

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INMOVILIZACION DE BIOCATALIZADORES  
EN MICROESFERAS DE ALGINATO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
O C E A N O L O G O  
PRESENTA:  
JOSE ALFONSO BENITEZ DE LA TORRE

ENSENADA, B. C., A 9 DE ABRIL DE 1992

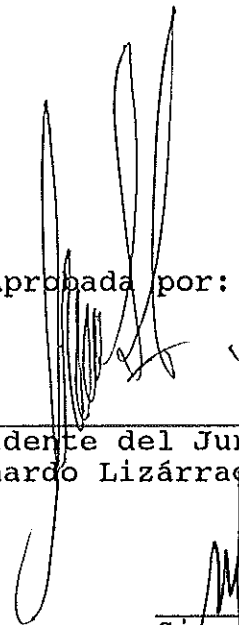
## RESUMEN

Se implementó un dispositivo sencillo para la obtención de microesferas de alginato con diámetro de 380 micras y se analizaron las variables empleadas durante su elaboración para modificarles tamaño, porosidad y rigidez, observándose que un aumento de porosidad y disminución de tamaño, acelera considerablemente la difusión interna de sustrato y producto. Se estudió el efecto de la inmovilización sobre la viabilidad de microalgas, levaduras y bacterias encontrándose que ésta no se afecta.


"INMOVILIZACION DE BIOCATALIZADORES  
EN MICROESFERAS DE ALGINATO"

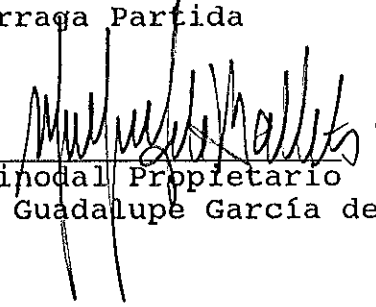
T E S I S  
QUE PRESENTA:  
JOSE ALFONSO BENITEZ DE LA TORRE

Aprobada por:



Presidente del Jurado  
Dr. M. Leonardo Lizárraga Partida

  
Sinodal Propietario  
Oc. Felipe Correa D.

  
Sinodal Propietario  
Oc. Guadalupe García de B.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de "Biotecnología Marina" del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

El devenir de la humanidad ha registrado los cambios que el hombre ha logrado en el ambiente, en su alimentación y en sus relaciones sociales; mas a pesar de tales inovaciones, el hombre no ha podido ni podrá modificar los procesos biológicos que definen su existencia.....

ERNEST BRUCHMAN, 1972

**DEDICATORIA**

**A MI TREBOL DE CUATRO HOJAS: MINA**

**A MIS PADRES, HERMANOS Y SOBRINOS**

**A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS**

## AGRADECIMIENTOS

A los que de una u otra forma colaboraron en la realización de éste trabajo, particularmente al Oc. Felipe Correa, profesores Estéfano, a mi director y sinodales, al personal del almacén de química y de informática.

A mis amigos y compañeros: " Los Nokis".

## INDICE GENERAL

	pag.
<b>I. INTRODUCCION</b>	
1 PARTICULARES.....	9
2 OBJETIVO.....	9
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	
1 CARACTERIZACION FISICA DEL ALGINATO.....	10
2 ELABORACION DE MICROESFERAS.....	10
3 VARIACION DE TAMAÑO EN LAS ESFERAS .....	12
4 VARIACION DE RIGIDEZ EN LAS ESFERAS.....	13
5 VELOCIDAD DE DIFUSION DE SUST. Y PROD.....	15
6 EFECTO DE LA POROSIDAD EN LA FUGA CELULAR.....	17
7 VIABILIDAD DE M.ORGANISMOS INMOVILIZADOS.....	17
<b>III. RESULTADOS</b>	
1 CARACTERIZACION FISICA DEL ALGINATO.....	20
2 ELABORACION DE MICROESFERAS.....	21
a) Por atomización.....	21
b) Por emulsificación.....	21
c) Por goteo.....	21
3 VARIACION DE TAMAÑO EN LAS ESFERAS .....	21
a) Efecto de la concentración de alginato..	21
b) Efecto de deshidratación.....	22
c) Efecto de la concentración de calcio....	22
4 VARIACION DE RIGIDEZ EN LAS ESFERAS.....	24
a) Efecto de la concentración de alginato..	24
b) Efecto de la concentración de calcio....	24
5 VELOCIDAD DE DIFUSION DE SUST. Y PROD.....	25
a) Efecto del tamaño de esfera.....	25
b) Efecto de la porosidad.....	26
6 EFECTO DE LA POROSIDAD EN LA FUGA CELULAR.....	27
7 VIABILIDAD DE M. ORGANISMOS INMOVILIZADOS.....	27
a) Microalgas.....	27
b) Levaduras.....	27
c) Bacterias.....	28
<b>DISCUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>45</b>
<b>APENDICE.....</b>	<b>50</b>

## INDICE DE FIGURAS

	pag.
Fig.1 Técnicas de inmovilización.....	3
Fig.2 Tipos de reactores.....	6
Fig.3 Viscosímetro de canica.....	10
Fig.4 Capilar flexible .....	11
Fig.5 Rigidómetro.....	14

## INDICE DE GRAFICAS

	pag.
Graf.1 Variación de viscosidad de la solución por efecto de concentración de alginato.....	20
Graf.2 Variación de tamaño de esfera por efecto de la concentración de alginato.....	21
Graf.3 Variación de tamaño de esfera por efecto de deshidratación.....	22
Graf.4 Variación de tamaño de esfera por efecto de la concentración de calcio.....	23
Graf.5 Variación de rigidez de esfera por efecto de la concentración de calcio.....	24
Graf.6 Variación de rigidez de esfera por efecto de la concentración de alginato.....	24
Graf.7 Efecto de tamaño de esfera en la velocidad de hidrólisis de sacarosa.....	25
Graf.8 Variación de Km por efecto del tamaño de esfera.....	25
Graf.9 Efecto de porosidad de esfera en la velocidad de hidrólisis de sacarosa.....	26
Graf.10 Variación de Km por efecto de la porosidad de esfera.....	26

## INDICE DE TABLAS

	pag.
Tabla I Variación de viscosidad de la solución por efecto de concentración de alginato.....	29
Tabla II Efecto de la concentración de la solución de alginato en el tamaño de esfera.....	29
Tabla III Efecto de la deshidratación en el tamaño de esfera a diferentes concentraciones de alginato.....	30
Tabla IV Efecto de la concentración de cloruro de calcio en el tamaño y rigidez de las esferas.....	31
Tabla V Efecto de la concentración de alginato en la rigidez de las esferas.....	32
Tabla VI Efecto del tamaño de esfera en la velocidad de hidrólisis de sacarosa por <u>Saccharomices cerevisae</u> .....	32
Tabla VII Efecto de la porosidad de esfera en la velocidad de hidrólisis de sacarosa por <u>S. cerevisae</u> .....	33
Tabla VIII Efecto de la porosidad de esfera en la fuga de <u>S. cerevisae</u> .....	27

# I

## INTRODUCCION

El término "biotecnología" es utilizado cada vez más en el ámbito científico y penetra progresivamente en el lenguaje popular, quizás porque se ha puesto en esta área una esperanza para subsanar los problemas de hambre, enfermedad, escasez de combustible y contaminación que actualmente afectan al mundo.

Biotecnología es un conjunto de técnicas que tienen por objeto la explotación industrial de microbios, células animales vegetales o algún componente de los mismos -como las enzimas-, en la producción de compuestos útiles al hombre, o la descomposición de sustancias que le afectan (Raimbault, 1984).

Desde la antigüedad, el hombre ha usado procesos biotecnológicos de forma empírica para su bienestar, sin embargo no es sino hasta fines del siglo XIX cuando se establecen sus bases científicas con los primeros descubrimientos de la herencia por Gregor Mendel y las aportaciones sobre la tecnología de las fermentaciones hechas por Louis Pasteur.

Son varias las etapas que componen un proceso biotecnológico para la biotransformación, sea síntesis o degradación de un compuesto determinado:

En primer lugar se lleva a cabo la selección, aislamiento y purificación del agente biológico que se va a emplear. Posteriormente, y si se cuenta con los recursos técnicos y económicos que esto implica, se manipula genéticamente, con la finalidad de aumentar su producción, hacerlo más resistente, modificarle ciertas características o hasta hacerlo producir algo que normalmente no produce. Las últimas etapas de todo proceso biotecnológico son: El mantenimiento de la actividad del agente biológico, el escalamiento industrial y la purificación del producto, en las cuales las técnicas de INMOVILIZACION, motivo principal de este trabajo, han encontrado gran aplicación.

La inmovilización se puede definir como el proceso mediante el cual se restringe el movimiento en el espacio de un agente biológico, que como ya se mencionó, puede ser microorganismo (algas, levaduras o bacterias vivas o muertas), células (animales o vegetales), o alguno de los organelos extraídos y purificados de éstos, sin que se pierda su capacidad catalítica, por lo que se ha dado por denominarles "Biocatalizadores" (Cheetham, 1986).

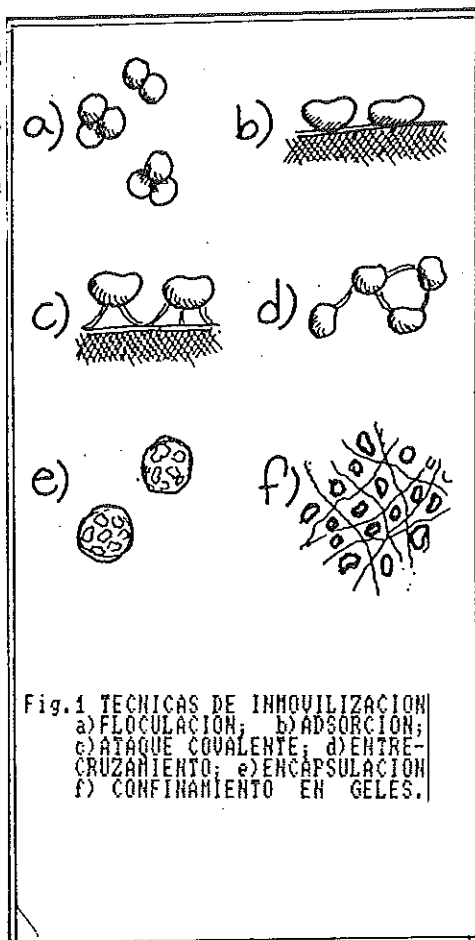
Existen más de 100 técnicas de inmovilización, las cuales se pueden agrupar de la siguiente manera (Fig.1):

a) Floculación. Esta técnica se utiliza con células microbianas y sucede cuando éstas se unen en forma natural para formar densos agregados (Woodward, 1988).

b) Adsorción en soportes sólidos. Sucede cuando los microbios se adhieren naturalmente a la superficie de un material sólido o cuando las enzimas se unen por afinidad química a éstos. Se utilizan materiales como arcillas, DEAE-celulosa, CM-celulosa, cefadex, etc.

c) Ataque covalente a soportes sólidos. Estas técnicas se utilizan en la inmovilización de enzimas y consisten en la

activación del material que reacciona con su grupo amino o carboxilo. Los principales materiales utilizados son: Vidrio poroso, cerámica, celulosa, polímeros sintéticos etc.



d) Entrecruzamiento con reactivos bifuncionales. Se utiliza en la inmovilización de enzimas y células microbianas. Es una técnica que utiliza reactivos como glutaraldehído y dimetil adipimidato, que son diaminas alifáticas, para producir la unión de enzimas entre sí o enzimas con otras proteínas a través de sus grupos carboxilos con la consecuente formación de carbodiaminas, insolubles en agua (Kilvanov, 1983).

e) Encapsulación y microencapsulación. Es una técnica utilizada en la inmovilización enzimática. Consiste en la formación de una membrana que rodea a las enzimas sin dejarlas salir, pero permitiendo el paso de substratos y productos de bajo peso molecular. La membrana capsular se produce por polimerización interfacial de materiales como nitrato de celulosa, poli(ptaloyl piperazina), nylon, epóxidos, etc (Chang, 1977).

f) Confinamiento en geles. Esta técnica es empleada principalmente en la inmovilización de células microbianas, animales, vegetales y en menor grado de enzimas (Kierstan, 1989).

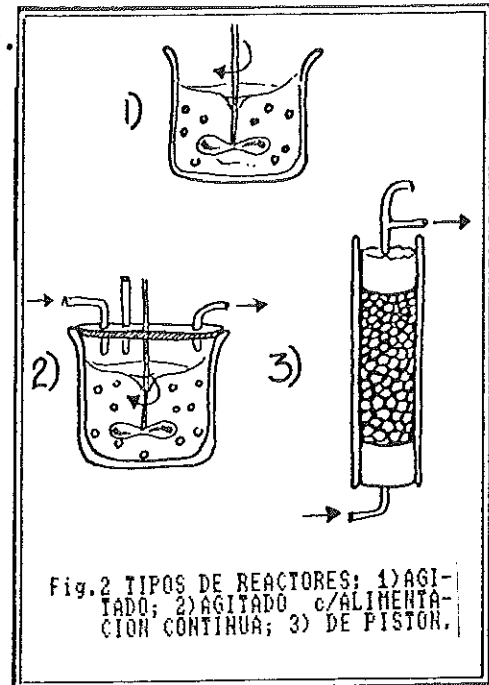
El impacto biotecnológico que ha tenido a nivel industrial el uso de agentes inmovilizados, se manifiesta en el éxito que ha tenido la elaboración de diversos productos, entre los que destacan: Bebidas alcohólicas, alimentos fermentados y aditivos para la industria alimenticia; antibióticos, hormonas y vacunas que han contribuido a la disminución de mortalidad y morbilidad; aminoácidos, aceites y vitaminas para el mejoramiento de la calidad nutricional de forrajes y alimentos humanos; solventes y ácidos orgánicos utilizados en diversas industrias; enzimas utilizadas como catalizadores industriales, así como el uso de agentes biológicos en la remoción de compuestos tóxicos y contaminantes (Chetham, 1986; Woodward, 1983).

Paredes (1990) considera que el tipo y cantidad de producto obtenido, así como la factibilidad económica de un proceso biotecnológico a nivel industrial, está determinado principalmente por:

a) Nivel técnico aplicado. No obstante que la manipulación genética de las células y microorganismos puede aumentar notablemente el rendimiento en la obtención de ciertos productos, estas técnicas sólo se han aplicado a nivel laboratorio y planta piloto debido a los costos implicados.

b) Tamaño y tipo de reactor. Existen diversos tipos, pero son pocos los que han tenido éxito a nivel industrial. Estos han sido clasificados por Chibata (1978) según el modo de alimentación de sustrato de la siguiente manera:

(Ver Fig.2)



SISTEMA LOTE = | -REACTORES AGITADOS

SISTEMA CONTINUO = |  
 -REACTORES AGITADOS  
 C/ALIMENTACION CONTINUA  
 -REACTORES CON PISTON DE VACIO

c) Agente Biológico utilizado. Las enzimas y los microorganismos son los candidatos más fuertes a nivel Industrial. Las primeras, son catalizadores muy específicos y poderosos que hoy en día no han podido sustituirse por catalizadores inorgánicos o sintéticos. El costo de obtención, purificación e inestabilidad que presentan, puede ser amortizado al inmovilizarse, ya que pueden ser reactivadas y reutilizadas, además de que son más resistentes a la desnaturalización; sin embargo su alta

especificidad, impide que puedan ser utilizados industrialmente en procesos que involucran la participación de muchas enzimas que actúan secuencialmente.

Las principales enzimas que se emplean industrialmente son de origen microbiano (hongos, levaduras y bacterias) y pueden ser excretadas por el microorganismo al medio de cultivo, es decir, extracelulares o intracelulares, en cuyo caso deben extraerse y purificarse. Por desgracia, las enzimas obtenidas de esta manera pierden rápidamente su actividad. LA INMOVILIZACION DE MICROORGANISMOS parece ser ventajosa, ya que se convierten ellos mismos en catalizadores capaces de obrar directamente en varias etapas de un proceso de biotransformación. De esta manera se consigue que mientras se forma o degrada el producto deseado, parte de la energía disponible para reproducción y movimiento, se emplee en metabolismo celular de regeneración enzimática.

d) Selección del método de inmovilización. Depende de la finalidad y biocatalizador elegido. En cuanto a inmovilización de microorganismos, el método más apropiado, es el confinamiento en geles (Kilvanov, 1983), que de acuerdo a la forma como se les transforma al estado "gel" se les clasifica en: Formación por enfriamiento de una solución, como la gelatina y el agar; por reacción química,

como la acrilamida; por entrecruzamiento iónico de un polímero cargado (ionotrópico), como el carragenano y el alginato (Paredes, 1990).

De los geles utilizados en técnicas de inmovilización, destaca el ALGINATO, hidrocoloide que se extrae de las algas cafés (Phaeophyceas) que tiene la capacidad de emulsificar, estabilizar, impartir viscosidad y gelificar aún a bajas concentraciones en presencia de metales di y trivalentes (Chapman, 1970). Su costo es relativamente bajo y es muy útil en la inmovilización de microorganismos. Esto se demuestra con el creciente número de publicaciones en las que se le ha utilizado como matriz de confinamiento de células microbianas para la producción de compuestos como:

- ETANOL (Gyu et al., 1982)
- CERVEZA (Onaka, T., 1985)
- ACIDO CITRICO, ITACONICO Y LACTICO (Horitsu et al., 1985)
- YOGURT (Prevost et al., 1985)
- BUTANOL E ISOPROPANOL (Schotens et al., 1986)
- ACETONA Y BUTANOL (Frick y Schuegerl, 1986)
- PROTEINAS HIDROLISADAS DE LECHE (Vuilleumard y Amiot, 1983)
- ANTIBIOTICOS (Yoshimizu et al., 1988)
- GLICEROL (Grizeau y Navarro, 1986) etc.

### **I.1 PARTICULARES**

A nivel industrial, gracias a la inmovilización de microorganismos, se han disminuido los costos de operación y se ha logrado aumentar la eficiencia y rendimiento en muchos procesos, debido a que se ven disminuidos de esta manera los gastos dirigidos a la separación de producto-biocatalizador. Por otra parte, el uso de bioreactores con alimentación continua y de pistón, ha favorecido que el tiempo requerido en fermentaciones tradicionales, se haya disminuido notablemente, y que la cantidad de producto obtenido de esta manera, sea mucho mayor. Sin embargo, el confinamiento en geles disminuye la posibilidad de contacto entre biocatalizador y sustrato requerido para que la transformación se lleve a cabo (McDowell, 1985), por lo que es necesario modificar las características físicas (porosidad y tamaño) de las esferas para aumentar la velocidad de difusión de sustrato y producto dentro de las esferas.

### **I.2 OBJETIVO**

Este trabajo propone la implementación de un sistema sencillo para la elaboración de microesferas de alginato (diámetro menor a 500  $\mu\text{m}$ ), así como la modificación de características físicas (rigidez y porosidad) de las partículas formadas, para mejorar la difusión interna de sustrato y producto.

## II

### MATERIALES Y METODOS

#### II.1 CARACTERIZACION FISICA DEL ALGINATO

Se trabajó con alginato de sodio (Spectrum Chemical Co.) al cual se le determinó su viscosidad relativa a diferentes concentraciones con un viscosímetro de canica Haake modelo din 53015 (fig.3). En todos los casos se utilizó agua desionizada pH=7 para preparar las soluciones. Las determinaciones se hicieron considerando la viscosidad del agua a 18.5° C. equivalente a 1 centipoise (cps), donde 1 poise=1 Dina seg/cm<sup>2</sup> (Craigie, 1978).



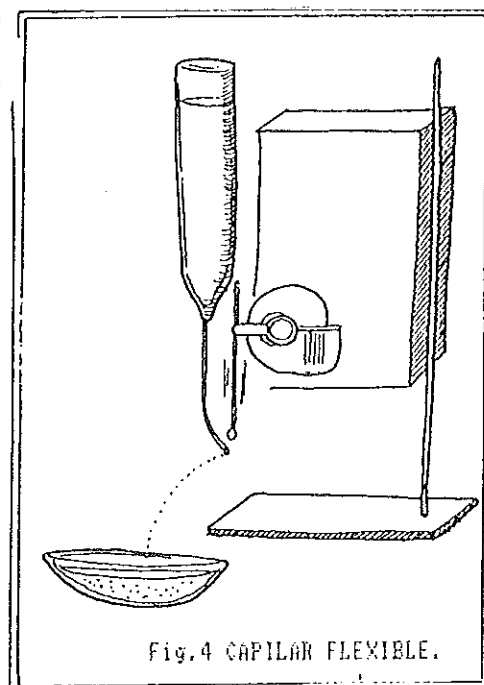
#### II.2 ELABORACION DE MICROESFERAS

Las microesferas se elaboraron de tres maneras diferentes: por atomización, emulsión y goteo de la solución de alginato de sodio. Se tomaron 30 muestras al azar que se midieron en un microscopio Zeiss con escala calibrada.

II.2a) Por atomización. Se utilizó un atomizador de vidrio para producir gotas pequeñas de una solución de alginato de sodio al 5%, las cuales se proyectaron por aspersión a un baño de cloruro de calcio 1N para inducir la gelificación.

II.2b) Por emulsificación. Se hizo una solución de alginato de sodio al 5% que se adicionó a una alícuota de aceite comestible. Ambas fases se agitaron durante 15 minutos a velocidad rápida y constante, tras los cuales se adicionó una solución de cloruro de calcio 1N para inducir la gelificación.

II.2c) Por goteo. Las microesferas se hicieron por goteo directo de la solución de alginato de sodio 0.5% en una solución de cloruro de calcio 1N para inducir la formación del gel conforme al método propuesto por Woodward (1988), el cual se describe con más detalle en el apéndice 1. Se montó un aparato en base al diseño de Scott (1987) al cual se le denominó "capilar flexible" (Fig.4). Este se construyó con una bomba de aire para pecera (fuente



vibratoria) que se puso en contacto con un tubo capilar de plástico de 7 cm. de longitud y por el cual se hizo gotear la solución de alginato al baño de cloruro de calcio 1N (fig.4).

### II.3 VARIACION DE TAMAÑO EN LAS ESFERAS

Para facilitar el estudio de las variaciones logradas, se elaboraron esferas grandes por goteo directo de la solución de alginato a un baño de cloruro de calcio 1N utilizando jeringa hipodérmica con aguja de 0.5 mm o con una bureta de 25 ml.

Se hicieron las siguientes pruebas para observar el efecto de la concentración de la solución de alginato, deshidratación y contenido de calcio del baño gelificante en el tamaño de las esferas. En todos los casos la variable de respuesta analizada fue el diámetro, para lo cual se utilizó un vernier con precisión de 0.01 mm.

II.3a) Efecto de la concentración de la solución de alginato en la variación del tamaño de las esferas. Se hicieron 21 esferas con jeringa por cada concentración de alginato analizada, las cuales fueron: 0.5, 1 y 2 % .

II.3b) Efecto de deshidratación en el tamaño de las esferas. Se hicieron 21 esferas con jeringa por cada concentración analizada: 0.5% , 1% y 2% y se midió su

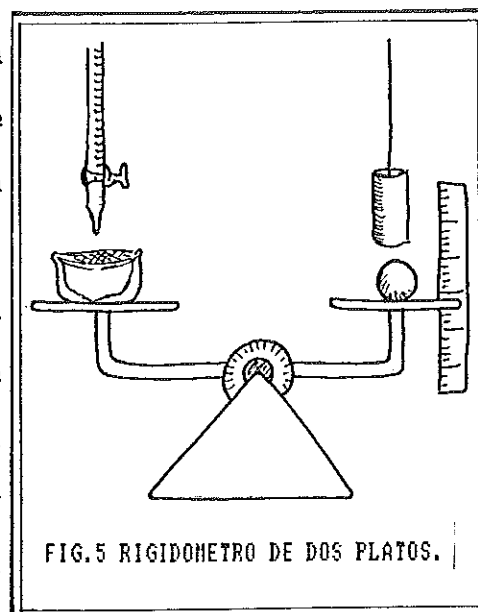
diámetro (D1). Posteriormente las esferas se secaron a temperatura ambiente sobre papel secante, se rehidrataron en agua destilada y se midió su diámetro (D2). La diferencia entre D1 y D2 se expresó como reducción de tamaño en términos porcentuales.

II.3c) Efecto del contenido de cloruro de calcio en el tamaño de las esferas. Se montó una serie de 7 tubos de ensayo de 8 ml de capacidad, a cada uno de los cuales se adicionó 5 ml de solución de cloruro de calcio anhidro, para lograr el siguiente rango de concentraciones: 0.0352, 0.0704, 0.1408, 0.2112, 0.2816, 0.352 y 0.4224 N, equivalentes a 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 g de cloruro de calcio por 100 ml de agua. En cada tubo se dejó caer 1 gota de alginato de sodio con la ayuda de una bureta. Cada tubo se agitó y se dejó reposar por 1 hora exactamente. El experimento se hizo por triplicado.

#### II.4 VARIACION DE RIGIDEZ EN LAS ESFERAS

La evaluación de rigidez se hizo en esferas elaboradas con bureta utilizando el aparato ilustrado en la fig 5, el cual consiste en una balanza de 2 platos en uno de los

cuales se colocó una navecilla previamente tarada y en la cual se dejó gotear agua de una bureta a una velocidad constante. En el otro plato se adaptó una varilla fija de 1 cm de diámetro para presionar las esferas, además de una aguja y regla para indicar la distancia desplazada por el agua. La cantidad de agua requerida para comprimir la esfera a la mitad de su tamaño, se pesó en una balanza analítica Mettler PC 180 y conociendo el área aproximada de contacto de la esferas se calculó la fuerza requerida para deformarlas, lo que se expresó en términos de rigidez.



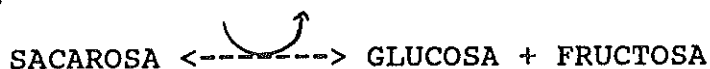
Se hicieron las siguientes pruebas para observar gráficamente el efecto de la concentración de la solución de alginato y concentración de iones calcio del baño gelificante en la rigidez de las esferas obtenidas. En todos los casos la variable de respuesta analizada fue la fuerza requerida para comprimir las esferas a la mitad de su tamaño.

II.4a) Efecto de la concentración de la solución de alginato en la variación de rigidez. Se elaboraron 11 esferas a 3 concentraciones diferentes: 0.1, 0.5 y 2% , de manera que el número de réplicas por tratamiento fue de 3 a 4. Durante el experimento se mantuvo constante la temperatura (18.5° C.) y la concentración de cloruro de calcio del baño gelificante (1N).

II.4b) Efecto del contenido de calcio del baño gelificante en la variación de rigidez. Se hicieron 21 esferas en 7 concentraciones diferentes de CaCl<sub>2</sub> las cuales variaron de 0.0352 a 0.4224 N de CaCl<sub>2</sub> como en el experimento II.3c. Se utilizaron 3 réplicas por tratamiento manteniéndose constante la concentración (0.5%) y temperatura (18.5°C.) de la solución de alginato de sodio.

## II.5 VELOCIDAD DE DIFUSION DE SUSTRATO Y PRODUCTO EN ESFERAS DE ALGINATO

Se analizó el efecto del tamaño y porosidad de esfera en la velocidad de difusión de sustrato y producto de la reacción:



Catalizada por Sacharomices cerevisae inmovilizada en esferas de alginato.

La cantidad de glucosa formada se midió colorimétricamente con 3-5 dinitrosalicilato y un espectrofotómetro (Spectronic 20).

La velocidad se estimó indirectamente midiendo el grado de afinidad entre sustrato y biocatalizador ( $K_m$ ) considerando que a mayor velocidad de difusión, la afinidad aumenta ( $K_m$  disminuye). El  $K_m$  se obtuvo por el método gráfico de Eadie-Hofstee (Lehninger, 1983).

II.5a) Efecto del tamaño de esfera en la cinética de la hidrólisis de sacarosa. Los tratamientos analizados (tamaños) fueron: esferas de 0.38, 1.39 y 2.48 mm de diámetro obtenidas con el capilar flexible, jeringa hipodérmica y bureta respectivamente. Durante el experimento, se mantuvo constante el tiempo de reacción (3 min) y la cantidad de organismo inmovilizado por tubo (0.520 g).

II.5b) Efecto de la porosidad de esfera en la cinética de la hidrólisis de sacarosa. Los tratamientos analizados fueron esferas elaboradas a diferente concentración manteniéndose constantes la cantidad de organismo inmovilizado por tubo (0.520 g) y el tiempo de reacción (3 min). Los tratamientos analizados fueron: esferas de 0.5, 1 y 2% de concentración elaboradas por goteo con jeringa hipodérmica.

## II.6 EFECTO DE LA POROSIDAD EN LA FUGA DE S. cerevisiae

La eficiencia de la inmovilización o la estimación de la fuga de levadura de la matriz, se evaluó cualitativamente de la siguiente manera: se utilizaron 3 tubos de ensayo en cada uno de los cuales se pusieron 0.520 g de esferas con S. cerevisiae inmovilizada, elaboradas al 0.5% de alginato para el tubo A, 1% para el tubo B y 2% para el tubo C. Se adicionaron 15 ml de solución glucosada al 2% para cada tubo cronometrándose 60 minutos de reacción, tras los cuales se tomaron dos alícuotas de 5 ml por tubo eliminándose las esferas de esta manera. A una de las alícuotas se le adicionó 0.2 ml de 3-5 dinitrosalicilato para suspender la reacción inmediatamente y a la segunda se le suspendió 60 minutos después. Se cuantificó colorimétricamente la cantidad de producto formado en 60 minutos sin esferas y el resultado se expresó en porcentaje considerando la cantidad de producto que se hubiese formado en ese mismo lapso con las esferas presentes.

## II.7 VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS

Para observar el efecto de la inmovilización sobre microalgas, levaduras y bacterias, se hicieron las siguientes pruebas:

II.7a) Microalgas. 100 ml de un cultivo de Dunaliella salina se concentró por filtración en millipore de celulosa 3  $\mu$ m, hasta obtener 5 ml aproximados que se adicionaron a 10 ml de una solución de alginato 1% . La mezcla se homogenizó y se goteó con jeringa a un baño de cloruro de calcio 1N para inducir la formación de las esferas. Después de 30 minutos, la mitad de las esferas se transfirió a un matraz con medio Matthiessen-Torner (1966), y la otra mitad se deshidrató a temperatura ambiente sobre un papel secante y se almacenaron en condiciones estériles por una semana. La viabilidad de las microalgas se comprobó diariamente disolviendo una esfera en una solución al 3% de hexametáfosfato de sodio y observando su motilidad al microscopio. Las esferas secas se rehidrataron en agua de mar (pasada por luz ultra violeta) y después de una semana se comprobó su viabilidad como en las esferas frescas.

II.7b) Levaduras. 3 gramos de S. cerevisiae comercial se hidrataron en 5 ml de medio glucosado 2% y se elaboraron esferas como en el caso anterior. La mitad de éstas, se secó y almacenó y la otra mitad se puso en un matraz con medio glucosado conectado a una campana Durjam para comprobar la producción de gas. Las esferas secas se rehidrataron en medio glucosado después de una semana y su viabilidad se comprobó por la producción de gas.

II.7c) Bacterias. Bacillus megaterium y Vibrio prahaemolyticus, se sembraron en cajas petri con medio Zobell. A las 48 horas se adicionó 15 ml de una solución de alginato de sodio 1% y se homogenizó con una aza bacteriológica. La mezcla se goteó con una jeringa en cloruro de calcio 1N y las esferas formadas se transfirieron a medio Zobell líquido. Diariamente se sembró una esfera en cajas petri con medio zobell para observar el crecimiento de la colonia. El experimento se hizo en condiciones, reactivos y material estéril.

### III

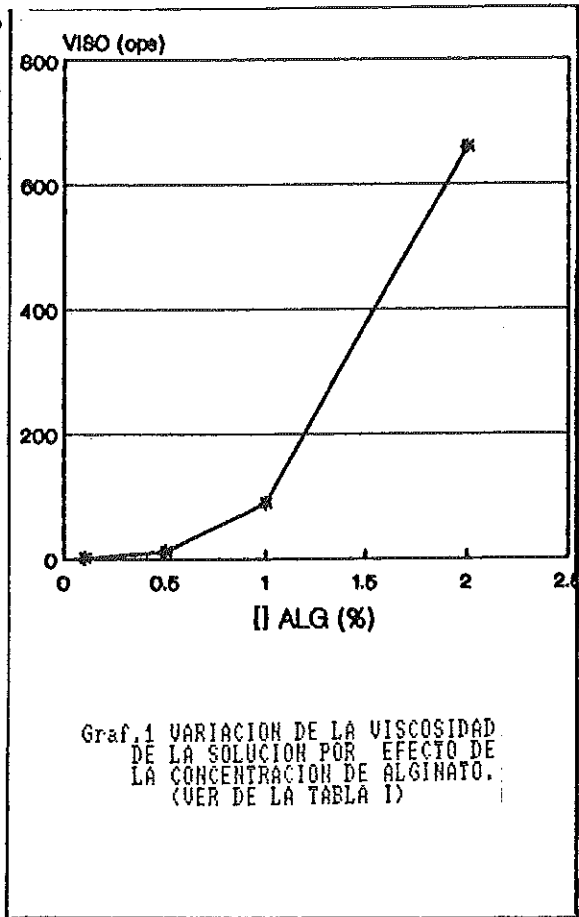
## RESULTADOS

### III.1 CARACTERIZACION FISICA DEL ALGINATO

El análisis físico realizado en las soluciones de alginato indica que hay un incremento exponencial de viscosidad aún cuando la concentración de la solución es baja (Graf.1), comportamiento que matemáticamente se puede describir de la siguiente manera:

$$\text{VISC(cps)} = 1.53 \times 10^{10} \cdot 1.42^{[\text{ALG}]}$$

Donde: [ALG] = concentración porcentual de la solución de alginato.



En base a las curvas de viscosidad-concentración elaboradas por la compañía Kelco (Kelco, 1977), y por similitud a la curva del alginato refinado Kelgin IV, se clasificó al alginato utilizado en este trabajo como de baja viscosidad.

### III.2 ELABORACION DE MICROESFERAS

III.2a) Por atomización. No se obtuvieron microesferas.

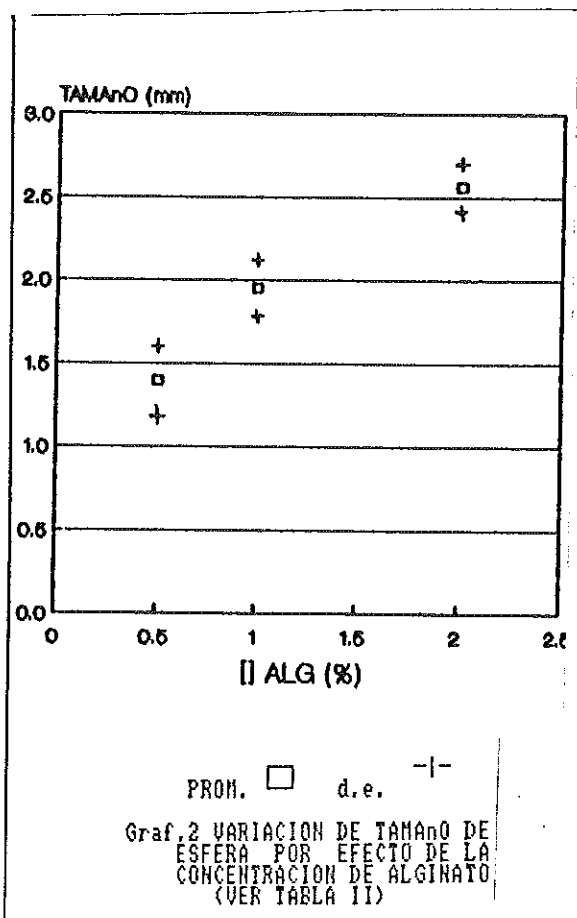
III.2b) Por Emulsificación. Se obtuvieron esferas de diámetro comprendido entre 120 y 480  $\mu\text{m}$  con un promedio de 423  $\mu\text{m}$  y desviación estandar (d.e.) de 106  $\mu\text{m}$  (35%).

III.2c) Por goteo. Se obtuvieron esferas con diámetro comprendido entre 320 y 450  $\mu\text{m}$ , promedio de 381  $\mu\text{m}$  y d.e. de 36  $\mu\text{m}$  (9.4%).

Se observa que, aunque no se obtuvieron esferas tan pequeñas como en el método de emulsificación, la homogenidad de las partículas fue más alta con el capilar flexible.

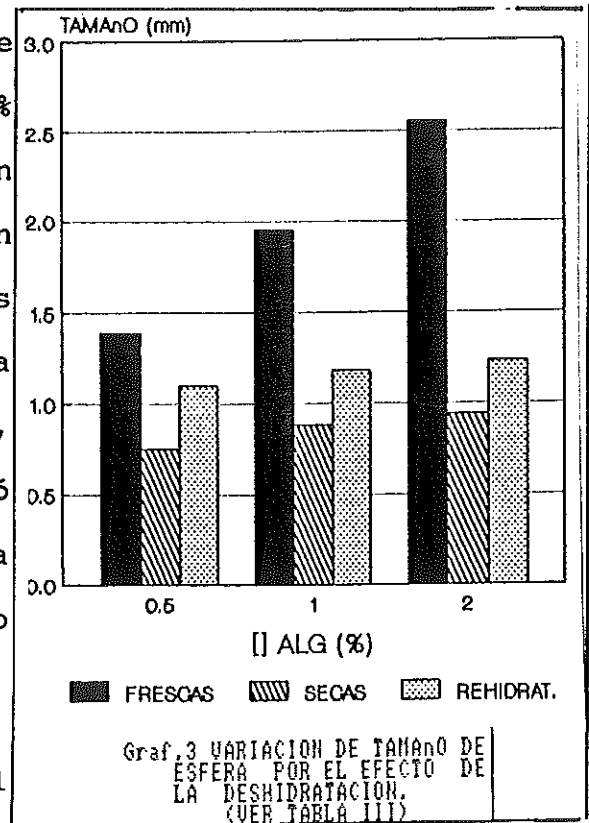
### III.3 VARIACION DE TAMANO EN LAS ESFERAS

III.3a) Efecto de la concentración de la solución de alginato en la variación de tamaño (Graf. 2). Con



alginate 0.5%, se obtuvieron esferas de 1.388 mm de diámetro y 0.211 mm (15%) de desviación estandar, esferas de 1.95 mm de diámetro con 0.171 mm (8.76%) de desviación estandar con alginate al 1%, y esferas de 2.557 mm con 0.145 (5.67%) de desviación estandar con alginate al 2%. Es decir, el aumento en la concentración de la solución de alginate, produce esferas más grandes y más homogéneas.

III.3b) Efecto de deshidratación en el tamaño de las esferas. Las esferas elaboradas con alginate 0.5% , experimentaron un 20.75% de reducción, con alginate al 1% se redujeron 39.33% y con alginate 2% , se redujeron 48.22%. Las esferas rehidratadas no regresaron a su tamaño original, comportamiento que varió según la concentración de la solución de alginate (Graf.3).



III.3c) Efecto del contenido de cloruro de calcio en el tamaño de las esferas. No se obtuvieron esferas cuando la concentración de cloruro de calcio del baño gelificante fué 0.035N; cuando la

concentración fué de 0.07N, se produjeron esferas grandes muy flácidas con un diámetro promedio de 3.68 mm y desviación estandar (d.e.) de 0.028 mm (0.76%); a 0.14N, esferas de 3.067 mm con 0.76 mm (2.48%) de d. e.; a 0.21N, esferas de 2.9 mm con 0.05 mm (1.72%) de d.e.; a 0.28N, esferas de 2.67 mm con 0.15 (5.61%) de d.e.; a 0.35N, esferas de 2.57 mm con 0.057 mm (2.21%) de d.e. y a 0.42N, esferas de 2.67 mm de

diámetro con 0.05 mm (2.14%)

de desviación estandar

(Graf.4). Es decir, el rango

significativo de variación se

obtuvo cuando la

concentración del baño

gelificante fué mayor a 0.14N

(antes de este valor no se

produjo gelificación) y menor

a 0.35N (después de este

valor la diferencia de tamaño

no fué significativa). Se

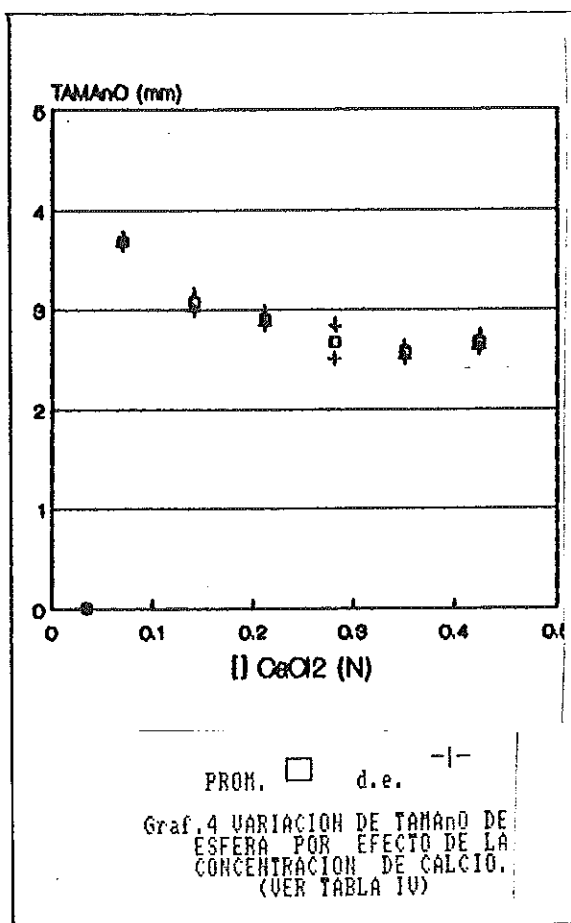
observa que con el aumento de

iones calcio en el baño

gelificante, se produce una

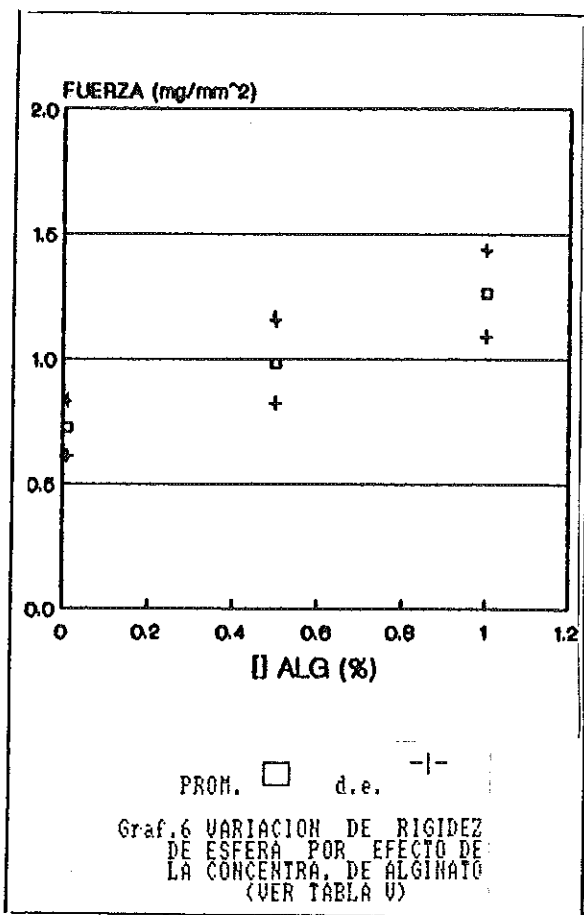
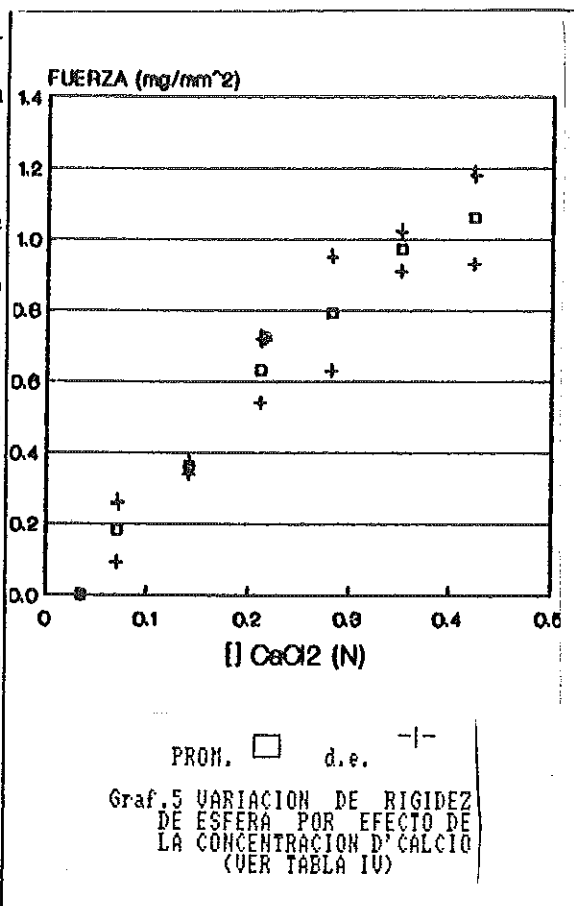
disminución en el tamaño de

las esferas.



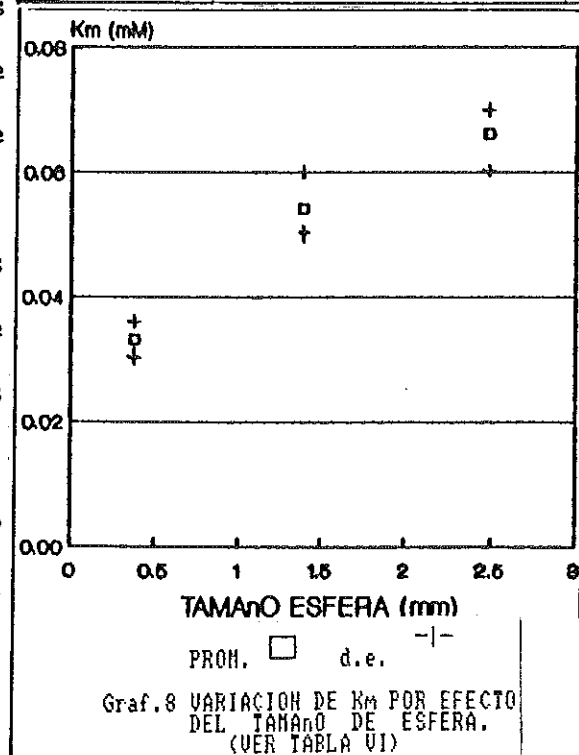
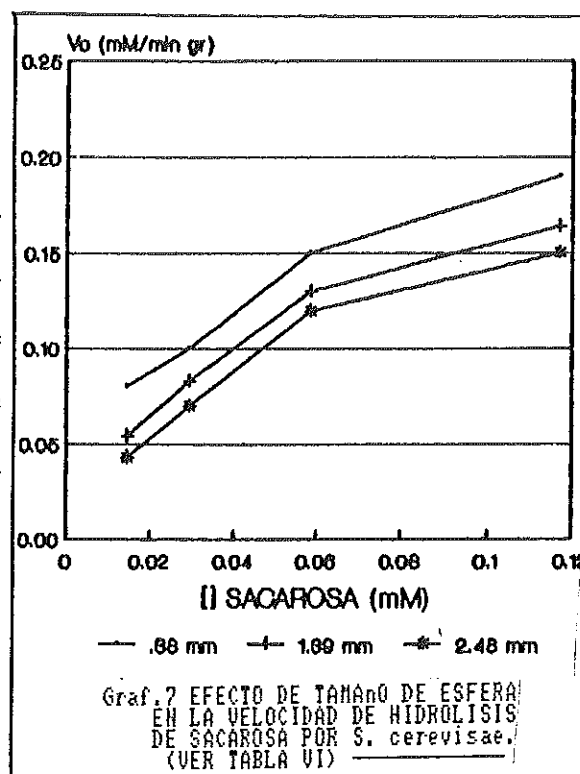
III.4 VARIACION DE RIGIDEZ EN LAS ESFERAS

Se observó que el aumento en la concentración de la solución de alginato, al igual que el aumento de cloruro de calcio en el baño gelificante, producen un aumento en la rigidez de las esferas (Graf. 5 y 6).

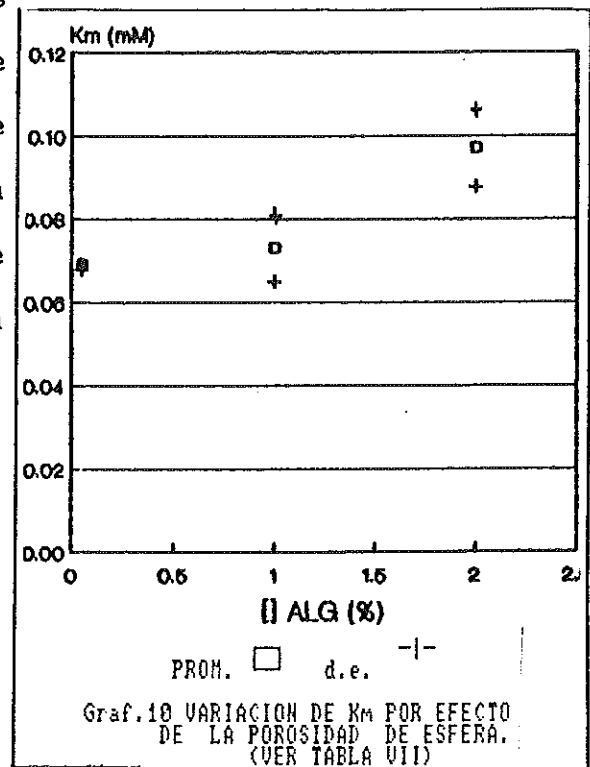
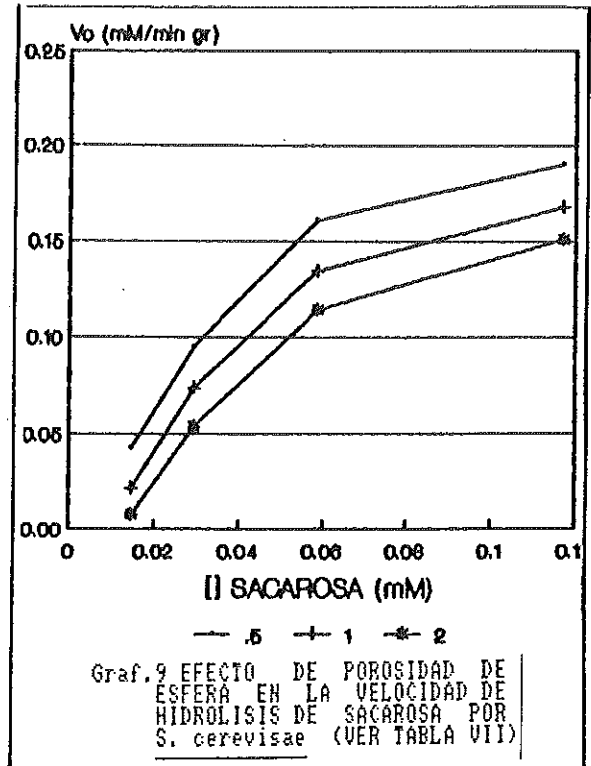


### III.5 VELOCIDAD DE DIFUSION DE SUSTRATO Y PRODUCTO EN ESFERAS DE ALGINATO

III.5a) Efecto del tamaño de esfera en la cinética de la hidrólisis de sacarosa. En la gráfica 7 se muestran las cinéticas con las que se obtuvieron los valores de  $K_m$ , y como se observa en la gráfica 8, el valor de  $K_m$  aumenta con el incremento del volumen de las esferas. Para las esferas de 380  $\mu\text{m}$  se obtuvo un  $K_m$  de 0.033 mili Moles (mM), mientras que para las esferas de 1.39 mm se obtuvo un  $K_m$  de 0.054 mM y para las esferas de 2.48 mm un  $K_m$  de 0.066 mM. En las 3 cinéticas se obtuvo un valor de velocidad máxima similar, que correspondió a 0.2376 mM/min g.



III.5b) Efecto de la porosidad de esfera en la cinética de la hidrólisis de sacarosa. En la gráfica 9 se observan las cinéticas con las que se obtuvieron los valores respectivos de Km. Se observó un aumento en el Km con el incremento de la concentración de las esferas de alginato (Graf.10). El Km de las esferas elaboradas al 0.5% fue de 0.069; para las esferas elaboradas al 1% de 0.073 y para las de 2% de 0.097 mM. La velocidad máxima de reacción también fue similar y correspondió a 0.284 mM/min g.



### III.6 EFECTO DE LA POROSIDAD EN LA FUGA DE S. cerevisiae

El experimento realizado para evaluar la fuga de células indica que mientras menor es la concentración en la esfera de alginato, mayor es la pérdida de células, por lo que se asume que es más porosa. Se estimó una fuga del 10.21, 6.4 y 4.26% para las esferas elaboradas al 0.5, 1 y 2 % respectivamente (Tabla VIII).

[ ] ALG (%)	GLUC.1 (mM)	GLUC.2 (mM)	DIF (mM)	FUGA (%)
0.5	235.30	259.93	24.62	10.2
1	254.62	240.16	14.46	6.40
2	225.70	235.30	9.609	4.26

### III.7 VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS

III.7a) Microalgas. D. salina presentó motilidad, que comparada visualmente con microalgas frescas, era ligeramente menor.

III.7b) Levaduras. La actividad de S. cerevisiae, produjo un desplazamiento de agua en la campana Durjam atribuible a la producción de gas.

III.7c) Bacterias. Al analizar las cajas petri, se observó crecimiento de colonias circulares y simétricas alrededor de las esferas con B. megaterium y V. parahemolyticus inmovilizadas.

El análisis de viabilidad de las esferas rehidratadas de D. salina y S. cerevisiae, resultó positivo a las mismas pruebas.

TABLA 1  
VARIACION DE VISCOSIDAD DE LA SOLUCION DE ALGINATO  
POR EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA SOLUCION.

CONCENTRACION (%)	0.1		0.5		1		2	
	TIEMPO (seg)	VISCO. (cps)	TIEMPO (seg)	VISCO. (cps)	TIEMPO (seg)	VISCO. (cps)	TIEMPO (seg)	VISCO. (cps)
	2.50	1.588	18.48	11.740	140.13	89.027	1038.65	659.879
	2.57	1.632	19.36	12.299	140.15	89.048	1038.87	660.019
	2.17	1.378	19.27	12.242	140.10	89.000	--	--
	2.44	1.550	19.93	12.662	--	--	--	--
PROMEDIO		1.537		12.236		89.025		659.949
DESU. EST.		0.111		0.378		0.015		0.098

TABLA 2  
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA SOLUCION  
DE ALGINATO EN EL TAMAÑO DE LA ESFERA.

CONCENTRACION SOL. ALG. (%)	0.5	1	2
	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)
	1.7	2.1	2.8
	1.2	1.9	2.45
	1.6	1.6	2.4
	1.5	2.0	2.4
	1.2	2.2	2.6
	1.3	2.15	2.4
	1.5	1.9	2.5
	1.3	2.0	2.4
	1.25	1.85	2.7
	1.6	1.7	2.5
	1.8	2.0	2.6
	1.4	2.0	2.55
	1.2	1.9	2.45
	1.2	2.2	2.8
	1.1	2.1	2.4
	1.2	1.9	2.4
	1.2	2.0	2.8
	1.45	2.1	2.75
	1.2	1.6	2.6
	1.75	1.85	2.6
	1.5	1.9	2.6
PROMEDIO	1.388	1.950	2.557
DESU. EST.	0.211	0.171	0.145

DONDE DIAM= DIAMETRO MAYOR DE LA ESFERA.

TABLA III  
EFECTO DE LA DESHIDRATACION EN EL TAMAÑO DE ESFERA  
A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO.

ESFERAS	FRESCAS			SECAS			REHIDRATADAS		
	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2
	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)	DIAM (MM)
	1.7	2.1	2.8	0.7	0.9	0.8	1.1	1.15	1.35
	1.2	1.9	2.45	0.9	0.9	1.0	1.0	1.1	1.2
	1.6	1.6	2.4	0.8	0.95	0.9	1.15	1.2	1.25
	1.5	2.0	2.4	0.7	0.9	0.9	1.2	1.2	1.2
	1.2	2.2	2.6	0.7	0.8	1.0	1.1	1.2	1.2
	1.3	2.15	2.4	0.7	0.9	1.0	1.0	1.15	1.2
	1.5	1.9	2.5	0.75	0.9	0.9	1.05	1.2	1.2
	1.3	2.0	2.4	0.7	0.85	0.9	1.2	1.2	1.25
	1.25	1.85	2.7	0.75	0.8	0.95	1.1	1.2	1.15
	1.6	1.7	2.5	0.7	0.85	0.8	1.25	1.2	1.2
	1.8	2.0	2.6	0.9	0.9	1.0	1.2	1.25	1.2
	1.4	2.0	2.55	0.7	0.9	1.0	1.1	1.1	1.3
	1.2	1.9	2.45	0.7	0.9	1.0	1.0	1.25	1.2
	1.1	2.2	2.8	0.7	0.85	1.0	1.0	1.15	1.35
	1.2	2.1	2.4	0.9	0.9	0.8	1.0	1.2	1.3
	1.2	1.9	2.4	0.75	0.8	1.0	1.15	1.15	1.2
	1.2	2.0	2.8	0.7	0.8	1.0	1.2	1.2	1.3
	1.45	2.1	2.75	0.7	0.9	0.95	1.0	1.2	1.2
	1.2	1.6	2.6	0.8	0.95	0.9	1.2	1.15	1.2
	1.75	1.85	2.6	0.7	0.95	1.0	1.1	1.2	1.2
	1.5	1.9	2.6	0.75	0.95	1.0	1.0	1.2	1.25
PROMEDIO	1.388	1.950	2.557	0.748	0.883	0.943	1.100	1.183	1.233
DESU. EST.	0.211	0.171	0.145	0.072	0.051	0.073	0.087	0.040	0.056

DONDE DIAM= DIAMETRO MAYOR DE LA ESFERA.

TABLA I  
 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE CALCIO  
 EN EL TAMAÑO Y RIGIDEZ DE LAS ESFERAS.

[CaCl <sub>2</sub> ]	DIAM (mm)	PESO (mg)	AREA (mm <sup>2</sup> )	H. DEFOR (gr)	F. APLICADA (mg/mm <sup>2</sup> )
0.0352	--	--	--	--	--
0.0704	3.70 3.65 3.70	22 20 21	10.75 10.46 10.75	2.656 0.867 2.178	0.247 0.082 0.202
PROMEDIO	3.683				0.177
DESU. EST	0.028				0.084
0.1408	3.05 3.00 3.15	18 16 16	7.30 7.06 7.79	2.648 2.714 2.178	0.362 0.369 0.337
PROMEDIO	3.06				0.356
DESU. EST	0.076				0.016
0.2112	2.90 2.95 2.85	14 14 13	6.60 6.83 6.37	3.532 4.330 4.593	0.534 0.633 0.719
PROMEDIO	2.90				0.629
DESU. EST	0.050				0.092
0.2816	2.70 2.50 2.80	12 12 12	5.725 4.908 6.157	3.773 4.768 4.587	0.658 0.971 0.744
PROMEDIO	2.66				0.791
DESU. EST	0.152				0.161
0.352	2.60 2.60 2.50	11 11.5 13	5.309 5.309 4.908	5.287 5.320 4.413	0.995 1.002 0.899
PROMEDIO	2.56				0.965
DESU. EST	0.057				0.057
0.4224	2.60 2.70 2.70	12 13 11	5.309 5.725 5.725	5.522 5.363 6.805	1.040 0.936 1.188
PROMEDIO	2.66				1.055
DESU. EST	0.057				0.126

DONDE DIAM= DIAMETRO MAYOR DE LA ESFERA.

TABLA V  
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ALGINATO  
EN LA RIGIDEZ DE LAS ESFERAS.

[ALG] (%)	DIAMETRO (mm)	PESO (mg)	AREA (mm <sup>2</sup> )	H. DEFOR (gr)	F. APLICADA (mg/mm <sup>2</sup> )
0.1	2.10	11	3.46	2.467	0.712
	2.05	10.5	3.30	2.762	0.836
	2.10	11	3.46	2.138	0.617
PROMEDIO	2.083				0.722
DESU. EST	0.028				0.110
0.5	2.70	11.5	5.72	5.343	0.933
	2.80	12	6.15	5.374	0.872
	2.50	11	4.90	6.012	1.224
	2.70	13	5.72	5.183	0.905
PROMEDIO	2.67				0.983
DESU. EST	0.125				0.162
1	2.90	11	6.60	7.758	1.174
	2.70	14	5.72	8.099	1.414
	2.70	13	5.72	7.981	1.393
	2.95	12	6.03	7.229	1.057
PROMEDIO	2.81				1.260
DESU. EST	0.131				0.173

TABLA VI  
EFECTO DEL TAMANO DE ESFERA EN LA VELOCIDAD  
DE HIDROLISIS DE SACAROSA POR *S. cerevisiae*.

DIAMETRO (mm)	C. ESFERAS (gr)	[SACAROSA] (mM)	U <sub>0</sub> (mM G/min gr)	1/m (1/mM)	U MAX (mM/min)
0.038	0.522	0.014	0.0773		
	0.523	0.029	0.1016		
	0.523	0.058	0.1542		
	0.528	0.116	0.1936		
PROMEDIO				0.033	0.239
DESU. EST				0.002	0.004
1.39	0.526	0.014	0.0536		
	0.525	0.029	0.0829		
	0.529	0.058	0.1323		
	0.525	0.116	0.1640		
PROMEDIO				0.054	0.238
DESU. EST				0.006	0.007
2.48	0.525	0.014	0.0425		
	0.526	0.029	0.0679		
	0.527	0.058	0.1198		
	0.524	0.116	0.1470		
PROMEDIO				0.066	0.236
DESU. EST				0.004	0.010

DONDE ESFERAS= CANTIDAD DE ESFERAS CON LEVADURA INMOVILIZADA  
 [SACAROSA]= CONCENTRACION DE SACAROSA (SUSTRATO)  
 U<sub>0</sub>= CANTIDAD DE PRODUCTO (GLUCOSA) OBTENIDA

TABLA VII  
EFECTO DE LA POROSIDAD DE ESFERA EN LA VELOCIDAD  
DE HIDROLISIS DE SACAROSA POR *S. cerevisiae*.

	CONCENTRA. (%)	C. ESFERAS (gr)	[SACAROSA] (mM)	$U_0$ (mM G/min gr)	$K_m$ (mM)	$U_{max}$ (mM/min)
	0.5	0.525 0.525 0.524 0.523	0.014 0.029 0.058 0.116	0.0425 0.0950 0.1608 0.1900		
PROMEDIO					0.069	0.304
DESU. EST					0.001	0.008
	1	0.526 0.525 0.521 0.524	0.014 0.029 0.058 0.116	0.0213 0.0739 0.1343 0.1679		
PROMEDIO					0.073	0.270
DESU. EST					0.007	0.014
	2	0.521 0.526 0.526 0.522	0.014 0.029 0.058 0.116	0.0077 0.0536 0.1136 0.1510		
PROMEDIO					0.097	0.270
DESU. EST					0.009	0.003

DONDE ESFERAS= CANTIDAD DE ESFERAS CON LEVADURA INMOVILIZADA  
[SACAROSA]= CONCENTRACION DE SACAROSA (SUSTRATO)  
 $U_0$ = CANTIDAD DE PRODUCTO (GLUCOSA) OBTENIDA

#### IV

#### DISCUSIONES

Son muchos los factores que determinan las propiedades físicas de los alginatos en solución y en gel, como el peso molecular, grado de polimerización y contenido de bloques MM, GG y MG, características propias del alga viva que varían según la especie, porción anatómica utilizada, lugar y temporada de cosecha, por lo que podrían clasificarse como variaciones naturales. Sin embargo, existe otro tipo de variaciones debidas a procesos humanos, como la técnica utilizada para la extracción del alginato apartir del alga, grado de pureza obtenido, forma de preparación de la solución, reactivos utilizados, así como la temperatura y pureza de los mismos. Aún los alginatos comerciales, especialmente de grado reactivo, tienen variaciones según el tiempo de almacenamiento y tiempo de exposición a la humedad, ya que es un reactivo altamente higroscópico (Kelco, 1977). De aquí que la caracterización del alginato, ya sea química o física (como en este trabajo), sea necesaria si se pretende obtener los mismos resultados cuando las técnicas descritas se lleven a la práctica.

Se plantearon varios métodos para la elaboración de microsferas, todos bajo el fundamento de reducir el tamaño de la gota de la solución de alginato. Sin embargo, la

atomización produce gotas tan pequeñas que no llegan a tener el peso necesario para romper la tensión superficial del baño gelificante. Con la emulsificación se obtuvieron excelentes resultados en cuanto a disminución de tamaño, pero con la desventaja de que la variación de tamaño es muy grande, lo que limita su aplicación.

La homogeneidad de tamaño durante la elaboración de las microesferas, es un factor que debe ser controlado y que dependerá de la precisión del instrumento durante la formación de la gota. La bureta por ejemplo, es un instrumento que se utiliza en química analítica por su alta exactitud durante el goteo, de ahí que la desviación estandar obtenida en la elaboración de esferas con bureta sea baja (4%). Utilizando jeringa hipodérmica se obtuvieron esferas poco homogéneas (desviación estandar del 15%), lo que se explica por la dificultad para mantener una presión constante en el émbolo durante la extrusión del alginato. Para el diseño del capilar flexible se buscó que la solución de alginato cayera por gravedad para evitar la variación de tamaño como en el caso de la jeringa hipodérmica, sin embargo se obtuvo una desviación estandar del (10%), que se explica porque el capilar de plástico entra en resonancia algunas veces, ocasionando que la

frecuencia vibratoria no sea constante. Se considera que la solución a este problema radica en el diseño del instrumento, por lo que la homogeneidad de las microesferas elaboradas podría aumentarse.

Tomando como comparación los datos reportados por Rehg et. al., (1986), quienes obtuvieron microesferas de 420  $\mu\text{m}$  con una desviación estandar del 18.8% utilizando instrumentos especiales para su elaboración, se puede decir que los resultados obtenidos con el capilar flexible son buenos.

Además del aumento de viscosidad que resulta del incremento en la concentración de la solución de alginato, se obtienen esferas más grandes y con mayor homogeneidad (disminuye la desviación estandar). Esto se puede explicar por el aumento de tensión superficial con respecto a la viscosidad, lo que ocasiona la formación de gotas de mayor tamaño que caen sólo cuando el peso de la gota es mayor que la fuerza que produce la superficie del líquido para adherirse a la punta del instrumento por el que se hace gotear, comportamiento que coincide con los resultados publicados por Rehg (op.cit.), quienes observaron el aumento de tamaño de las esferas con el aumento en la concentración de la solución.

Se considera necesario hacer algunas acotaciones con respecto al método utilizado para la evaluación de rigidez en las esferas. Este método se hizo en base a los análisis realizados sobre geles de carragenano por Zazueta (1988), en los cuales la variable de respuesta analizada fue el peso al cual se producía ruptura de un gel de forma cilíndrica ocasionado por la presión de un émbolo en un aparato similar al propuesto en este trabajo, comportamiento que se describe en términos de "fuerza de gel". Al comprimir los geles de alginato, el líquido contenido en ellos, se exuda sin producirse ninguna ruptura, por lo que se consideró representativa la medición de rigidez para evaluar la consistencia de las esferas, y que es utilizado por McDowell, (1985) para hacer la medición indirecta del grado de porosidad en los geles.

Zazueta (op.cit.), propone que la evaluación de fuerza se haga en geles elaborados por diálisis en moldes de 1 cm<sup>3</sup> cilíndricos. La elaboración de geles de alginato de esta manera presentó varios inconvenientes: los geles formados con soluciones muy diluidas, eran demasiado angostos y largos comparados a los elaborados al 1 y 2% , por lo que se prefirió homogenizar el tamaño y forma de los geles elaborándolos de forma esférica con una bureta.

El incremento de la rigidez de los geles a medida que se aumenta la concentración de la solución de alginato y de iones calcio en el baño gelificante que se observó en este trabajo, corresponde a los resultados obtenidos por McDowell (1985), y que es atribuida a la disminución del tamaño de los poros del gel. Sin embargo hay que hacer notar que al aumentar la concentración de la solución de alginato, obtenemos esferas de mayor tamaño, mientras que un aumento de contenido de calcio en el baño gelificante produce una disminución significativa. Este comportamiento se atribuye a la fuerza iónica ejercida entre los bloques G y los iones calcio, fuerza responsable de la formación tridimensional de los geles de alginato explicada por el modelo de "caja de huevo" propuesta por Grant y colaboradores (1973) y que contempla la explicación del confinamiento de moléculas de agua entre la malla formada por las fibras de alginato. De esta manera se explica que cuando hay un exedente de iones calcio para producir la atracción de todos los bloques G, la cantidad de agua retenida sea menor, al igual que el tamaño del gel formado, mientras que, cuando la concentración de iones calcio en el baño gelificante es baja, se produzcan geles grandes y suaves con poca capacidad para retener agua.

Una manera más de modificar la rigidez y porosidad de las esferas se logra al deshidratarlas, ya que cuando éstas se rehidratan, no regresan a su tamaño original. De aquí se deduce que el número de poros se mantiene constante, mas no su tamaño.

La rigidez ha sido hasta ahora una característica utilizada para medir indirectamente el grado de porosidad de las esferas, sin embargo también hay que considerar que ésta es una característica que se puede impartir para modificar su fuerza mecánica, y que encuentra aplicación en el control de tiempo de desintegración y estabilidad de la partícula.

Con respecto a los experimentos realizados para medir el efecto del tamaño de esfera y grado de porosidad en la velocidad difusional de una sustancia dentro de los geles, cabe hacerse la aclaración de que se utilizó el parámetro " $K_m$ " como una medida indirecta del tiempo que tarda el sustrato en ponerse en contacto con el biocatalizador (que contiene las enzimas necesarias para producir la transformación) sumado al tiempo que tarda en salir del gel en forma de producto. Debido a que  $K_m$  es un parámetro utilizado para medir la afinidad entre enzimas y sustratos, y aunque en este experimento se trabajó con células de

levadura vivas, en realidad son las simasas (conjunto de enzimas responsables de la hidrólisis de la sacarosa), las que intervienen directamente en la catálisis de la reacción. No se considera representativo hacer una comparación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de la sacarasa inmovilizada obtenidos por otros autores, ya que en este caso intervienen otros factores como la permeabilidad de la membrana y reproducción celular, por lo que la discusión de éste experimento se enfoca principalmente a los fenómenos de difusión del sustrato dentro de las esferas de alginato.

La velocidad total de una reacción catalizada por organismos inmovilizados, no depende exclusivamente de la cantidad de enzima presente y de sus condiciones óptimas de trabajo (pH,  $T^\circ$ , etc), sino también de los fenómenos de difusión del sustrato dentro de la matriz (Bruchmann, 1965). Si la velocidad de transformación depende de la rapidez de contacto de las células de levadura y el sustrato, es obvio que mientras menos obstáculos haya entre éstos, más rápida será la reacción. Debido a que el mínimo valor de  $K_m$  obtenido (máxima afinidad) correspondió a las esferas de menor tamaño, se puede deducir que la disminución de tamaño de esfera facilita el contacto entre el biocatalizador y el sustrato. Esto se explica porque es mayor la distancia que tiene que recorrer el sustrato para

ponerse en contacto con el biocatalizador en esferas grandes, por lo que la reducción de tamaño, es una medida eficiente para disminuir el  $K_m$  (aumentar la afinidad de enzima-sustrato).

De la misma manera, y aunque la diferencia no fué significativa entre las 2 primeras concentraciones utilizadas, se observa que el aumento de la porosidad de los geles tiene las mismas ventajas que la reducción del tamaño de las esferas, sin embargo, la alta fugacidad que se produce utilizando concentraciones de 0.5%, nos permite deducir que no es una concentración adecuada para la inmovilización de microorganismos; Se plantea la utilización de glutaraldehído para disminuir la fugacidad cuando se utilicen geles al 0.5% o la deshidratación de las esferas para cerrar el poro.

Se puede decir, a manera de corolario, que las esferas de alginato son sistemas porosos; el tamaño de éstos depende de la rigidez de la esfera, y la rigidez depende principalmente de la concentración de la solución de alginato y del calcio presente durante la formación del gel. Al secar las esferas se produce que el alginato se concentre más, se haga más rígido y que los poros se cierren.

El secado de las esferas con biocatalizadores inmovilizados podría ser ventajoso, ya que se esperaría que la rigidez y estabilidad aumenten con la consecuente reducción de tamaño, además de que se reduce el tamaño, se reduce el escape de las células atrapadas y aumenta el número de células por volumen.

Para determinar la porosidad óptima en las esferas, es necesario encontrar un punto de equilibrio entre porosidad alta, que ocasiona fuga celular, y porosidad baja que obstruye el flujo del sustrato utilizado, producto formado y los gases necesarios para el metabolismo natural de las células atrapadas en la matriz de la esfera. Esto, obviamente, depende del tamaño del microorganismo inmovilizado y de la viscosidad de sustratos y productos. Y Por último, es necesario comprobar que la porosidad elegida, no afecte la biavilidad de los microorganismos inmovilizados.

La aplicación biotecnológica de D. salina, no está limitada a su posible explotación en la producción de glicerol y B-carotenos (Grizeau y Navarro, 1986) que podría llegar a tener interés a nivel industrial en forma inmovilizada. En este estado, se le puede aprovechar como un alimento especial para larvas de crustáceos y peces de importancia comercial.

Lo mismo sucede con S. cerevisiae, que además del actual uso que se le da en la obtención de alcohol y proteína unicelular, también puede sintetizar glicerol y ácidos grasos poli-insaturados de la familia w3 bajo ciertas condiciones (Abreu, 1979).

Otro ejemplo es el de la bacteria Bacillus megaterium, la cual sintetiza la vitamina B12 intracelularmente (Spalla et. al., 1989).

La deshidratación, en este caso, es aconsejable para aumentar la cantidad de metabolito por esfera, además de que se garantiza la estabilidad del alimento cuando se almacena.

Por otra parte, la importancia de la inmovilización de la bacteria Vibrio parahemolyticus a nivel biotecnológico, se justifica en la posible elaboración de esferas con este organismo atenuado para la elaboración de vacunas, ya que actualmente produce pérdidas económicas incalculables en el cultivo del camarón (Dunn, et.al., 1990).

## V CONCLUSIONES

- El instrumento y los métodos que se desarrollaron en este trabajo, son útiles para la elaboración de microesferas de alginato altamente homogéneas y con diámetro de 380  $\mu\text{m}$ .

-La concentración de la solución de alginato, contenido de iones calcio y grado de deshidratación, determinan el tamaño, rigidez y porosidad de las microesferas de alginato.

-Se logró un aumento significativo en la velocidad de difusión de sustrato y producto dentro de las esferas de alginato con microorganismos inmovilizados, disminuyendo el tamaño de la esfera o aumentando su porosidad.

-Se demostró que la inmovilización de Dunaliella salina, Sacharomices cerevisiae y Bacillus megaterium en esferas de alginato, no afecta su viabilidad.

## VI

### LITERATURA CITADA

- ABREU GROBOIS, A.(1979) El uso de la Artemia en criaderos de larvas de camarón. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología U.N.A.M.
- BRUCHMANN, ERNEST E.(1965) Bioquímica Técnica: Alimentaria, De Las Fermentaciones Y Agrícola Edit Acribia España; 48-50.
- CHAPMAN, V.J. (1970) Seaweeds & Their Uses. 2nd ed. London; 15-17.
- COTTRELL W., IAN y KOVACS, P.(1980) Alginates En: Handbook of Water-soluble Gums & Resins. L.Davison (ed); 2-5.
- CRAIGIE, J.S.; & LEIGH, C.(1978) Carragenans & Agars En: Handbook Of Phycological Methods. Cambridge University Pres; 24-27.
- CHANG, T.M. (1977) Artificial Cells. Chang, t. (ed). Plenum Press, New York; 67-68.
- CHEETHAM, PETER S. (1986) Utilización De Enzimas Y Células Inmovilizadas Y Reactores Bioquímicos En Biotecnología. En: Principios de Biotecnología Wiseman (ed); 89-100.

- CHIBATA; K.T.(1978) **Inmovilized Enzymes. Research & Development.** John Wiley & Sons. New York; 34.
- DOUZOU,C.PHILIP (1983) **Las Biotecnologías** F.C.E. México; 44.
- DUNN J.,EDWARD; POLK,A.; SCARRET,D.; OLIVER,G.; LALL,S. Y GOOSEN,M.(1990) **Vaccines in aquaculture: The search for an efficient delivery system.** *Aquacul.Eng.*9; 23-32.
- FRICK,C.& SCHUEGERL, K. (1986) **Continuos acetone-butanol production with free & inmovilized Clostridium acetobutylicum** *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 25; 186-193.
- GRANT,G.T.; MORRIS, E.B.; RESS,D.A.; SMITH,P.J.Y THOM,D. (1973) **Biological interactions between polysacharides & divalent cations. The egg-box model.** *FEBS Lett*, 32; 195-198.
- GRIZEAU,D. Y NAVARRO J. (1986) **Glicerol production by Dunaliella tertiolecta immobilized within Ca-alginate beads.** *Biotechnol.Lett.* 8:4; 261-264.
- GYU, HOEN CHOU, CHA YONG CHOI, YANG DO CHOI & MOON H. HAN.(1982) **Ethanol production by immobilized yeast & its CO2 gas efects in a packed bed reactor.** *J.Chem.Tech.Biotechnol.* 32; 959-967.

HORITSU, H.; TAKAHASHI, Y.; ADACHI, S.; XIOA, R.; HAYASHI  
T. Y KAWAI, K.(1985) Production of organic acids by  
immobilized cells of fungi. Appl.Microbiol.Biotechnol.  
22; 8-12.

KIERSTAN, P. MAREK & COUGHLAN, P. (1989) Immobilization  
Of Cells & Enzymes By Gel Entrapment.En: Immobilized  
Cells & Enzymes. Woodward (ed); 87-90.

KILVANOV M., ALEXANDER (1983) Immobilized enzymes & cells  
as practical catalysts. Science. 219:4585; 722-727.

KELCO. (1977) Alginates En: Algin-Hidrophilic Derivates  
of Alginic Acid For Scientific Water Control. 2a ed.  
USA; 101-123.

LEHNINGER, L. ALBERT. (1983) Bioquímica: Las Bases  
Moleculares De La Estructura Y Función Celular. Edit  
Omega S.A. 2a ed. Barcelona España; 201.

MATTHIESSEN, G.C. Y TORNER, R.C.(1966) Possible methods of  
improving the shellfish industry of Martha's Vineyard,  
Duke's country, Massachusetts. Marine Research  
Foundation, Edgartown, Ma.

MCDOWELL,R.H. (1985) New developments in the chemistry of  
alginates & their use in food. Chem.& Ind., 26; 601.

- ONAKA, T., (1985) Beer brewing with immobilized yeast. *Biotechnology* 3; 467-470.
- PAREDES-LOPEZ, OCTAVIO. (1990) La biotecnología de plantas: Una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México. *CONACYT* 35; 27-43.
- PREVOST, H.; DIVIES, C. & ROUSSEAU E. (1985) Continuous yoghurt production with Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus entrapped in Ca-alginate. *Biotechnol.lett.* 4; 247-252.
- RAIMBAULT, MAURICE. (1984) Biotecnología: La experiencia Francesa. *Ciencia y tecnología de Francia.* 10:144; 34-37.
- REHG, T.; DORGER, C.; Y CHAU, P. (1986) Application of an atomizer in producing small alginate gel beads for cell immobilization. *Biotechnol. Lett.* 8:2; 111-114.
- SCHOUTENS, G.H., et al., (1986) A comparative estudy of a fluidized bed reactor and a gas lift loop reactor for the IBE process. *J.Chem.Technol.Bitechnol.* 36; 565-576.
- SCOTT, C.D. (1987) Techniques for producing monodispersed biocatalyst beads for use in columnar bioreactors. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 501; 487-493.

- SPALLA, C.; GREIN, L.; GAROFANO, A. Y FERNI, G. (1989) Microbial production of vitamin B12. En Biotechnology of Vitamins, Pigments & Growth Factors. Elsevier Applied Science; N.Y.
- VUILLEMARD, J. & AMIOT, J. (1983) Hydrolysis of milk proteins by immobilized cells. Microb. Alim. Nutr. 3; 333-343.
- WOODWARD, M. ALEXANDER (1983) Immobilized enzymes & cells as practical catalysts. Science; 219; 485.
- YOSHIMIZU, H.; MYOUGA, Y.; KAMEI, Y KIMURA T. (1988) Production of antiviral substances by bacterial cells immobilized alginate beads. Fish Pathology, 22; 147-152.
- ZAZUETA-GUTIERREZ, ELSA (1988) Un Estudio Químico de los Carragenanos de Cuatro Especies de Gigartina. Tesis de Licenciatura U.A.B.C.; F.C.M.; 63.

## VII

### APENDICE

#### METODO DE ELABORACION DE ESFERAS DE ALGINATO

##### WOODWARD

#### 1-MATERIALES Y REACTIVOS:

Jeringa hipodérmica

Cloruro de calcio 1N.

Alginato de sodio (1%, p/v). Esta solución se prepara disolviendo 1 gr de alginato de sodio en 100 ml de agua destilada a 30 ° C, agitando constantemente para deshacer grumos. La solución se deja reposar 30 minutos para permitir el escape del aire contenido.

#### 2-METODO:

Se extruye la solución de alginato de sodio utilizando la jeringa para producir pequeñas gotas que se dejan caer en la solución de cloruro de calcio. El intercambio de iones sodio por calcio, produce la gelificación del alginato. Se dejan las esferas en la solución de cloruro de calcio 20 minutos para que el intercambio iónico se lleva a cabo en su totalidad.