4%), la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de goteo (0.05, 0.1 y 0.5 M), la altura de goteo (5,10 y 15 cm) y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento (0.025, 0.05 y 0.1 M), sobre el diámetro de las esferas, aplicando el análisis de varianzas y utilizando un arreglo factorial  $2 \times 3 \times 3 \times 3$  con un diseño completamente aleatorio (tabla 9).

Tabla 9. Concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  de goteo, altura de goteo y  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento en la evaluación del diámetro de esfera.

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ de goteo [M]	Altura de goteo (cm)	$\text{CaCl}_2$ de almacenamiento [M]
2	0.05	5	0.025
	0.1	10	0.05
4	0.5	15	0.1

#### 6.7.- RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN DE LAS ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.

La resistencia a la compresión de las esferas se llevó a cabo mediante una evaluación sensorial, se tomaron esferas al azar de cada lote y éstas fueron presionadas con los dedos hasta lograr deformarla o romperla, según fuera el caso. Los atributos evaluados fueron: centro líquido o duro, pérdida de forma, rompimiento<sub>13</sub>.

Se observó si la resistencia a la compresión depende de las concentraciones de alginato (1, 2 y 4) y las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (0.05, 0.1 y 0.5 M) (tabla 10).

Tabla 10. Relación alginato y  $\text{CaCl}_2$  de goteo para evaluar resistencia a la compresión.

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ de goteo [M]
1	0.05 0.1 0.5
2	0.05 0.1 0.5
4	0.05 0.1 0.5

**6.8.- DIFUSIÓN DE GLUCOSA EN LAS ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO.**

Se tomó al azar una determinada cantidad de esferas de alginato de calcio de cada lote, se eliminó el exceso de cloruro de calcio y se colocaron en un tubo que contenía 2 ml de glucosa al 0.05 %. Se mantuvo en agitación moderada por 4 minutos y posteriormente se tomó una alícuota de 10 microlitros de la solución de glucosa del tubo para hacer la determinación de glucosa por el método de la *O*-toluidina. Se evaluó el efecto de la concentración de alginato (2 y 4 %) y  $\text{CaCl}_2$  (0.05, 0.1 y 0.5 M) sobre la difusión de glucosa aplicando el análisis de varianza, utilizando un diseño factorial 3x2 con arreglo en 2 bloques al azar (tabla 11).

**Tabla 11. Relación alginato y  $\text{CaCl}_2$  de goteo para evaluar la difusión de glucosa en esferas de alginato de calcio.**

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ [M]
2	0.05 0.1 0.5
4	0.05 0.1 0.5

**6.9.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

La curva de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* se determinó siguiendo la metodología que a continuación se describe: una colonia de levadura fue inoculada en un matraz erlenmeyer conteniendo 40 ml del medio que se describe en la tabla 12 (3) para posteriormente ser incubada por 12 horas a una temperatura de 30 °C con agitación a 200 rpm. Posteriormente con este inóculo se sembró un matraz de 500 ml conteniendo 360 ml del mismo medio y bajo las mismas condiciones de incubación. A partir de la primera hora se fueron tomando alícuotas para determinar en peso seco el crecimiento de la levadura. Con los datos obtenidos de peso seco y el tiempo se construyó la curva de crecimiento del microorganismo y fue determinado el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento.

Tabla 12. Composición del medio de cultivo para efectuar la cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Composición	Cantidad
Extracto de levadura	7.5 g
Glucosa	100 g
Peptona de caseína	7.5 g
Solución mineral	50 mililitros
<b>Composición de la solución mineral para preparar 1 litro.</b>	
$KH_2PO_4$	30 g
$NH_4Cl$ 30 g Kcl	23 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	13 g
$MnSO_4 \cdot 6H_2O$	0.5 g
$Zn(NO_3)_2$	2 g

#### 6.10.- OBTENCIÓN DE LA BIOMASA.

Una vez que se determinó la curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se procedió a sembrar 360 ml de medio de cultivo ya descrito con un inoculo de 40 ml de medio con levadura. El tiempo de incubación fue de 12 hr. tiempo en el cual se alcanza el máximo de células de levadura, las cuales fueron separadas a 5000 rpm durante 15 min. en una centrifuga a 4 °C.

#### 6.11.- MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN.

De acuerdo a los resultados de las propiedades de las esferas de alginato y las condiciones de formación de las esferas se propuso el siguiente método de inmovilización. Se mezclaron 10 a 15 g de levadura obtenida por centrifugación de un cultivo en fase logarítmica, en peso húmedo con 100 mililitros de alginato al 2 % estéril, dicha mezcla fue agitada continuamente para mantener las células dispersas en el alginato. El siguiente paso fue gotear la mezcla através de una aguja hipodérmica con ayuda de una bomba peristáltica.

La mezcla se goteó en la solución de  $CaCl_2$  a las concentraciones de 0.05 y 0.1 M. La relación de mezcla (células-alginato) fue de 10 ml en 20 ml de  $CaCl_2$ , una vez formadas

las esferas de levadura inmovilizada, estas fueron almacenadas en 20 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.025 M a una temperatura de 4 °C por un mes.

#### **6.12.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD.**

Se pesaron 0.5 g de esferas de alginato en las cuales la levadura ya había sido inmovilizada bajo las condiciones establecidas, dichas esferas fueron molidas en un mortero pequeño estéril, el cual contenía 4.5 ml de solución fisiológica. Posteriormente se hicieron diluciones decimales con solución fisiológica y se determinó UFC / ml. Para determinar si la viabilidad de la levadura depende de la concentración de células, concentración de alginato y concentración de  $\text{CaCl}_2$ . Se utilizó un experimento con arreglo factorial  $2 \times 2$  en 2 bloques al azar con repetición, y se aplicó el análisis de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1.- DETERMINACIÓN DE CALCIO ABSORBIDO POR ESFERAS FOR MADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO Y $\text{CaCl}_2$

La cantidad de calcio absorbido por las esferas de alginato de calcio se evaluó bajo diferentes concentraciones de alginato (1,2 y 4 %) y  $\text{CaCl}_2$  de goteo (0.05, 0.1 y 0.5 M) (tabla 13).

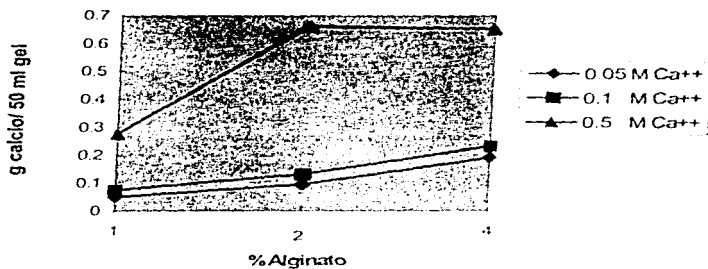
Tabla 13. Efecto de la concentración de Alginato y  $\text{CaCl}_2$  sobre la absorción de Calcio.

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ [M]		
	0.05	0.1	0.5
1	0.049 g	0.075864 g	0.27426 g
2	0.09525 g	0.132019 g	0.660094 g
4	0.19015 g	0.23653 g	0.6506 g

\*Los datos están expresados como gramos de  $\text{Ca}^{2+}$  absorbido por 50 ml de gel.

Como se puede observar en la gráfica 1, al usar las concentraciones 0.05 y 0.1 M de  $\text{CaCl}_2$ , el calcio absorbido fue mayor al aumentar la concentración de alginato de sodio, esto no se observó con la concentración de  $\text{CaCl}_2$  0.5 M en donde se obtuvo un efecto de saturación, es decir, al aumentar la concentración de alginato del 2 al 4 %, no se produjo una mayor absorción de calcio.

**Gráfica 1. Absorción de Calcio en la formación de esferas**



Esto lo demuestra el análisis de varianza, en el que se encontró un efecto significativo de la interacción entre la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y la concentración de alginato ( $p$  menor a 0.05), sobre la absorción de calcio. Lo cual significa que el efecto de la concentración de alginato depende de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , por ello el efecto de saturación solo se observa en la concentración 0.5 M. Debido a que las variables independientes (concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$ ) son ambas cuantitativas, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para describir la relación entre el Calcio absorbido y las concentraciones de alginato y de  $\text{CaCl}_2$  (tabla 14).

La ecuación de regresión que se obtuvo fue:

$$y = -3.465 + 0.436x_1 + 4.384x_2 - 0.347x_1x_2$$

donde:  $y$  = log. Calcio absorbido,  $x_1$  = concentración de alginato,  $x_2$  = concentración de  $\text{CaCl}_2$ .



La ventaja de los modelos de regresión es poder hacer predicciones sobre la cantidad de calcio que se absorberá en condiciones no probadas experimentalmente. Además de predecir en que momento se puede llegar a la saturación del alginato con el calcio (Ca)

Según Cheetman y Blun (1979) reportan que la cantidad de Calcio absorbido permanece constante y es independiente de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y del volumen de  $\text{CaCl}_2$  utilizado, con lo que propusieron la utilización de una solución con exceso de calcio<sub>0,12</sub>. Además no varían la concentración de alginato ni de la concentración de la solución de  $\text{CaCl}_2$ , utilizaron un volumen de 20 ml de alginato de sodio a concentración de 1% y un volumen de 100 mililitros de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 0.1 M a una temperatura de 20°C y obtuvieron una cantidad de Calcio absorbido de 0.065 gramos/ gramo de gel seco, de acuerdo al modelo de regresión obtenido en este trabajo y utilizando las condiciones de Cheetman y Blun deberían haber obtenido 0.072 gramos

El estudio de la absorción de calcio por estos autores se realizó manejando sólo una concentración de alginato (1%), una concentración de  $\text{CaCl}_2$  (0.1M), mientras que la ecuación obtenida en este trabajo es el resultado del estudio de diferentes concentraciones de alginato (1, 2 y 4),  $\text{CaCl}_2$  (0.05, 0.1 y 0.5 M) lo que hace que el comportamiento de la absorción de calcio pueda ser predecible bajo determinadas condiciones con un margen de error bajo. Dado que se demostró que la absorción de calcio por las esferas de alginato depende de la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  dado que se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.94 y el comportamiento de la absorción de calcio en relación a las concentraciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$  representado por el coeficiente de correlación fue de 0.97 (tabla 14).

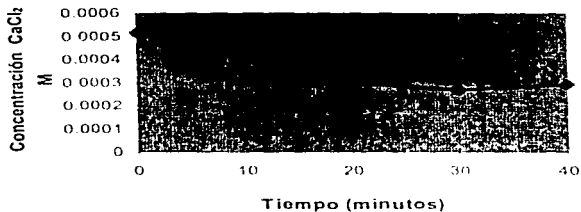
**Tabla 14. Resumen del análisis de varianza del modelo de regresión propuesto.**

N= 81	Beta	p	r	r2
Intercepto	-3.4647	0.000000	0.97	0.94
Alginato	0.4353	0.000000		
Calcio	4.3885	0.000000		
V1V2	-0.387	0.000052		

### 7.2.- TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CALCIO.

El tiempo de estabilización se refiere al tiempo requerido en que las esferas de alginato dejan de absorber calcio de la solución de  $\text{CaCl}_2$  donde fueron formadas éstas. El comportamiento que presenta dicha absorción con respecto al tiempo se esquematiza en la gráfica 2.

**Gráfica 2. Tiempo de estabilización de la absorción de calcio**



En el análisis de desviación estandar se obtuvo un tiempo de estabilización promedio de 23.4647 minutos con un intervalo al 95 % de confianza de [20.78, 26.15] minutos. Este resultado es parecido al reportado por Cheetman y Blunt que es de 25 minutos, aunque estos autores recomiendan una hora para asegurar que se absorba todo el calcio posible.

Dado los resultados obtenidos del tiempo de estabilización se recomendaría un tiempo de 30 minutos como suficiente para que se efectúe la estabilización en la absorción de calcio en forma adecuada.

**7.3.- ABSORCIÓN DE CALCIO DE LA SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO**

Una vez elaboradas las esferas, estas fueron almacenadas en una solución de  $\text{CaCl}_2$  a las concentraciones de 0.025, 0.05 y 0.1. El calcio absorbido a partir de la solución de almacenamiento se expresa en la tabla 15. Los datos de calcio absorbido son los promedios de 3 mediciones hechas en las esferas producidas en las condiciones que se especifican en la tabla 15.

**Tabla 15. Absorción o desorción de Calcio durante el almacenamiento, a diferentes concentraciones de alginato,  $\text{CaCl}_2$  de goteo y  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento.**

$\text{CaCl}_2$ M goteo	$\text{CaCl}_2$ M almacenamiento	% alginato	
		2	4
.05	0.025	0.0097	0.01138
0.05	0.05	0.02886	0.02604
0.05	0.1	0.0468	0.08828
0.1	0.025	-0.01685	-0.0235
0.1	0.05	-0.002916	-0.01107
0.1	0.1	0.0176	0.01429
0.5	0.025	-0.1185	-0.27456
0.5	0.05	-0.1499	-0.27614
0.5	0.1	-0.0925	-0.519

\*Los datos estan expresados como gramos de Calcio de absorción/ desorción durante el almacenamiento por 50 ml de gel en forma de esfera.

\*\*Signo negativo [-] denota desorción ó liberación de calcio de la esfera al medio de almacenamiento.

Al realizar el análisis de varianza se encontraron los siguientes resultados que se enlistan en la tabla 16.

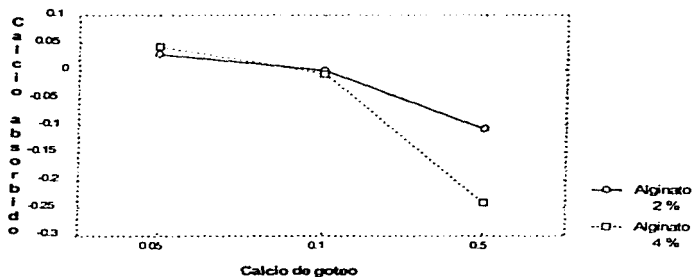
**Tabla 16. Resumen del análisis de varianza para ver el efecto de la concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  de goteo y  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento sobre la absorción de calcio durante el almacenamiento.**

<b>Efectos Designados</b>				
	1*Alginato	2-Calcio en el goteo	3-Calcio de almacenamiento	
<b>Efectos</b>	<b>gl Efecto</b>	<b>MS Efecto</b>	<b>F</b>	<b>Nivel p</b>
1	1	0.024064	19.5420	0.000087 *
2	2	0.223256	181.3014	0.000000 *
3	2	0.013126	10.6593	0.000231 *
12	2	0.028892	23.4625	0.000000 *
13	2	0.003172	2.5758	0.090050
23	4	0.001856	1.5075	0.220577
123	4	0.001383	1.1234	0.360774
Error	36	0.001231		

La concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  de goteo (0.05, 0.1 y 0.5) y  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento (0.025, 0.05 y 0.1 M) tuvieron un efecto significativo sobre la absorción y desorción de calcio de las esferas. Se obtuvo una interacción alginato y concentración de  $\text{CaCl}_2$  de goteo altamente significativa ( $p$  menor a 0.05).

El comportamiento de dicha interacción se presenta en la gráfica 3.

Gráfica 3. Absorción/desorción de calcio.  
Interacción Alginato y  $\text{CaCl}_2$  de goteo



Si las esferas se formaron con bajas concentraciones (0.05 y 0.1 M) de  $\text{CaCl}_2$ , sin importar a las 2 diferentes concentraciones de alginato utilizada, la desorción o absorción de Calcio en la solución de almacenamiento es muy pequeña con un promedio de 0.015 gramos y un intervalo de [ 0.00722, 0.02274] gramos de calcio.

Si se utiliza una concentración 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$  para formar las esferas la desorción de Calcio es mayor a medida que aumenta la concentración de alginato utilizada, es decir con una concentración al 4% de alginato hay una desorción significativamente mayor que la que hay cuando se utiliza alginato al 2%.

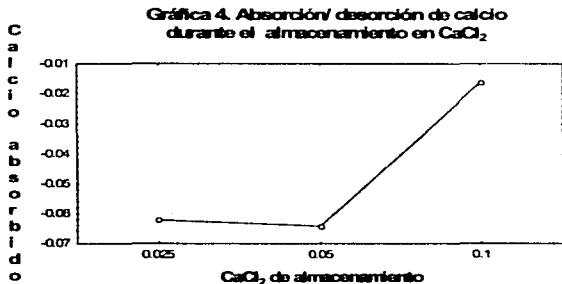
Se demostró la diferencia estadística entre estas medias utilizando la prueba de Tukey, (tabla 17).

Tabla 17. Prueba de tukey para comparar los promedios obtenidos de absorción/desorción de calcio durante el almacenamiento obtenido a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y alginato.

# Promedio	1	2	4	5	3	6
% Alginato	2	2	4	4	2	4
$\text{CaCl}_2$ [m] gotico	0.05	0.1	0.05	0.01	0.5	0.5
Valor promedio	0.03	0	0.04	-0.01	-0.11	-0.24

\*\*La línea punteada une a los promedios entre los cuales no hay diferencia significativa.

En la gráfica 4 se presenta el efecto de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento sobre la desorción de calcio.



Durante el almacenamiento la desorción disminuye a medida que se aumenta la concentración de  $\text{CaCl}_2$ . La disminución se puede deber a que el gradiente de concentración de Calcio entre la esfera y la solución de almacenamiento es menor por lo que la esfera libera menor cantidad de calcio.

18. Aplicando la prueba de Tukey se encontraron los resultados que se presentan en la tabla

**Tabla 18. Prueba de Tukey para comparar los promedios obtenidos de absorción /desorción de calcio durante el almacenamiento obtenido a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento.**

# Promedio	1	2	3
$\text{CaCl}_2$ [M]almacenamiento	0.025	0.05	0.1
Valor promedio	-0.061	-0.062	-0.013

\*\* La línea punteada une a los promedios entre los cuales no hay diferencia significativa.

No se encontró diferencia significativa en la desorción de calcio si las esferas se almacenan en concentraciones de 0.025 y 0.05 M, sin embargo hay una mayor desorción en estas mismas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  con respecto a la concentración de 0.1 M.

En general las propiedades de las esferas tales como forma y fuerza mecánica no son alteradas a las 3 diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de almacenamiento, lo que nos da idea de que las esferas permanecen estables durante el almacenamiento.

Dicho almacenamiento tuvo como objetivo determinar la estabilidad de las esferas de alginato. Se ha reportado en la bibliografía el estudio de la estabilidad en solución de fosfato de sodio donde a concentraciones de 0.1 M y 1 M se presenta la disrupción de las esferas, dicho estudio no se realizó en soluciones de  $\text{CaCl}_2$ , además de que no se reporta el fenómeno de absorción y liberación de Calcio. En trabajos realizados con fosfatos demostraron que las esferas pueden sufrir disrupción, inchamiento y contracción (7x12x17).

Sin embargo un intento por encontrar un método adecuado para el almacenamiento de esferas, Dainty A.L. y Goulding K.H.(1986) encontraron que en solución de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a concentraciones de 2, 5 y 10 mM a un pH de 5.5 las esferas permanecieron estables, conservando sus características de forma y dureza.(20).

#### 7.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO Y $\text{CaCl}_2$ Y ALTURA DE GOTEO SOBRE LA FORMA DE LAS ESFERAS.

Se evaluó el efecto de la concentración de alginato (1,2 y 4%)  $\text{CaCl}_2$  de goteo (0.05, 0.1 y 0.5 M) y altura de goteo (5, 10 y 15 cm) sobre la forma de las esferas de alginato (tabla 19).

Tabla 19. Condiciones experimentales y forma de las esferas.

Alginato %	$\text{CaCl}_2$ [M]	Altura de goteo (cm)			No. de lotes de esferas irregulares	No. de lotes de esferas regulares	No. Total de lotes de esferas
		5	10	15			
1	0.05	0	2	2	4	5	27
	0.1	0	1	2	3	6	
	0.5	0	1	2	3	6	
2	0.05	0	0	0	0	27	27
	0.1	0	0	0	0	27	
	0.5	0	0	0	0	27	
4	0.05	0	0	0	0	27	27
	0.1	0	0	0	0	27	
	0.5	0	0	0	0	27	

Se observó que los geles formados con el 1 % de alginato son más susceptibles de sufrir deformaciones, esto se puede deber a que la viscosidad es baja lo que facilita su deformación. Dicha deformación se presenta en un menor porcentaje a las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  0.1 y 0.5 M, esto puede ser por la rápida polimerización de las esferas a estas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .



Según Cheetman y Blunt (1979) los geles formados con bajas concentraciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$  son débiles, estos son más susceptibles de sufrir una deformación con mayor facilidad cuando se les aplica una fuerza de cizalla o de compresión, aunque si se han reportado esferas de forma regular elaboradas a concentraciones de 1 % de alginato. Es probable que esto dependa de la fuente y propiedades de alginato empleado<sup>(12,20)</sup>.

Los resultados sugieren que la altura de goteo, tiene un efecto sobre la forma de las esferas, ya que a altura de 10 y 15 cm se obtuvo un mayor número de esferas de forma irregular y a una altura de 5 cm no se obtuvieron esferas irregulares. La literatura recomienda una altura de goteo de 10 cm<sup>(8)</sup>. La altura de goteo es importante porque a mayor altura se tiene mayor fuerza de choque lo que hace que la esfera se deforme<sup>(21)</sup>.

**Tabla 20. Forma de las esferas de alginato de calcio a diferentes concentraciones del polímero.**

% Alginato	No. de irregulares	No. regulares (esféricas)
1	10	17
2	0	27
4	0	27

En la tabla 20 se puede observar que la probabilidad de obtener geles de alginato de calcio en forma esférica es mayor a concentraciones de 2 y 4% de alginato, ya que a estas concentraciones son menos susceptibles de sufrir cualquier deformación debido a la agitación de la solución de  $\text{CaCl}_2$ . En contraste con Bucke (1987) a concentraciones de 1, 2 y 4% se obtienen partículas en forma esférica. La naturaleza del alginato influye sobre su estructura y sus propiedades, por lo tanto sobre su viscosidad con lo que, se presentan diferencias entre los resultados obtenidos y los reportados<sup>(8)</sup>, además de que en su trabajo solo observó la influencia de la concentración de alginato. Esta puede ser la razón de la diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo y los resultados de Bucke quien obtuvo partículas de alginato al 1 % de forma esférica.

### 7.5.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO Y $\text{CaCl}_2$ SOBRE EL DIÁMETRO DE LA ESFERA

Al obtener el diámetro promedio de las esferas de alginato de calcio en relación con la concentración de alginato (2 y 4 %) se observó que el diámetro aumenta al aumentar la concentración de alginato además de que presentan valores menores en comparación con los obtenidos bibliográficamente (gráfica 5).

**Gráfica 5. Efecto de la concentración de alginato sobre el diámetro de esfera**



Realizando el análisis estadístico (ANOVA) se encontró que la concentración de alginato tiene un efecto altamente significativo sobre el diámetro de esfera ( $p$  menor a 0.05), mientras que la concentración de  $\text{CaCl}_2$  no tuvo efecto sobre esta propiedad. El diámetro promedio obtenido a 2 y 4% de alginato fue de 2.27 y 2.63 mm respectivamente, el promedio obtenido por Klein y Stock (Gráfica 5) es de 2.4 y 2.9 mm respectivamente.<sup>(5,20)</sup> El aumento del diámetro con respecto a la concentración de alginato se puede deber a que para que una gota pueda caer debe tener un peso igual o mayor a la

fuerza que se opone al rompimiento. Por lo tanto al aumentar la concentración de alginato aumenta la resistencia al rompimiento con lo que aumenta el tamaño de la esfera<sub>(22)</sub>. La importancia de obtener partículas de menor diámetro se debe que las restricciones difusionales disminuyen a medida que disminuye el diámetro de esfera<sub>(19)</sub>.

Se sabe que otras variables que afectan el tamaño de la esfera son el diámetro de la aguja, la velocidad de goteo de la solución de alginato, la temperatura y aire de aspersión<sub>(8)</sub>. En este trabajo se seleccionaron las condiciones que de acuerdo a lo reportado se producen pequeñas esferas y estas son: velocidad de goteo de solución de alginato 2.5 ml/ minuto, temperatura 22 °C y se utilizó una aguja hipodérmica para insulina sin utilizar aire de aspersión.

#### 7.6.- RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN DE LAS ESFERAS

A medida que se aumenta la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  la dureza de las esferas de alginato de calcio aumenta. En forma conjunta se apreciaron otras características como la presencia de un centro líquido, las esferas con dicha propiedad tienden a deformarse y a romperse mientras que las que presentaron un centro duro son más resistentes a la deformación y difícilmente se lograron romper (tabla 21).

Tabla 21. Atributos para evaluar la resistencia a la compresión de las esferas de alginato de calcio a diferentes concentraciones de alginato y diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

% Alginato	$\text{CaCl}_2$ de goteo [M]	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.			
		Centro	Dureza/ Lote		
			+	++	+++
1	0.05	Suave	9	0	0
	0.10	Suave	9	0	0
	0.50	Suave	9	0	0
2	0.05	Suave	0	9	0
	0.10	Suave	0	9	0
	0.50	Suave	0	9	0
4	0.05	Suave	0	0	9
	0.10	Macizo	0	0	9
	0.50	Macizo	0	0	9

Centro Suave: presentaron un centro con líquido en el interior de la esfera.

Centro Duro: presentaron un centro duro en el interior de la esfera.  
Dureza: + blandas, ++ duras, +++ más duras.

Otros reportes al respecto no hacen mención de la existencia de esferas de alginato con centro suave o duro, al igual que en otro trabajo, los autores han evaluado la dureza de las esferas cualitativamente con los dedos, han encontrado que la concentración de alginato y de otros diferentes polímeros (quitosan) tiene un efecto sobre la dureza de las esferas (19,20).

La estructura del gel de alginato en presencia de  $\text{CaCl}_2$  forma una red tridimensional inerte con espacios intersticiales interconectados. A medida que se aumenta la concentración de alginato se aumenta la interacción alginato-agua, provocando la formación de una red

tridimensional más densa que disminuye los espacios intersticiales. Esto explica los resultados obtenidos, de lo que se puede concluir que el gel aumenta la resistencia a la compresión a medida que se aumenta la concentración de alginato<sub>0,4</sub>.

#### 7.7.- EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO Y $\text{CaCl}_2$ SOBRE LA DIFUSIÓN DE GLUCOSA EN LAS ESFERAS.

El análisis de varianza realizado para evaluar el efecto de la concentración de alginato y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre la capacidad de difusión de glucosa en las esteras indicó que no se obtuvo un efecto significativo de dichas variables.

El área promedio por esfera obtenida fue de  $3.9105 \text{ mm}^2$  y  $4.7999 \text{ mm}^2$  para 2 y 4 % de alginato respectivamente, con estos valores se calcularon los coeficientes de difusión los cuales fueron  $0.01259 \text{ cm}^2/\text{segundo}$  y  $0.010719 \text{ cm}^2/\text{segundo}$ .

El valor obtenido de difusión es mayor en las esferas preparadas con 2% de alginato, en promedio la cantidad de glucosa residual en la solución fue de 0.62046 mg mientras que con las esferas preparadas con el 4% de alginato el promedio de glucosa residual fue de 0.65125 mg.

Esto indica que la cantidad de glucosa incorporada dentro de las esferas de alginato al 2% fue mayor por lo tanto se tiene una mayor porosidad y menor resistencia al paso de glucosa por los poros en estas esferas, mientras que las esteras elaboradas al 4% presentaron menor glucosa incorporada, lo que es indicativo de una menor porosidad y una mayor resistencia al paso de la glucosa.

A medida que se aumenta la concentración de alginato se forma una red tridimensional con espacios intersticiales interconectados. Las dimensiones de estos espacios varían con el tipo de alginato y concentración del mismo tendiendo a disminuir (18). Las restricciones difusionales internas, las cuales se deben al pequeño tamaño y tortuosidad de los poros del soporte impiden la entrada de glucosa en la esfera. Además de que el tamaño de partícula (esfera) juega un papel importante ya que a medida que disminuye el tamaño la distancia

que debe de recorrer las moléculas de glucosa por difusión también disminuye, así como las restricciones difusionales<sup>(18)</sup>.

Los valores reportados en la literatura para una concentración del 2% de alginato es de  $6.1 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/seg. y  $7.8 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/seg. a 22 y 30 °C respectivamente<sup>(19)</sup>. Los resultados de este trabajo son mayores. Esta diferencia se puede deber a las condiciones en que se realizaron los experimentos, la metodología y equipo utilizado y al tipo de alginato utilizado.

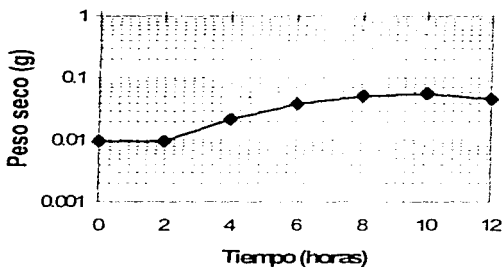
Hannoun y Stephanopoulos (1990) utilizaron un reactor que constaba de 2 cámaras cilíndricas (6 centímetros de diámetro por 15 centímetros de altura) conectadas entre sí por una placa de vidrio del # 25, con un diámetro de 2.4 centímetros. En el interior de las cámaras, donde se tienen fue puesta una placa de alginato de 1.7 centímetros de diámetro por 0.4 centímetros de ancho. Por la cual migra la glucosa por diferencia de concentraciones. La concentración de glucosa utilizada fue de 0.2 %, y la cantidad de glucosa que se difunde fue determinada dentro de la placa de alginato. La ecuación para calcular la difusión de glucosa fue la de Stokes - Einstein.

A diferencia del método propuesto por Hannoun y Stephanopoulos, la forma en que se determinó la difusión en el presente trabajo fue mediante la determinación de la concentración de glucosa en la solución que rodea a las esteras y se consideró el área total que ocupaban las esteras, la concentración de la solución de glucosa utilizada fue de 0.05 %. Una vez determinada la concentración de glucosa con respecto al tiempo se graficó el logaritmo natural de la concentración de glucosa con respecto al tiempo. Donde la pendiente es igual a la difusión/ área, despejando de la pendiente la difusión para obtener su valor.

### 7.8.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Al determinar la curva de crecimiento para *Saccharomyces cerevisiae* se observa un período de latencia de 2 h, posteriormente la fase logarítmica comienza a partir de las dos horas hasta las 8 horas (gráfica 6).

Gráfica 6. Curva de crecimiento  
*Saccharomyces cerevisiae*



Los datos para determinar la velocidad específica de crecimiento fueron a partir de las 2 hora hasta las 8 horas. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de  $0.2802 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 2.47 horas con una correlación de 0.97.

## 7.9.- VIABILIDAD

De resultados obtenidos se encontró que el alginato resultó ser buen soporte, dado que, las células inmovilizadas permanecieron vivas durante el mes en que se mantuvieron almacenadas. El alginato al 2% y el  $\text{CaCl}_2$  a las diferentes concentraciones no tiene ningún efecto tóxico sobre la levadura.

La viabilidad de las células de levadura inmovilizada fue determinada en base a las UFC por un período de un mes de almacenamiento y medida en intervalos de una semana. Se estudió el efecto de la concentración de células y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre la viabilidad, en las condiciones que se especifican en la tabla 22.

Tabla 22. UFC con respecto al tiempo, a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y % de células inmovilizadas en alginato al 2 %.

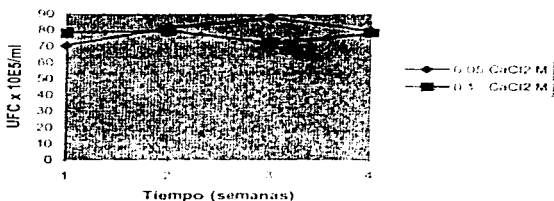
% Alginato	$\text{CaCl}_2$ de goteo [M]	% células inmovilizadas	UFC x $10^5$ / ml Tiempo (semanas)			
			1	2	3	4
2	0.05	10	72 69	86 77	95 80	72 87
	0.1		73 84	87 72	69 75	69 88
2	0.05	15	77 75	83 72	85 78	65 83
	0.1		58 75	78 77	89 81	68 73

Realizando el análisis de varianza (ANOVA) no se encontró un efecto significativo de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y concentración de células sobre la viabilidad.

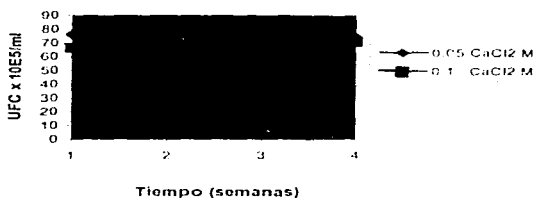


Al graficar la cantidad de UFC/ml de células con respecto al tiempo bajo las diferentes condiciones de trabajo se observa que el número de UFC tiende a permanecer constante (gráficas 7 y 8).

**Gráfica 7. UFC/ml *S. cerevisiae* inmovilizada al 10 % en función al tiempo**



**Gráfica 8. UFC/ml *S. cerevisiae* inmovilizada al 15% en función al tiempo**



Sin embargo la levadura pierde habilidad para aprovechar los nutrientes presentes en cultivo en placa, es decir el tamaño de colonias en la primera semana era mayor y más

densas que las de 2a, 3a, y 4a semana. Esta característica nos hace suponer que la fase "lag" de crecimiento está siendo mucho más larga con el tiempo, debido a que hay una ausencia de nutrientes esenciales durante el almacenamiento. La muerte de células de levadura no se presentó durante un periodo de un mes, pero esta puede llegar a presentarse si se prolonga el tiempo de almacenamiento en ausencia de nutrientes. La levadura es capaz de resistir y permanecer viable en soluciones de  $\text{CaCl}_2$  en las concentraciones mencionadas.

Según antecedentes bibliográficos el atrapamiento en una matriz de alginato de calcio no afecta a las células de levadura. Dentro de la matriz, las células se multiplican en el soporte, el substrate y el producto se difunden con resistencia mínima, un favorable microambiente prevalece y las células son retenidas por el soporte. Y frecuentemente la estabilidad de las enzimas o de las células aumenta por la inmovilización. Con lo que el atrapamiento en alginato es uno de los métodos más exitosamente usados en la inmovilización de células.

Es ideal que las células inmovilizadas sean usadas tan pronto como son preparadas, pero pueden ser almacenadas a 4°C. No es aconsejable dejar estas en la solución de calcio por periodos largos porque pueden ser inhibidas las actividades biosintéticas.

La estabilidad de células inmovilizadas es afectada por muchos factores, tales como contaminación microbiana, liberación de células, lisis de células seguida por liberación de contenido intracelular y los efectos de proteasas endógenas. La estabilidad de células inmovilizadas se sufre puede ser más grande que la correspondiente a las de células en suspensión.

Las condiciones de inmovilización obtenidas en este trabajo fueron las siguientes: Una solución de 50 mililitros de alginato al 2% es goteada en 100 mililitros de  $\text{CaCl}_2$  0.05 M, goteada desde una altura de 5 centímetros y mantenidas por un periodo de 30 minutos para estabilización.

**CONCLUSIONES**

La cantidad de calcio absorbido es función de la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  utilizado en la formación de las esferas de alginato de calcio. El comportamiento que presenta la absorción de calcio se ajusta a un modelo de tipo logarítmico, lo cual fue demostrado mediante la aplicación del análisis de regresión múltiple. Dicho modelo puede ser utilizado para predecir la cantidad de calcio absorbido por el alginato, y también para determinar bajo que condiciones se llega a la saturación de alginato con el  $\text{CaCl}_2$ .

La absorción ó desorción de calcio durante el almacenamiento de las esferas depende de la concentración de alginato, concentración de  $\text{CaCl}_2$  donde son formadas las esferas y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  donde son almacenadas. Si las esferas son almacenadas en concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  menores con las que fueron elaboradas tienden a liberar calcio.

La forma de las esferas esta determinada por la concentración de alginato,  $\text{CaCl}_2$  donde se forman las esferas y altura de goteo.

El tamaño de las esferas depende de la concentración de alginato, no se demostró ningún efecto de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre dicha propiedad.

La resistencia a la compresión de las esferas de alginato es función de la concentración de alginato, no se demostró ningún efecto de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre la resistencia a la compresión.

No se demostró ningún efecto significativo de la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  sobre la propiedad de difusión de las esferas de alginato de calcio.

La cinética de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.2792 h<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de 2.47 horas.

El alginato y  $\text{CaCl}_2$  no presentó ningún efecto tóxico sobre la levadura. La levadura puede permanecer viable en solución de  $\text{CaCl}_2$  por un período de 1 mes a 4°C.

Tomando los criterios de forma, diámetro, difusión y resistencia mecánica y viabilidad se seleccionaron las siguientes condiciones de inmovilización: alginato al 2%,  $\text{CaCl}_2$  0.05 M, 5 cm de altura de goteo, una relación de volumen de alginato y calcio de 1:2 respectivamente (1 ml de alginato y 2 ml de calcio) y un tiempo de reposo en la solución de  $\text{CaCl}_2$  donde son formadas las esferas de 30 min. La concentración de  $\text{CaCl}_2$  donde deberán ser almacenadas las esferas con levadura inmovilizadas es de 0.025 M.

La aplicabilidad del presente trabajo puede relacionarse con la producción de biocensores enzimáticos al utilizar el gel de alginato de calcio como soporte que permitiría el intercambio de sustrato y producto así como la retención del biocatalizador.

En forma general las condiciones de inmovilización pueden ser aplicadas a una gran variedad de microorganismos y enzimas, para finalmente ser utilizados en procesos biotecnológicos en forma continua.

**GLOSARIO**

**Abrasión:** Desgaste de la superficie de un material debida a la fricción.

**Adsorción:** Fenómeno de unión de una entidad química en otra sin que haya reacción ó formación de un complejo químico.

**Alófilico:** Microorganismo resistente a altas concentraciones de sales.

**Aploides:** Células que contienen la mitad de los cromosomas.

**Ascas:** Sacos donde se almacenan las esporas.

**Biomasa:** Masa celular.

**Cizalla:** Movimiento originado por un elemento mecánico (agitador) o por el flujo forzado de una solución (por medio de una bomba).

**Disrupción:** Rompimiento de una estructura determinada (en forma específica se habla de un gel).

**Gelación:** Formación de un gel a partir de un polisacárido por cambio de temperatura ó métodos químicos.

**Gemación:** Forma de reproducción asexual donde a partir de una célula se forman 2 sin necesidad de gametos.

**Hifas:** Unidad funcional por la que está constituido un hongo filamentoso.

**Osmófilo:** Microorganismo resistente a altas presiones osmóticas.

**Quelante:** Reactivo capaz de captar iones metálicos.

**Salmuera:** Solución acuosa salina.

**Tortuosidad:** Referente a la longitud de los canales de una partícula porosa, desde la superficie hasta el centro de la misma.





ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Determinación de  $\text{CaCl}_2$  con EDTA:**

Se basa en la formación de complejos metálicos de diferentes color al del colorante libre "no metalizado". Estos indicadores contienen grupos ácidos y básicos por lo que es necesario establecer y mantener un intervalo de pH apropiado.

Los complejos metálicos del Ericromo T son de color rojo. Por consiguiente, para usarse como indicador metalocromico con una titulación con EDTA, solamente tiene interés la forma azul del compuesto y esta sólo se presenta en el intervalo de pH de 7 a 11. Durante una titulación directa con EDTA, este se combina progresivamente con el ión metálico libre.

Cuando todo el metal ha formado un complejo, la siguiente gota de solución de EDTA toma el metal del complejo del indicador y se observa el color Azul de la forma metalizada, lo cual señala el punto final de la titulación.

**Análisis de Varianza (ANOVA):**

Su función es determinar estadísticamente si es significativo el efecto de las variables manejadas en un experimento.

**Prueba de Tukey:**

Dicha prueba estadística tiene como función determinar en que intervalo de las variables manejadas en un experimento existe una diferencia significativa, una vez que se efectuó el análisis de varianza y mediante este se haya demostrado que hay un efecto significativo de las variables manejadas.

**Regresión Multiple:**

Tiene por objeto determinar el tipo de ecuación a la que se ajusta una variable de respuesta bajo diferentes condiciones experimentales.

**O-toluidina:**

La glucosa forma con O-toluidina en solución de ácido acético bajo calor una sustancia de color verde que puede determinarse fotométricamente. Las proteínas presentes en la muestra puede interferir en la determinación, por lo que se debe de hacer una desproteínización de la muestra.

**Resistencia a la compresión:**

Originalmente se mide en base a la deformación que sufre un gel cuando es sometido a una fuerza externa.

Lo que se mide es la disminución del diámetro, u espesor de una placa o esfera respectivamente cuando se pone un peso determinado o se somete a una fuerza de compresión.

**Difusión:**

Se determinó utilizando un método gráfico. Consiste en graficar el logaritmo de la concentración inicial y final de glucosa presente en la solución de glucosa, al tiempo cero segundos y al tiempo "X" segundos.

La pendiente representa el cociente de la difusión entre el área de una partícula

$$m = D / a$$

donde: m = pendiente

D = difusión (cm<sup>2</sup>/segundos)

a = área de la partícula (cm<sup>2</sup>)

Una vez obtenido el valor de la pendiente se puede despejar D y sustituir finalmente el valor del área de partícula para obtener el valor de difusión.



- 1.- Bernard, D. **Tratado de Microbiología**. 2a ed. Ed. Salvat, España, p. 993 (1978).
- 2.- Bernard, J. Abbott. **Immobilized cells**. Annual Report on fermentation processes. 2, 91-123 (1978).
- 3.- Bonifaz, A. **Micología Médica Básica**. Ed. Mendez S.A., México, D.F., p. 10 - 11 (1990).
- 4.- Buck, C. **Cell immobilization in calcium alginate**. Methods enzymology 135, 175-189, (1987).
- 5.- Constantinides, A. and Mehta, N. **Periodic operation of immobilized live cell bioreactor for the production of candicidin**. Biotechnology and Bioengineering 37, 1010-1020 (1991).
- 6.- Cheetman, S.J, Blunt, K.W. **Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels**. Biotechnology and Bioengineering 21, 2155-2168 (1979)
- 7.- Chibata, I. and Tosa, T. **Use of immobilized cells**. Annual Review Biophistic and Bioengineering. 10, 197-216 (1981)
- 8.- Chotani, G. K. and Constantinides, A. **Immobilized Cell cross-flow reactor**. Biotechnology and Bioengineering 26, 217- 220 (1984).
- 9.- Dainty, A.L., Goulding, K.H. **Estability of alginate-immobilized algae cells**. Biotechnology and Bioengineering. 28, 210-216 (1986).
- 10.- Dietrich K., **Food Biotechnology**. Ed. Marcel Dekker, Inc U.S.A. p. 287-309 (1987).
- 11.- Flaschka, H.A. **Química analítica**. vol. 2; 6a. edición. C.E.C.S.A., Mexico. p.153-163 (1983).
- 12.- Hannoun, J. Stephanopoulos G. **Intrinsic growth and Fermentation rates of alginate-entrapped Saccharomyces cerevisiae**. Biotechnology Progress. 6, 342-348 (1990).
- 13.- Jefferson, C. **The Growth and Dynamics of Saccharomyces cerevisiae**. Annual Report on Fermentation processes. 5, 211-262 (1982).
- 14.- Keith, H. **Industrialization of Indigenuous Fermented Foods**. De. Marcel Dekker INC. N.Y. p. 171 (1989).

- 15.- Klein, J. Stock, J. Poro Size and properties of spherical Ca-alginate Biocatalysts. European J. Applied Microbiology and Biotechnology 18, 86-91 (1983).
- 16.- Limón L.. **Compendio Básico de Microbiología**. Tesis. Facultad de estudios Superiores Cuautlán Campo 1 (UNAM), México, (1997)
- 17.- Minoru N., Masaki A., Technology Developments in Biomass Alcohol production in Japan: continuous alcohol production with Immobilized microbial cells. Annals N.Y. academy of sciences. p. 457-468.
- 18.- Resnick R. Física. Ed. continental, México, parte 1. p. 91 (1980)
- 19.- Senez. **Microbiología General**. Ed. Alhambra S.A. España, p. 89 (1979)
- 20.- Staffan, B., Pendleton R. Covalente stabilization of alginate gel for the atrapament of living whole cells. Biotechnology Letters. 3(8) 393-400 (1981).
- 21.- Stocklein, W., Eisgruber, A. Conversion of L-phenylalanine to L-Tyrosine by immobilized bacteria. Biotechnology Letters. 5(10) 707-708 (1983).
- 22.- Wisemman, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Acribia, S.A., España (1991).