

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

Doctorado en Ciencias Marinas

PRODUCCIÓN Y PROPIEDADES DE ALGINATO DE *SARGASSUM*  
*SINICOLA* (SETCHELL Y GARDNER) Y SU APLICACIÓN EN  
INMOVILIZACIÓN CELULAR.

**M en C. Ricardo Yabur Pacheco**

Director de tesis: Dr. Gustavo Hernández Carmona  
Co-director: Dr. Yoav Bashan  
Dra. Margarita Casas Valdez  
Dr. Rafael Cervantes Duarte  
Dr. David J. Chapman

IPN-CICIMAR. Av. IPN, S/N  
Playa Palo de Santa Rita, A.P. 592  
La Paz, Baja California Sur, 23096  
[ryabur@ipn.mx](mailto:ryabur@ipn.mx); ryabur72@hotmail.com



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISION DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 27 del mes de Septiembre del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"PRODUCCIÓN Y PROPIEDADES DEL ALGINATO DE *Sargassum sinicola***  
**(Setchell y Gardner) Y SU APLICACIÓN EN INMOVILIZACIÓN CELULAR"**

Presentada por el alumno:

**YABUR**

Apellido paterno

**PACHECO**

materno

**RICARDO**

nombre(s)

Con registro: 

B	0	1	1	2	6	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

DR. GUSTAVO HERNANDEZ CARMONA

PRESIDENTE

DRA. MARIA MARGARITA CASAS VALDEZ

SECRETARIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE

SEGUNDO VOCAL

DR. YOAV BASHAN  
Co-Director

TERCER VOCAL

DR. DAVID J. CHAPMAN

EL PRESIDENTE DEL

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE  
**CICIMAR**  
**DIRECCION**





**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes Octubre del año 2005, el (la) que suscribe RICARDO YABUR PACHECO alumno(a) del Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS con número de registro B011268 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo al dirección de: DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA y cede los derechos del trabajo titulado: "PRODUCCIÓN Y PROPIEDADES DE ALGINATO DE *Sargassum sinicola* (Setchell y Gardner) Y SU APLICACIÓN EN INMOVILIZACIÓN CELULAR" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: ryabur72@hotmail.com, ryabur@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
**RICARDO YABUR PACHECO**

*nombre y firma*

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. <i>Sargassum sinicola</i> .....	3
1.2.1. Descripción morfológica.....	4
1.2.2. Distribución y abundancia.....	5
1.3. Aspectos generales de los alginatos.....	6
1.3.1. Biosíntesis.....	7
1.3.2. Aplicación de los alginatos.....	8
1.3.3. Mercado de alginatos en México.....	9
1.4. Producción de alginato. -Método de Cloruro de Calcio-.....	10
1.5. Inmovilización celular.....	11
2. Antecedentes.....	14
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	18
4.1. Hipótesis I. Producción de alginato de <i>S. sinicola</i> .....	18
4.2. Hipótesis II. Inmovilización celular.....	18
5. Objetivos.....	19
6. Materiales y Métodos.....	21
6.1. Colecta de material.....	21
6.2. Producción de alginato de sodio de <i>S. sinicola</i> .....	21
6.2.1. Producción a nivel laboratorio.....	21
6.2.1.1. Hidratación.....	21
6.2.1.2. Pre-extracción en sistema de flujo continuo y sistema de carga.....	22
6.2.1.3. Temperatura y tiempo de extracción alcalina.....	23
6.2.1.4. Blanqueado.....	24
6.2.2. Producción a Nivel Planta Piloto.....	24
6.3. Evaluación del proceso de producción y caracterización del alginato.....	26
6.3.1. Determinación del rendimiento.....	26
6.3.2. Viscosidad.....	26
6.3.3. Costos de producción.....	26
6.3.4. Coloración.....	27
6.3.5. Concentración de compuestos fenólicos.....	28
6.3.6. Restricción de luz.....	28
6.4. Inmovilización celular.....	28
6.4.1. Condiciones de crecimiento de los microorganismos.....	29
6.4.2. Tratamiento de aguas residuales.....	29
6.4.3. Conteo celular.....	31
6.4.4. Promotores de crecimiento de plantas.....	32
6.5. Análisis estadístico.....	34
7. Resultados.....	36
7.1. Producción de alginato de sodio de <i>S. sinicola</i> .....	36
7.1.1. Producción de alginato nivel laboratorio.....	36
7.1.1.1. Hidratación.....	36
7.1.1.2. Sistema y pH de Pre-extracción.....	40
7.1.1.3. Extracción.....	43

7.1.1.4. Blanqueado .....	46
7.1.2. Producción de alginato nivel planta piloto .....	46
7.2. Caracterización estructural del alginato.....	47
7.2.1. Composición .....	47
7.2.2. Coloración.....	48
7.2.3. Concentración de compuestos fenólicos.....	48
7.3. Inmovilización celular .....	49
7.3.1. Determinación de la curva de viscosidad .....	49
7.3.2. Tratamiento de aguas residuales.....	50
7.3.3. Reducción de intensidad luminosa .....	50
7.3.4. Crecimiento de los microorganismos .....	51
7.3.5. Localización del crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> .....	54
7.3.6. Remoción de nutrimentos .....	55
7.3.7. Promotores de crecimiento de plantas .....	56
8. Análisis .....	58
8.1. Producción de alginato de <i>S. sinicola</i> .....	58
8.2. Caracterización del alginato de <i>S. sinicola</i> .....	63
8.3. Tratamiento de aguas residuales.....	64
8.4. Inoculantes como promotores del crecimiento de plantas.....	67
9. Conclusiones.....	68
10. Recomendaciones .....	70
11. Bibliografía .....	71
12. Anexos .....	76

## TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Composición química de <i>Sargassum sinicola</i> en el Golfo de California, B.C.S.....	5
Tabla 2. Composición monomérica de algunos alginatos según su fuente de origen.....	7
Tabla 3. Principales aplicaciones de los alginatos.....	8
Tabla 4. Contenido de unidades urónicas de alginato de sodio, según su fuente de origen.....	47
Tabla 5. Características del color de la solución de alginato de sodio de <i>S. sinicola</i> .....	48
Tabla 6. Promoción de crecimiento de plantas inoculadas con alginato de <i>S. sinicola</i> y <i>M. pyriferá</i> .....	56
Figura 1. Fórmulas clásicas de los monómeros del ácido algínico.....	6
Figura 2. Biosíntesis de los alginatos.....	8
Figura 3. Importación de alginatos en México. (1993-2001). .....	10
Figura 4. Proceso de producción de alginato de sodio .....	11
Figura 5. Producción de esferas de alginato; inmovilización y co-inmovilización celular.....	30

Figura 6. Determinación espacial del crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> en cortes histológicos de esferas de alginato (grosor 3µm) .....	32
Figura 7. Análisis del proceso de producción de alginato de <i>S. sinicola</i> con diferente concentración de formaldehído durante la etapa de hidratación. ....	37
Figura 8. Análisis del proceso de producción de alginato de <i>S. sinicola</i> con diferentes repeticiones durante la hidratación. ....	38
Figura 9. Análisis del proceso de producción de alginato de <i>S. sinicola</i> con diferente tiempo de hidratación. ....	39
Figura 10. Características del alginato de sodio con diferentes repeticiones durante la hidratación.....	40
Figura 11. Análisis del proceso de producción de alginato de <i>S. sinicola</i> con diferente pH en el sistema de pre-extracción en carga y sistema de flujo continuo.. ....	42
Figura 12. Intercambio iónico ( $Ca^{2+}/H^{+}$ ) durante la pre-extracción. ....	43
Figura 13. Curva del rendimiento de alginato de sodio obtenido durante la extracción a 80° C.....	44
Figura 14. Análisis del proceso de producción de alginato de <i>S. sinicola</i> con diferente temperatura de extracción.....	45
Figura 15. Espectro $^1H$ RMN (300 MHz) de alginato de sodio de <i>S. sinicola</i> . ....	47
Figura 16. Viscosidad del alginato de <i>Sargassum sinicola</i> antes y después de esterilizar. B. Ecuación de l viscosidad según la concentración del alginato.....	49
Figura 17. Inmovilizado de <i>C. sorokiniana</i> y co-inmovilizado con <i>A. brasilense</i> en alginato de <i>S. sinicola</i> y <i>M. pyrifer</i> a .....	50
Figura 18. Determinación de la reducción luminosa en gel de alginato de <i>S. sinicola</i> .....	51
Figura 19. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada en alginato de <i>S. sinicola</i> y <i>M. pyrifer</i> a.....	52
Figura 20. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> co-inmovilizada en alginato de <i>S. sinicola</i> y <i>M. pyrifer</i> a.....	52
Figura 21. Crecimiento de <i>A. brasilense</i> co-inmovilizada con <i>C. sorokiniana</i> en esferas de alginato.....	53
Figura 22. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> , por distribución en esferas de alginato de <i>S. sinicola</i> y <i>M. pyrifer</i> a.....	54
Figura 23. Remoción de amonio y fosfatos con inmovilizados de <i>C. sorokiniana</i> y co-inmovilizado con <i>A. brasilense</i> en alginato de <i>S. sinicola</i> y <i>M. pyrifer</i> a. ....	55
Figura 24. Crecimiento de plantas de Jitomate, variedad ACE, inoculadas con la bacteria promotora de crecimiento de plantas, <i>A. brasilense</i> , después de 30 días de tratamiento.....	56

## GLOSARIO

**Anteridios.** En los briófitos, algunas plantas vasculares, y algas, es el órgano multicelular productor de espermatozoides.

**Conceptáculo.** Cavidad especial donde se desarrollan los gametos.

**Diploide.** (Gr. *Di*, doble, dos, *ploion*, nave, barca). Condición en la cual cada autosoma está representado dos veces (2n); por oposición a haploide (n).

**Estipe.** Órgano entre el sujetador y las hojas.

**Haploide.** (Gr. *Haplos*, simple, *ploion*, nave, barca). Que tiene sólo un conjunto de cromosomas (n), por oposición al diploide (2n); característico de los gametos eucarióticos, los gametofitos vegetales y algunos protistas y hongos.

**Monómeros.** (Gr. *Monos*, único, *meros*, parte). Una molécula simple relativamente pequeña que puede ligarse a otras para formar un polímero.

**Monopodial.** Relativo a un solo axis de crecimiento.

**Oogamia.** (Gr. *Oion*, huevo, *gamos*, casamiento). Reproducción sexual en la cual uno de los gametos, habitualmente el de mayor tamaño, no es móvil.

**Oogonio.** Gametangio femenino unicelular.

**Parafisas.** Estructura estéril, encontrada con los esporangios o gametangios.

**Parénquima.** (Gr. *Para*, entre, *en*, en, *chein*, verter). Tejido vegetal compuesto por células vivas, de paredes delgadas dispuestas al azar con vacuolas grandes; habitualmente tejido fotosintético o de almacenamiento.

**Polisacáridos.** (Gr. *Polus*, mucho, *sakcharon*, azúcar). Polímero de carbohidratos compuesto por monómeros de monosacáridos en cadenas largas.

**Protoplasto.** (Gr. *Protos*, primero, *plastos*, formado). Orgánulo citoplasmático, frecuentemente pigmentado, de las células vegetales.

**Receptáculos.** Puntas hinchadas del talo donde se localizan los conceptáculos.

## PRODUCCIÓN Y PROPIEDADES DE ALGINATO DE *SARGASSUM SINICOLA* (SETCHELL Y GARDNER) Y SU APLICACIÓN EN INMOVILIZACIÓN CELULAR.

### RESUMEN

Se llevó a cabo la producción de alginato de sodio del alga café *S. sinicola* como material para la inmovilización de la microalga *Chlorella sorokiniana* y co-inmovilización con la bacteria promotora de crecimiento de plantas, *Azospirillum brasilense*, para el tratamiento de aguas residuales. El alginato también se empleó para la formulación de microesferas de *A. brasilense*, para la inoculación de semillas de tomate, como promotores de crecimiento de plantas. Durante la producción se analizaron diferentes etapas por el método de cloruro de calcio y se determinó el rendimiento y costos de producción para optimizar el proceso de producción. La composición y estructura del alginato se caracterizó por  $^1\text{H}$  NMR, y se evaluó la viscosidad, color, y compuestos fenólicos del alginato. Los resultados se compararon con alginato comercial aislado del alga *Macrocystis pyrifera*. A partir de las modificaciones en el proceso de producción, se obtuvo un 15 % de rendimiento de alginato con un costo de producción de 7.8 USD kg<sup>-1</sup>. Este alginato presenta una mayor cantidad de ácido gulurónico (FG = 0.64) que manurónico (FM = 0.38), y una viscosidad de 100 mPa s (2%). Tiene una coloración café intensa y una mayor cantidad de compuestos fenólicos que en *M. pyrifera*. Sin embargo, el crecimiento de *C. sorokiniana* y *A. brasilense* no fue significativamente diferente que con su control de *M. pyrifera*. El crecimiento de *C. sorokiniana* es uniforme dentro de la esfera con ambos tipos de alginato, con un mayor crecimiento en las esferas co-inmovilizadas. La remoción de nutrientes (fosfatos y amonio) de agua residual no fue significativamente diferente por tipo de alginato ( $p \leq 0.05$ ). Las semillas de tomate inoculadas con microesferas de *A. brasilense* formuladas con el alginato de *S. sinicola*, muestran un incremento en su crecimiento similar que con las



inoculadas con alginato de *M. pyrifera*. Este trabajo muestra el potencial uso del alginato de *S. sinicola* como material para la inmovilización celular para el tratamiento de aguas residuales y para la promoción de crecimiento de plantas.

## PRODUCTION AND PROPERTIES OF ALGINATE FROM *S. SINICOLA* (SETCHELL Y GARDNER) AND ITS USE IN CELLULAR IMMOBILIZATION

### ABSTRACT

Alginate from *Sargassum sinicola* was produced as raw material to immobilize the microalga *Chlorella sorokiniana* and the microalga growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense*, for wastewater treatment and tomato plants growth promotion. During the extraction of the alginate, different steps on the production using the calcium chloride method were analyzed. The yield, production costs, viscosity, color, and phenolic compounds concentration were evaluated to optimize the process. Alginate composition and structure was analyzed by  $^1\text{H}$  NMR. Results were compared with commercially alginate from *Macrocystis pyrifera*. Using the optimized process the alginate yield was 15%, costing 7.8 USD  $\text{kg}^{-1}$ . Alginate from *S. sinicola* contains more guluronic acid (FG = 0.64) than mannuronic acid (FM = 0.38), and a viscosity of 100 mPa s (2 %). It shows a dark brownish color with more phenolic compounds than *M. pyrifera*. Despite these characteristics, the growth of *C. sorokiniana* and *A. brasilense* in *S. sinicola* alginate beads was not significantly different than growth in *M. pyrifera* alginate beads. The growth of *C. sorokiniana* was uniform inside the beads in both alginates, and the nutrients removal (phosphates and ammonium) from wastewater was similar ( $p \leq 0.05$ ). The growth of tomato plants inoculated with *S. sinicola* alginate microbeads was enhanced as good as with the *M. pyrifera* alginate. This study shows the potential use of *S. sinicola* alginate as raw material for cell immobilization for wastewater treatment and plant growth promotion.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. GENERALIDADES

En la zona costera de México se han reportado cerca de 1,114 especies de algas marinas, sin embargo, solo algunas de ellas se cosechan comercialmente como materia prima para la producción de ficocoloides. Las especies que se han explotado comercialmente en la Península de Baja California son *Gelidium robustum* (Gardner) Hollenberg & Abbott a partir de 1955, *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, *Chondracanthus canaliculatus* (Harvey) Guiry de 1966 a 1984, *Gracilaria pacifica* (ahora *vermiculophylla*) Abott desde 1993, y esporádicamente *Porphyra perforata* J. Agardh, *Euchema uncinatum* Setchell & Gardner y *Egregia spp* (Casas-Valdéz, 2001). De estas especies, *Macrocystis pyrifera* se ha explotado comercialmente en la parte norte de la península para su exportación, principalmente a Estados Unidos, donde se procesa para la producción de alginatos.

Los alginatos son uno de los principales componentes estructurales de la pared celular de las algas café (Van den Hoek, *et al.* 1995), cuya función principal es la de dar fuerza y flexibilidad a las algas. En su estado natural, los alginatos se presentan como una mezcla de sales de los cationes que comúnmente se localizan en el agua de mar, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$ , con el ácido algínico (McHugh, 1987, 2003). Las proporciones en las que estos iones están unidos por el alginato dependen de su composición así como a la selectividad de enlace de los cationes alcalinotérreos por el alginato.

La extracción de los alginatos se realizó por primera vez en 1881 por Stanford mediante extracción alcalina, pero su producción a nivel industrial inició en los Estados

Unidos hasta los años 1930's ([www.degusa.com](http://www.degusa.com)). La extracción se basa en una serie de reacciones de intercambio iónico que permiten extraerlo de la materia prima en particular, cuyo procedimiento se ha ido modificando y optimizando con el tiempo (McHugh, 2003), permitiendo la producción de distintos tipos de alginato con diferentes grados de calidad. A pesar de que el alginato de sodio es el alginato comercial más común, también se consumen las sales de amonio, calcio y potasio, así como el ácido algínico y su derivado de alginato de propilenglicol (Booth, 1975; Cottrell y Kovacs, 1980).

En los últimos años, la producción comercial de alginatos ha adquirido una mayor importancia en el ámbito de distintas industrias, alcanzando una producción global de 36-39,000 toneladas aproximadas en el 2002 (Marinalg International, McHugh, 2003). Su producción se concentra en unas cuantas empresas productoras de gran capacidad, cuatro de ellas con actividad en Europa y Estados Unidos, y dos en Japón (McHugh, 2003). Para asegurar su producción, estas empresas cuentan con diversos proveedores de materia prima alrededor del mundo, entre los que se encuentran los Estados Unidos, México, Chile, Escocia, Irlanda, Francia, Noruega, Islandia, Canadá, China, Japón, Corea, Australia y Sudáfrica. Algunas otras empresas de menor tamaño operan en Chile, Indonesia y China (McHugh, 1987, 2003).

La aplicación de los alginatos se basa en cuatro propiedades principalmente. La primera concierne a su habilidad como espesante al ser disuelto en agua, generando un aumento en la viscosidad de la solución en que se disuelve. La segunda a su capacidad de retener agua. La tercera se debe a su habilidad de formar un gel a partir de una serie de reacciones químicas de intercambio iónico que dan lugar a la formación de enlaces entre las cadenas adyacentes del polímero del alginato. Particularmente se realiza un intercambio de iones sodio por cationes divalentes o trivalentes. La cuarta se basa en la propiedad de

formar películas de alginato, ya sea de sodio o calcio, y fibras principalmente de alginato de calcio (McHugh, 1987, 2003; Cottrell y Kovacs, 1980; Degussa; ISP; Marinalg).

Entre las especies que se distribuyen en la península de Baja California con potencial para la extracción de alginatos se encuentra *Sargassum sinicola*. El contenido de alginato del género *Sargassum* muestra una variación estacional de acuerdo con los diferentes estadios de desarrollo de la planta, con un mayor contenido cuando la planta alcanza su madurez vegetativa (Chauhan, 1970; Aponte de Otaola; 1983; Hernández-Carmona, 1985), principalmente en los estipes de la planta. El rendimiento del contenido de alginatos de *Sargassum spp* en Baja California Sur, se ha estimado que varía entre 6.6 y 25% a lo largo del año (Hernández-Carmona, 1985; Casas-Valdez, 1985; Pérez-Reyes, 1997).

### **1.2. SARGASSUM SINICOLA**

Esta especie pertenece a la División Phaeophyta, Clase Pheophyceae, Orden Fucales, Familia Sargassaceae, y Género *Sargassum* (Lee, 1980). Dentro de esta División, las algas se caracterizan por su coloración café, el cual se deriva de la gran cantidad del carotenoide, fucoxantina y sus cloroplastos, así como de los taninos que presenta. Tienen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que rodean al protoplasto. La pared celular generalmente se compone de por lo menos dos láminas, con celulosa como el principal componente estructural. El componente amorfo de la pared celular consiste de ácido algínico y fucoidina, mientras que el mucílago y la cutícula se componen primariamente de ácido algínico (Lee, 1980).

El Orden Fucales presenta organismos parenquimatosos con crecimientos a partir de una célula apical. La generación haploide esta reducida al huevo y al espermatozoide con el

remanente del ciclo de vida diploide. Los gametos se generan en los conceptáculos, y la unión gamética es por oogamia. Los conceptáculos pueden estar esparcidos en la superficie del talo, pero frecuentemente se limitan a las puntas ensanchadas de los receptáculos. El género *Sargassum* es común en aguas tropicales y subtropicales. La forma de ramificación de la familia es monopodial, y todos los miembros tienen un sistema de ramificación lateral, con dos estructuras tipo hoja en la base con el remanente de un sistema de ramificación de aerocistos y receptáculos (Lee, 1980).

### **1.2.1. Descripción morfológica**

Al inicio de su desarrollo presenta un color verde olivo-café, así como un disco de fijación, un cauloide delgado y varios filoides alrededor. En esta etapa no presenta aerocistos, ni estructuras reproductoras. Posteriormente la coloración cambia a café y se desarrollan ramas secundarias en forma alterna al cauloide (Sánchez-Rodríguez, 1995).

Cuando alcanza su madurez presenta una talla promedio de 60 cm y tiene un aspecto frondoso, con un disco de fijación cónico con ápteras, y un estipe con cicatrices de 2 a 5 mm de ancho. De las ramificaciones secundarias se desprenden los filoides, los cuales tienen una nervadura central bien diferenciada, con margen dentado, y una longitud de 2 a 8 cm de largo y de 2 a 9 mm de ancho, observándose numerosos aerocistos a partir de la parte media hacia el ápice, los cuales son redondos y miden de 2 a 6 mm de diámetro. Presenta receptáculos dispuestos en la porción terminal del alga de 2 a 9 mm de longitud, con abundantes criptostomas en los filoides y aerocistos. Los receptáculos presentan una corteza y una capa de células cilíndricas con núcleos alargados, fuertemente pigmentados y varias capas de células en forma de celdas; entre estas se desarrollan los conceptáculos de forma más o menos ovalada que contienen los oogonios o anteridios y parafisas. Los

oogonios son de forma ovalada, observándose como una acumulación de pequeños gránulos que se disponen cerca de la pared del conceptáculo. Los anteridios, alargados y ramificados, son fuertemente basófilos, por lo que se observan teñidos de un color más intenso que las parafisas (Sánchez-Rodríguez, 1995).

Al final de su desarrollo pierde algunas estructuras como filoides, aerocistos, receptáculos y ramas primarias y secundarias; el rizoide y el alga en general se oscurecen y le crecen varios epibiontes. La composición química de la especie se muestra en la tabla 1.

Proteína cruda	9.21 %				
Cenizas	38.85 %	<i>Aminoácidos</i> (g 100g <sup>-1</sup> proteína)			
Extracto etéreo	0.58 %	<i>Valina</i>	4.24	<i>Ácido aspártico</i>	6.07
Fibra cruda	12.25 %	<i>Isoleucina</i>	3.70	<i>Serina</i>	2.82
Extracto libre de Nitrógeno	39.98 %	<i>Treonina</i>	2.95	<i>Ácido glutámico</i>	10.23
Energía bruta	2.15 Mcal gr <sup>-1</sup>	<i>Triptofano</i>	1.03	<i>Prolina</i>	2.62
• Magnesio	7014±114 ppm	<i>Fenilalanina</i>	2.73	<i>Glicina</i>	3.23
• Potasio	68004±1921 ppm	<i>leucina</i>	5.33	<i>Alanina</i>	4.97
• Sodio	20668±1396 ppm	<i>Lisina</i>	3.88	<i>Cisteina</i>	0.80
• Calcio	5007±375 ppm	<i>Metionina</i>	1.54	<i>Tirosina</i>	2.97
• Fósforo	449±30 ppm	<i>Histidina</i>	1.31	<i>Arginina</i>	5.35
Fuente: Pérez-Reyes, 1997, Casas-Valdez, 2004					

**Tabla 1. Composición química de *Sargassum sinicola* en el Golfo de California, B.C.S.**

### 1.2.2. Distribución y abundancia

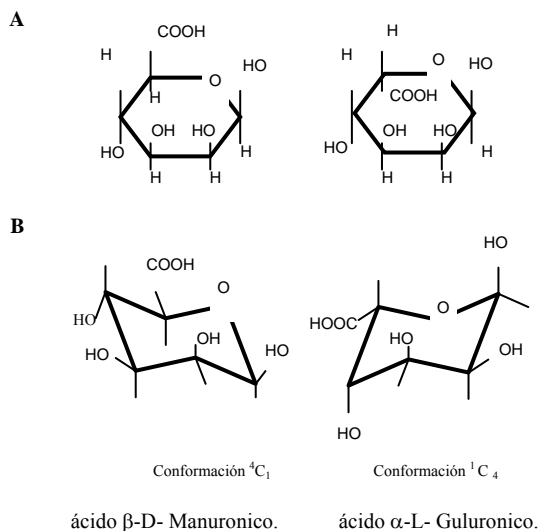
México tiene grandes cantidades del género *Sargassum*, principalmente en aguas templadas. En la parte sur del Golfo de California, este género domina sobre otras especies, cubriendo grandes extensiones en las zonas submareal e intermareal (Hernández-Carmona, *et al.* 1990). La biomasa estimada para la costa oeste del Golfo de California es de 154,000 ± 16,000 tons peso húmedo (Pacheco-Ruíz, *et al.* 1998), en tanto que en la Bahía de La Paz se calculan 18,900 ± 927 (Hernández-Carmona, *et al.* 1990), y 7,250 ± 530 en Bahía Concepción (Casas-Valdéz, *et al.* 1993). Sin embargo, a pesar de la biomasa que presenta este género en la región y en general en México, su utilización como fuente de alginato y

su potencial económico no se han explotado (Hernández-Carmona, 1985; Casas-Valdéz, 1985; Li, *et al.* 1999).

### 1.3. ASPECTOS GENERALES DE LOS ALGINATOS

La palabra “alginato” se refiere a un grupo de polisacáridos que se encuentran en todas las algas cafés. Su estructura está formada de co-polímeros binarios no ramificados de ácido urónico, los cuales son bio-sintetizados mediante enzimas específicas que catalizan la formación de los monómeros de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M; 1,4-enlace ácido  $\beta$ -D-mannopyranosyluronic  ${}^4C_1$ ) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G; 1,4-enlace ácido  $\alpha$ -gulopyranosyluronic  ${}^1C_4$ ), unidos por enlaces C-1 y C-4 (Hirst, *et al.* 1964; Valencia, 1995) (figura 1).

Las cantidades relativas de ambos monómeros, así como su ocurrencia y arreglo secuencial en la cadena polimérica, se relacionan con el origen del alginato, de manera que existe una influencia tanto ambiental como genética para su conformación estructural. Las cadenas pueden tener una región en bloques compuesta exclusivamente de una unidad o de otra (Bloques MM o GG), y regiones en bloque de ambos ácidos (Bloques MG o GM), las cuales se distribuyen azarosamente en la cadena (Haug, *et al.* 1966). El tamaño particular de las regiones en bloque de los monómeros, su forma de unión en la cadena y/o su estructura secuencial (tasa M/G), da lugar a una geometría y composición



**Figura 1 A. Fórmulas clásicas de los monómeros del ácido algínico. B. Estructura de silla.** Modificado de McHugh, 1987.



específica del alginato, y en consecuencia, provee de propiedades diferentes al polímero (McHugh, 1987; Skjåk-Bræk, & Martinsen, 1991a), tales como su viscosidad y la habilidad de intercambiar iones con metales divalentes, entre otras (King, 1983; Shymali, *et al.* 1984; Castillo-Ferrer, 1993). Estas propiedades son importantes para la selección de la materia prima para la producción del alginato, así como por la disponibilidad de organismos-especies de algas particulares y a las propiedades específicas del alginato que presentan. Por ejemplo, los alginatos que presentan grandes regiones de bloques-G dan lugar a la formación de un gel de fuerza alta, mientras que los alginatos que presentan grandes regiones de bloques-M dan lugar a la formación de un gel de fuerza media pero con una alta resistencia a la sinéresis (Smidsrød y Haug, 1972). La composición estructural del alginato de algunas especies de importancia comercial se muestra en la tabla 2.

Fuente del alginato	F <sub>G</sub>	F <sub>M</sub>	F <sub>GG</sub>	F <sub>MM</sub>	F <sub>MG=GM</sub>
<i>Ascophyllum nodosum</i>	0.23	0.77	0.10	0.64	0.16
<i>Durvillaea antártica</i>	0.29	0.71	0.15	0.57	0.14
<i>Ecklonia máxima</i>	0.45	0.55	0.22	0.32	0.23
<i>Laminaria japonica</i>	0.35	0.65	0.18	0.48	0.17
<i>L. digitata</i>	0.41	0.59	0.25	0.43	0.16
<i>Lessonia nigrescens</i>	0.38	0.62	0.19	0.43	0.19
<i>Macrocystis pyrifera</i>	0.38	0.62	0.18	0.42	0.20

Fuente: Cottrell y Kovacs, 1980; McHugh, 1987.

**Tabla 2. Composición monomérica de algunos alginatos según su fuente de origen.**

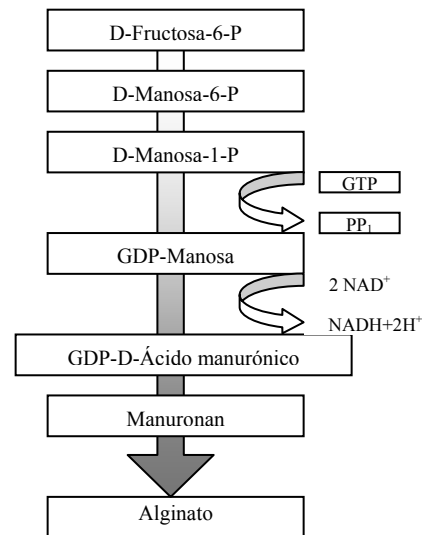
### 1.3.1. Biosíntesis

La estructura de un alginato esta relacionada con su biosíntesis. El alginato inicialmente es producido como polimanuronato, el homopolímero de bloques-M, para posteriormente ser epimerizado para formar el copolímero binario (Larsen, 1981). Una o varias epimerasas actúan a nivel del polímero de manera que controlan el cambio enzimático de unidades M a G en ciertas regiones de la cadena. Sin embargo, el mecanismo de las reacciones enzimáticas depende de diferentes factores (Larsen, 1981).

La figura 2, muestra el esquema general de la biosíntesis de los alginatos de acuerdo a Draget, *et al.* (2002). La transformación de unidades M a G, se incrementa conforme el tejido de la planta es mayor, y por tanto tendrá más regiones de bloques-G y más largos (Onsoyen, 1989).

### 1.3.2. Aplicación de los alginatos

La habilidad de los alginatos de modificar las propiedades físicas de las soluciones acuosas para formar gel, emulsificar, estabilizar, y para restringir la evaporación del agua de superficies expuestas, ha permitido numerosas aplicaciones en la industria (Booth, 1975), tabla 3. Estas propiedades pueden ser modificadas por la adición de sales metálicas, especialmente iones de calcio, fosfatos y por la acidez de las mezclas, lo cual ha permitido la producción de productos mezclados para distintas industrias.



**Figura 2. Biosíntesis de los alginatos.** Draget *et al.* (2002)

productos mezclados para distintas industrias.

Sector	Demanda total (%)
Impresión de textiles	50
Alimentos	30
Papel	6
Barras de Soldadura	5
Farmacéuticos	5
Otros	4

Fuente: McHugh, 2003

**Tabla 3. Principales aplicaciones de los alginatos**

Numerosos estudios han verificado la seguridad del uso de los alginatos en los alimentos. El alginato de sodio, potasio, calcio, amonio, ácido algínico y alginato de propilenglicol están incluidos en la lista de aditivos alimenticios que son reconocidos como inocuos y seguros, según la FDA (Food and Drugs Administration) de los Estados Unidos de América. También están enlistados en el Codex Alimentarius que provee la FAO

(Food and Agriculture Organization) y la WHO (World Health Organization) de las Naciones Unidas donde se establece que los límites de ingesta diaria para los humanos del ácido algínico y de sus sales derivadas es de 50 mg Kg<sup>-1</sup> de peso, y del alginato de propilenglicol de 25 mg Kg<sup>-1</sup>. Los principales productos alimenticios en los que se utilizan los alginatos incluyen los postres, productos de pan, aderezos de ensaladas, alimentos prefabricados, bebidas, y gel de repostería. También son de gran utilidad para varios procesos industriales donde actúan como retenedores de agua, gelificadores, emulsificadores, ligantes y estabilizadores de distintos materiales (P. ej. revestimientos de papeles, adhesivos, impresión de textiles, pulidores, anti espumantes, cerámicas, vigas, limpiadores, explosivos, juguetes, componentes de combustión, entre otros materiales) (Cottrell y Kovacs, 1980, McHugh, 1987, 2003).

### **1.3.3. Mercado de alginatos en México**

Durante el periodo de 1980-2000, México ha importado un promedio de 215 toneladas de alginatos por año, principalmente de los Estados Unidos de Norteamérica, Francia, Reino Unido, Corea del Sur, Alemania y Dinamarca (Banxico, *comm escr.*).

La tasa de importación de los alginatos se ha incrementado casi constantemente de 1986 a la fecha, alcanzando en promedio del año 1999 al 2001 cerca de 348 toneladas, con un valor aproximado en el mercado de 5.6 millones de dólares (figura 3). Los principales productos importados de 1999 al 2001 fueron el alginato de propilenglicol (201 t a ≈20.46 USD kg<sup>-1</sup>), alginato de sodio (125 t a ≈12.36 USD kg<sup>-1</sup>), alginato de magnesio, calcio y amonio (9 t a ≈20.20 USD kg<sup>-1</sup>), alginato de potasio (8 t a ≈14.72 USD kg<sup>-1</sup>) y ácido algínico (5 t a ≈29.05 USD kg<sup>-1</sup>).

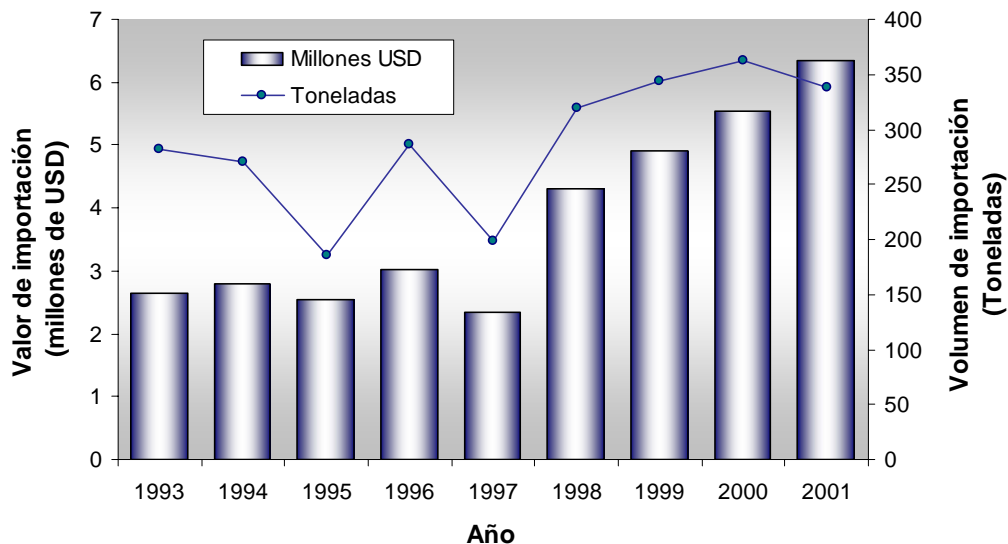
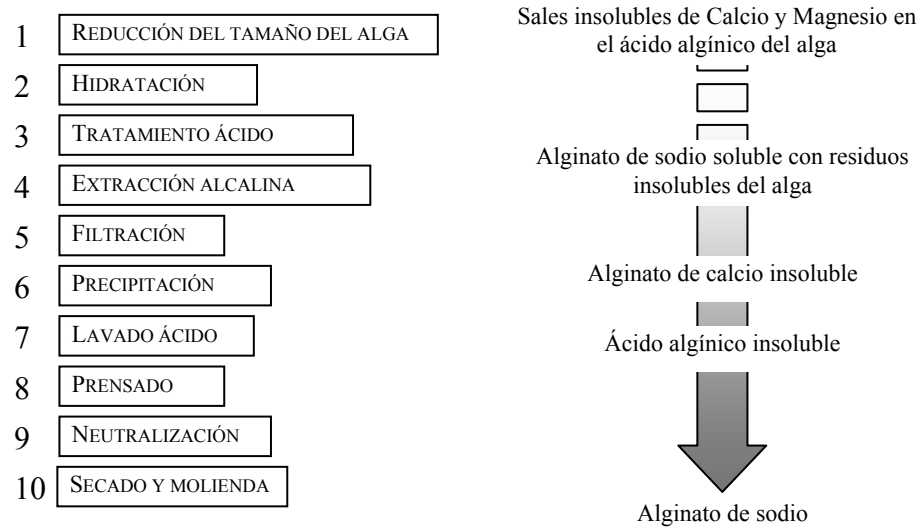


Figura 3. Importación de alginatos en México (1993-2001).

#### 1.4. PRODUCCIÓN DE ALGINATO. -MÉTODO DE CLORURO DE CALCIO-

La producción de los alginatos se basa en un número de reacciones de intercambio iónico que facilitan la extracción del ácido algínico del alga en forma de alginato de sodio. El ácido algínico fue descubierto por primera vez en el año 1881 por Stanford, pero no fue sino hasta 1950 cuando Bashford, *et al.* y después Haug (1964), propusieron la transformación del ácido algínico, insoluble en agua, a alginato de sodio mediante dos reacciones de intercambio iónico. Actualmente se han desarrollado diversas modificaciones en las diferentes etapas del proceso, para mejorar la producción de los alginatos (Lukachyov y Pochkalov, 1965; Secconi, 1976; Duville, *et al.* 1974; Casas-Valdez, 1975, 1982; Hernández-Carmona y Casas-Valdez, 1985; Hernandez-Carmona y Aguirre-Vilchis, 1987; McHugh, 1987; Hernández-Carmona, *et al.* 1991, 1992, 1999a, 1999b, 2002; Arvizu-Higuera, *et al.* 1995; McHugh, *et al.* 2001). De manera general, el proceso para obtener alginato de sodio consiste en los siguientes pasos (figura 4):



**Figura 4. Proceso de producción de alginato de sodio**

*Reducción* del material o molienda. *Hidratación* del alga molida y seca, con una solución de formaldehído. *Pre-extracción* con ácido clorhídrico para convertir el alginato combinado con sus sales a ácido algínico. *Extracción* alcalina con carbonato de sodio a alta temperatura para convertir el ácido algínico a la forma soluble y *filtración* de la solución para remover los residuos insolubles del alga. *Precipitación* con cloruro de calcio para convertir el alginato soluble a alginato de calcio. *Conversión* a ácido algínico con ácido clorhídrico. *Conversión* a alginato de sodio con una mezcla alcalina de alcohol agua. *Prensado, secado y reducción* del producto obtenido a un tamaño apropiado, para su empaquetamiento. A partir de este proceso general, existen diferentes cambios físicos y químicos que pueden ser realizados para obtener productos específicos para usos diferentes.

### 1.5. INMOVILIZACIÓN CELULAR

La capacidad de gelificación de los alginatos ha sido aprovechada para la inmovilización de diferentes reactivos bio-activos como bacterias, algas, hongos, células de

plantas, y células de animales, ya sea de manera única o en combinación. Estos reactivos inmovilizados pueden ser utilizados en varios procesos, tales como en la remoción de nutrientes de aguas residuales (de-Bashan, *et al.* 2002), para la promoción del crecimiento de plantas mediante inoculantes (Bashan, 1986, 1998; Bashan, *et al.* 2002), en la producción de etanol a partir de almidón (McGhee, *et al.* 1984), producción de ácido cítrico, producción continua de yogurt (Prevost, *et al.* 1985), producción de acetona y butanol, producción de glicerol (Grizeau y Navarro, 1986), entre muchos otros procesos.

En la actualidad, la industria de la biotecnología en aplicaciones biomédicas ha tenido un crecimiento asombroso. Las principales áreas de interés se han desarrollado en la producción de fármacos como los antibióticos, y en el desarrollo de sistemas de cultivo celular para la producción de anticuerpos monoclonales y proteínas de mamíferos. Las cápsulas de alginato, también permiten su aplicación como sustrato de protección para distintos componentes bióticos, como por ejemplo los protoplastos de plantas (Pati, *et al.* 2002). La matriz de gel provee a las células una barrera protectora contra infecciones, estrés mecánico, y desecación, por lo que se han encontrado nuevas aplicaciones en el manejo masivo de células, además de que permite un mejor manejo de las mismas. Sin embargo, existen algunas consideraciones importantes para la selección del tipo de alginato a utilizar (Skjåk-Bræk, y Martinsen, 1991a).

*Estructura.* La selección del tipo de alginato requiere algunos conocimientos de su estructura química y su relación con las propiedades funcionales. Los monómeros se acomodan en un patrón de bloque en la cadena polimérica, y las proporciones y arreglo secuencial de los residuos de ácido urónico son la principal característica estructural relacionada con la afinidad a iones divalentes, esenciales para las propiedades gelificantes del alginato. El alginato de *Macrocystis pyrifera* es el más utilizado para la inmovilización

celular, el cual provee de geles con una fuerza y estabilidad baja en comparación con el alginato de otras fuentes (p. ej. *Laminaria hyperborea*), pero es mejor que otros con el mismo contenido de ácido gulurónico. Se ha demostrado que las propiedades mecánicas son altamente dependientes de la composición monomérica de las moléculas del alginato, así como de la estructura de bloque y su tamaño molecular (Skjåk-Bræk, y Martinsen, 1991a).

*Propiedades mecánicas.* Las propiedades de las esferas de alginato dependen mucho de la composición del alginato. La fuerza mecánica de los geles de alginato está determinada principalmente por la composición química y la estructura de bloque. Las esferas de alginato con una mayor fuerza mecánica, una menor reducción y la mayor estabilidad contra cationes monovalentes están formadas por los alginatos con un alto contenido de residuos G, mayor a 70%, y una extensión en promedio cercano a 15 ( $F_G$ ). Sin embargo, la fuerza de gel depende fuertemente del peso molecular y existe un cierto peso molecular en donde las propiedades de formación de gel del alginato cambian rápidamente, principalmente en alginatos de peso molecular bajo (Skjåk-Bræk, y Martinsen, 1991a).

*Estabilidad química.* La principal limitante en el uso de alginato de calcio para el inmovilizado de células es su sensibilidad contra agentes quelantes (p. ej. fosfatos y lactatos), o cationes no gelificantes (p. ej. Magnesio y Sodio).

*Porosidad.* La difusión es esencial para el uso de geles de alginato, y por tanto la estructura del tamaño de poro y su distribución son factores importantes a conocer. Las estructuras de poro más abiertas se presentan en las esferas de alginatos con mayor contenido de residuos G, y esto permite una mayor difusión para moléculas mayores como las proteínas (Martinsen, *et al.* 1992).

## 2. ANTECEDENTES

En México la producción de los alginatos se ha llevado a cabo a nivel de investigación desde los años 70's. La mayoría de los trabajos realizados se enfocan a la cuantificación del contenido de alginato para diferentes especies (Casas-Valdéz, 1975, González, 1983, Hernández-Carmona, 1985). Algunos de estos trabajos abordan modificaciones en el proceso de producción, principalmente con *M. pyrifera* que es una de las especies más abundantes en la península de Baja California (Casas-Valdéz, 1982, Ortega y Zaragoza, 1983, Hernández-Carmona y Casas-Valdéz, 1985, Hernández-Carmona y Aguirre-Vilchis, 1987, Hernández-Carmona, *et al.* 1991,1992, 1999a, 1999b, y 2001, Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991, Reyes-Tisnado, *et al.* 2000, Arvizu-Higuera, *et al.* 1995).

El rendimiento que se ha obtenido de la extracción de alginatos de la especie *S. sinicola* ha mostrado una variación estacional, local e individual relacionada con las características ambientales y a la especie (Casas-Valdez, 1982; Hernández-Carmona, 1985; Pérez-Reyes, 1997). Sin embargo, estas variaciones también son reflejo del proceso de extracción, aunque no se ha evaluado el costo operacional de cada proceso. Por ejemplo, Casas-Valdéz, en 1982, reporta un rendimiento de hasta 25 % en la extracción de *S. sinicola*, aunque, específicamente en la localidad de San Juan de la Costa, B.C.S., únicamente obtiene un 15 % de rendimiento. Hernández-Carmona, 1985, reporta en la misma zona un 22.8% de rendimiento en invierno, 24.8% en primavera y 21.3% en verano, mientras que Pérez-Reyes, 1997, reporta un rendimiento máximo de 10%. Dichos trabajos se enfocan a la cuantificación del alginato, sin analizar las características del mismo.



Entre las aplicaciones más novedosas de los alginatos se encuentra la inmovilización celular (Skjåk-Bræk, y Martinsen, 1991b). Recientemente se ha evaluado la utilidad del género *Chlorella* en la remoción iónica de amonio y fósforo en aguas residuales, inmovilizada en geles de alginato de *M. pyrifer* (Valderrama, *et al.* 2002; de-Bashan, *et al.* 2002, 2004). La incorporación de los microorganismos en el medio residual a partir de esferas de inmovilización, permite una fácil remoción, una vez que elimina los nutrimentos indeseables (de la Noüe, *et al.* 1990), lo que abarata los costos operacionales. La remoción de ambos iones ha sido exitosa, sobre todo cuando se encuentra co-inmovilizada con la bacteria promotora de crecimiento de plantas *A. brasilense* (Gonzalez y Bashan, 2000; Lebsky, *et al.* 2001; de-Bashan, *et al.* 2004). Así mismo, se ha utilizado el alginato de *M. pyrifer* para la inoculación de semillas de plantas con la bacteria *A. brasilense*, donde se ha observado un mayor crecimiento en la plantas inoculadas con la bacteria (Bashan, *et al.* 2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Aunque en México se han estudiado diferentes etapas de la producción de alginatos de algunas algas café, existe mucha información relevante sin concluir sobre la producción de alginato de *Sargassum sinicola*. La información que se tiene para esta especie se encuentra limitada a la cuantificación del rendimiento del alginato (Casas-Valdez, 1982; Hernández-Carmona, 1985; Pérez-Reyes, 1997), sin determinar las características del mismo, los costos de producción, ó alguna aplicación posible para el producto.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de producción de los alginatos incluye diferentes etapas, cada una de las cuales interfiere en la calidad del producto que se obtiene (McHugh, 1987). Debido a que las características tanto físicas como químicas de las algas cafés cambian de una especie a otra, es necesario analizar el efecto de distintas variables durante las principales etapas de producción del alginato y adecuarlo a cada especie. Dicho análisis es necesario realizarlo tanto a nivel laboratorio como planta piloto, lo cual permitiría tener un mayor control en las variables que intervienen en su producción, de manera que se pueda optimizar el proceso al mejor precio. Así mismo, es necesario determinar las propiedades específicas del alginato que se obtiene, de tal forma que se pueda establecer un proceso de producción de acuerdo al uso específico que se le quiera dar al alginato, y así evitar gastos innecesarios. Esta información no solo permitirá hacer recomendaciones pertinentes a la industria sino también tener un mayor control en el costo-beneficio del producto obtenido.

Los geles de alginato han probado ser un medio muy exitoso para encapsular biocatalizadores, especialmente cuando se forman como esferas de gel (Skjåk-Bræk, y Martinsen, 1991b). Su preparación requiere de un proceso relativamente fácil de realizar

(Bashan, 1986), cuya principal ventaja es su naturaleza no tóxica, bio-degradabilidad, y lenta liberación de los reactivos encapsulados. Los encapsulados de la microalga *Chlorella*, de la división Chlorophyceae, recientemente han sido utilizado para la remoción de nutrimentos de aguas residuales, principalmente para la remoción iónica de amonio y fósforo (de-Bashan, *et al.* 2002, 2004), con la idea de proveer un tratamiento terciario de los efluentes urbanos y agrícolas, y así evitar los problemas de eutrofización que se generan cuando se descargan en cuerpos de aguas naturales (de la Noüe, *et al.* 1990). La inmovilización permite que, una vez que son removidos los iones de interés, la microalga se retire del medio de manera fácil y económica, sin embargo el proceso aún presenta altos costos operacionales por lo que no ha sido implementado. La producción de un alginato a un menor costo puede ser un factor importante para su implementación, por lo que la producción del alginato de *S. sinicola* puede ser prometedora para dicha aplicación. Este alginato también podría ser utilizado para la inoculación de semillas con microorganismos que promuevan el crecimiento de plantas para optimizar su producción.

## 4. HIPÓTESIS

### 4.1. HIPÓTESIS I. PRODUCCIÓN DE ALGINATO DE *S. SINICOLA*

La modificación de diferentes factores físicos y químicos durante el proceso de obtención de alginato a partir de *Sargassum sinicola* puede incrementar el rendimiento y calidad del alginato, por arriba de los valores reportados.

### 4.2. HIPÓTESIS II. INMOVILIZACIÓN CELULAR

El alginato de *Sargassum sinicola* puede ser utilizado para la inmovilización y co-inmovilización de *Chlorella vulgaris* y/o *Azospirillum brasilense* para su aplicación en la remoción de nutrientes de aguas residuales y como promotores de crecimiento de plantas.

## 5. OBJETIVOS

- 1) Establecer un procedimiento adecuado para la producción de alginato de sodio de *Sargassum sinicola*, evaluando el efecto de diferentes factores físicos y químicos tanto a nivel laboratorio como planta piloto.
  - a) Analizar diferentes etapas durante la producción de alginato de sodio de *Sargassum sinicola*.
    - i) La concentración adecuada de formaldehído para la hidratación del alga.
    - ii) El efecto de la pre-extracción ácida en sistema de flujo continuo y sistema de carga.
    - iii) El efecto de diferentes temperaturas y tiempo de extracción
    - iv) La cantidad de hipoclorito de sodio para el blanqueado adecuado del alga.
  - b) Evaluar algunas características del alginato obtenido
    - i) Rendimiento
    - ii) Viscosidad
    - iii) Color
    - iv) Proporción de fracciones de ácido Gulurónico y Manorónico
    - v) Costos de producción
- 2) Producir encapsulados de alginato de *Sargassum sinicola* y determinar su aplicación en la remoción de nutrientes de aguas residuales y en la promoción del crecimiento de plantas.

- a) Preparación de inmobilizados de *Chlorella vulgaris* y/o *Azospirillum brasilense* en alginato de sodio de *Sargassum sinicola* con su control de *Macrocystis pyrifera*.
  - i) Evaluar el crecimiento celular
- b) Establecer su aplicación en la remoción de nutrientes de agua residual y en la promoción de crecimiento de plantas.
  - i) Determinar la remoción de amonio y fosfatos en agua residual sintética
  - ii) Establecer la reducción luminosa por la coloración del alginato
  - iii) Evaluar el crecimiento de plantas de jitomate inoculadas con inmobilizados de *Azospirillum brasilense* en alginato de *Sargassum sinicola*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. COLECTA DE MATERIAL**

Se colectaron muestras de *Sargassum sinicola* en el Sausozo, San Juan de la Costa, Baja California Sur, México, durante Mayo-Junio del 2001 y 2002. Las colectas se realizaron cortando los talos del alga con un cuchillo, cerca del rizoide, usando equipo SCUBA a una profundidad de 3-5 m. Las muestras fueron deshidratadas al sol y molidas a un tamaño de malla de 40 y mezcladas, colocándolas en bolsas harineras para su almacenamiento hasta la realización del procedimiento experimental.

### **6.2. PRODUCCIÓN DE ALGINATO DE SODIO DE *S. SINICOLA***

#### **6.2.1. Producción a nivel laboratorio**

##### **6.2.1.1. Hidratación**

Se tomaron 30 g de alga seca y molida, los cuales se hidrataron durante 12 hrs en una solución de 250 mL agua con diferentes concentraciones de formaldehído: 0.0 (control), 0.2, 0.4, y 0.6%. Transcurrido el tiempo de hidratación, la solución se drenó, y se prosiguió con la pre-extracción del alginato, por medio del sistema de carga, colocando el extracto en 450 mL de agua, adicionando suficiente HCl hasta alcanzar un pH de 4, y manteniendo una agitación constante durante 15 min. Posteriormente las algas se drenaron nuevamente y se colocaron en 750 mL de agua para llevar a cabo la extracción alcalina, ajustando el pH a 10 con una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% y elevando la temperatura a 80° C, en baño maría durante 2 hrs, con agitación constante a 800 rpm.

La muestra obtenida se filtró con un filtro revestido de tierra de diatomeas con la ayuda de una bomba al vacío. La solución resultante se mezcló con una cantidad similar de alcohol para obtener las fibras de alginato de sodio, las cuales se drenaron y prensaron para posteriormente mantenerlas en secado por 16 hrs en un horno a temperatura de 35°C o hasta alcanzar una humedad de 12%. Cada procedimiento experimental se llevó a cabo por triplicado con un control sin formaldehído para cada caso, y se llevó a cabo la determinación del rendimiento y calidad del alginato según se describe posteriormente.

Adicionalmente se determinó el efecto de la hidratación con formaldehído durante dos tiempos (12 y 36 hrs), y con 1, 2 y 3 repeticiones simultáneas del proceso de hidratación. En cada repetición se drenó la solución de formaldehído al 0.4%, para colocar una nueva en un periodo de 12 hrs, con un control sin formaldehído.

#### 6.2.1.2. Pre-extracción en sistema de flujo continuo y sistema de carga

Una vez establecida la concentración de formaldehído adecuada, el tiempo y las repeticiones necesarias durante la hidratación, se comparó el proceso de pre-extracción mediante un sistema de flujo continuo contra el sistema de carga. Para la pre-extracción en el sistema de carga se utilizaron dos tratamientos. Después de la hidratación, las algas se colocaron en 450 mL de una solución ligeramente ácida con HCl (pH 4 o pH 2) con agitación constante durante 15 min. Después de la pre-extracción el proceso se llevó a cabo como se describió anteriormente, y se evaluó el rendimiento y calidad del alginato. Para la pre-extracción en sistema de flujo continuo, después de hidratar las algas durante la noche, se utilizó el sistema descrito por Myklestad (1968). Se hizo circular una solución de ácido clorhídrico a través de un reactor con el alga a una tasa de flujo de  $160 \text{ mL min}^{-1}$ , durante



15 min con agitación constante a 800 rpm, en dos tratamientos, a pH 1 y 2. Posterior a la pre-extracción el procedimiento se realizó como se describió anteriormente.

Durante la pre-extracción, se colectaron muestras del efluente para calcular la cantidad de calcio que se elimina de las muestras, según el método descrito por Schwarzenbach y Flaschka (1969): 10 mL de la solución muestra se le agregó 1 mL de solución Buffer pH 10. Se agitó y se agregó una pizca de ericromo negro y se volvió a agitar. Finalmente se tituló la muestra con una solución de NEDTA 0.07566 N. Para corregir los valores de calcio intercambiado, se realizó un tratamiento control en el que se hidrataron las algas durante 12 hrs, para posteriormente realizar la pre-extracción bombeando en el reactor agua destilada únicamente. El valor obtenido corresponde a las sales de calcio libres, el cual fue sustraído de la cantidad total de calcio de las muestras experimentales.

#### 6.2.1.3. Temperatura y tiempo de extracción alcalina

Después de la hidratación y de la pre-extracción ácida, previamente seleccionadas, se realizó la extracción alcalina del alga. Las algas se colocaron en una solución acuosa (750mL) y se adicionó suficiente solución de carbonato de sodio al 10 % hasta alcanzar un pH de 10. Las muestras se colocaron en baño maría a dos temperaturas: 70 y 80° C, durante 1, 1.5, 2 y 2.5 horas, con una agitación constante a 800 rpm y manteniendo el pH a 10. Las siguientes etapas se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente y de igual forma se determinó el rendimiento y las características del alginato.

#### 6.2.1.4. Blanqueado

Se llevo a cabo el proceso de producción a nivel planta piloto y se tomaron cuatro muestras de fibras de alginato de calcio de 20 g, se prensaron y diluyeron en 200 mL de agua y se trataron con las siguientes concentraciones de hipoclorito de sodio: 0.0, 1.5, 2, 2.5 mL). El alginato de calcio ya blanqueado en el laboratorio fue tratado con ácido clorhídrico para obtener fibras de ácido algínico en su forma fibrosa y se convirtió en alginato de sodio por neutralización con carbonato de sodio como se describe posteriormente.

#### **6.2.2. Producción a Nivel Planta Piloto**

Una vez establecidos los parámetros físico-químicos para las etapas de hidratación, pre-extracción, y extracción a nivel laboratorio, se llevó a cabo la valoración a nivel planta piloto mediante la siguiente metodología. 10 Kg de alga molida y seca, se mantuvieron en hidratación durante una noche en un tanque con 50 L a la concentración de formaldehído establecida en el laboratorio (0.4%), y con una agitación de 15 min.

La pre-extracción también se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos a nivel laboratorio, en el sistema de flujo continuo o de carga, utilizando para esto un tanque de 200 L, el cual se mantuvo en agitación constante (Hernández-Carmona, 1999a). Durante esta etapa se tomaron muestras del líquido residual para valorar el intercambio iónico de Ca/H comparado con los resultados obtenidos en el laboratorio. Posteriormente el alga se transportó a un tanque marmita con 250 L de agua, elevando la temperatura según lo establecido a nivel laboratorio (80°C), y ajustando el pH a 10 con carbonato de sodio en polvo, con agitación constante durante 2 horas. Durante este tiempo se colectaron muestras

de 300 mL de la solución a intervalos de 15 min., para medir la viscosidad en el laboratorio con el procedimiento antes descrito, y de esta forma determinar el tiempo de extracción.

La pasta obtenida se transfirió a un tanque de dilución, adicionando suficiente agua a una temperatura de 70° C hasta alcanzar una viscosidad de 45 mPa s según Hernández-Carmona, *et al.*, 1999b. La solución resultante se filtró con un filtro rotatorio al vacío revestido con tierra de diatomeas (Hernández-Carmona, *et al.* 1999b), con una cuchilla con avance de 0.1mm cada 3.5 s y una rotación del tambor de 2 rpm. Durante la filtración, la solución de alginato se bombeo a un tanque de precipitación (1700 L capacidad total), donde simultáneamente una solución de cloruro de calcio al 10 % se adicionó para precipitarlo como alginato de calcio, utilizando una proporción de 2.2 partes de cloruro de calcio por 1 parte de solución de alginato, en agitación constante. Al término de la precipitación, la solución residual se drenó en una cama de malla de metal (US sieve series No 18; 165 x 80 x 29) con un área de filtración de 1.32m<sup>2</sup>, y se colectaron las fibras de alginato de calcio obtenidas. Posteriormente se colocaron en un tanque con 150 L de agua, agregando 700 mL de hipoclorito de sodio al 5% con agitación constante durante 15 min. Posteriormente se drenó la solución residual, y las fibras de alginato de calcio se procesaron a ácido algínico mediante tres lavados ácidos con ácido clorhídrico a pH 2, 1.8 y 1.8, en una dilución con 150 L de agua (McHugh, *et al.* 2001).

En cada paso la solución residual se drenó, y al término de los lavados el ácido algínico se prensó con una prensa hidráulica para eliminar el exceso de agua. El precipitado se pesó, separando las fibras manualmente para facilitar su conversión a alginato de sodio. Las fibras se colocaron en una mezcladora de doble planetario, con una mezcla de alcohol-agua (45:55 %), y se adicionó suficiente carbonato de sodio en polvo hasta que la solución alcanzó un pH de 7 (Hernández-Carmona, *et al.* 2002).

El producto se prensó nuevamente, y las fibras se separaron manualmente para dejarlas secando en un horno a 50° C durante el tiempo necesario hasta alcanzar una humedad del 12%. Al producto resultante se le determinó el rendimiento y se realizaron las pruebas de calidad.

### **6.3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO**

#### **6.3.1. Determinación del rendimiento**

El rendimiento del alginato se calculó en base al peso del alginato obtenido de acuerdo al peso inicial del alga seca:

$$\text{Rendimiento} = (\text{Peso seco alginato} / \text{peso seco alga})$$

#### **6.3.2. Viscosidad**

La viscosidad se determinó con una solución de alginato al 2% a 22° C de temperatura, utilizando un viscosímetro de Brookfield™ modelo LVTDV-1 a 60 rpm, con la aguja apropiada. Después de la primer evaluación de la viscosidad, a la solución de alginato se le adicionó 0.5% de hexametáfosfato de sodio para secuestrar cualquier ión de calcio presente y la viscosidad final se midió nuevamente para establecer el porcentaje de reducción.

#### **6.3.3. Costos de producción**

Para cada procedimiento experimental se evaluaron los costos de producción aproximados por kilogramo de alginato de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Precio por kg alginato} = \text{Materia prima} + \text{suministros} + \text{mano de obra} + \text{mantenimiento (6 \% de la inversión)} + \text{seguro contra accidentes (2 \% de la inversión)} +$$

*empaquete del producto + gastos administrativos (15 % de la inversión) + investigación y desarrollo (5 % de la inversión) + depreciación a 11 años.*

En base a una inversión inicial de 1,000,000 USD para la implementación de un complejo industrial de producción. La producción anual estimada se calculó de acuerdo al rendimiento obtenido y al procesamiento de 3600 kg de alga seca, en 24 ciclos diarios durante 312 días por año (ANEXO 1).

Para cada procedimiento experimental se calcularon los costos de producción según las modificaciones de la materia prima necesaria para el procesamiento, haciendo la estimación a nivel planta piloto de acuerdo al método de producción de alginato de calcio:

**Materia prima** = *Costo de algas + formaldehído + ácido clorhídrico + Carbonato de sodio + Tierra de diatomeas + Cloruro de calcio + Hipoclorito de sodio + Alcohol.*

#### **6.3.4. Coloración**

Se determinó el color del alginato seco (en forma de grano) y en dilución. Para la determinación en seco se utilizaron las tablas de color para sedimentos de Munsell, (2000), en tanto que para el alginato en solución se utilizó la técnica de determinación espectrofotométrica para color de Hardy, (1936) (ANEXO 2), en la que se prepara una solución de alginato de sodio al 1.25 %, la cual se filtra para remover cualquier partícula suspendida, y se mide la coloración como porcentaje de transmitancia en un espectrofotómetro (Unico, UV-2800, Ridge Road, NJ, USA), con la técnica de 10 ordenadas. La coloración también se determinó para el alginato de *M. pyrifera*<sup>SIGMA</sup> como control.

### **6.3.5. Concentración de compuestos fenólicos**

Se determinó la concentración de polifenoles en el alginato de *S. sinicola* en solución al 1 %, mediante la técnica colorimétrica de Folin-Ciocalteu, de acuerdo al “Current protocols in food analytical chemistry”, Waterhouse, (2002) (ANEXO 3), así como de su control de *M. pyrifera*.

### **6.3.6. Restricción de luz**

Se prepararon 3 tubos de gel del alginato de *S. sinicola* y 3 del alginato de *M. pyrifera*, adicionando 50mL una solución de alginato (200 mPa s) en un cilindro de membrana permeable de celofán, de aproximadamente 10 cm, sellados por los extremos. Los tubos se colocaron durante 12 hrs en una solución de Cloruro de Calcio (2 %) con agitación constante. Posteriormente, a cada tubo se le realizaron 5 cortes transversales de aproximadamente 3 mm con un bisturí, y se colocaron sobre una plataforma con un orificio de 2 cm de diámetro. Los cortes se pusieron sobre un medidor de intensidad luminosa SPER SCIENTIFIC, y se registró el promedio de un minuto de lectura de la intensidad luminosa que pudo pasar a través de la película de gel. Se tomaron las lecturas iniciales de intensidad luminosa sin la película de gel, restándole el valor obtenido con la película de gel para registrar el porcentaje de reducción de intensidad luminosa. La luz emitida se generó con dos lámparas fluorescentes <sup>OSRAM</sup> de 39 W a una distancia de ~30 cm, mismas condiciones que fueron utilizadas durante la incubación de la microalga para el tratamiento de aguas residuales.

## **6.4. INMOVILIZACIÓN CELULAR**

Se llevaron a cabo diferentes tratamientos de encapsulado de microorganismos (*Chlorella vulgaris* Beijerinck, UTEX 1602, USA, *Azospirillum brasilense* Cd, DSM

1843), mediante la técnica descrita por Bashan (1986) y Bashan, *et al.* (2002). La inmovilización celular se realizó utilizando el alginato de *S. sinicola* producido a nivel planta piloto, y utilizando alginato de *M. pyrifera* <sup>Sigma</sup> como su control.

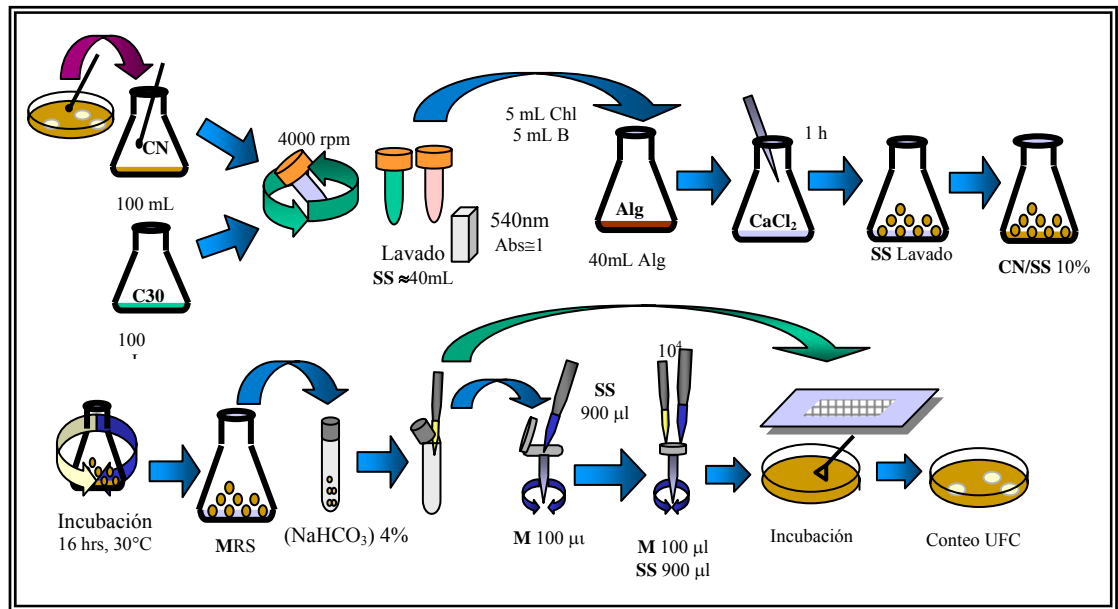
#### **6.4.1. Condiciones de crecimiento de los microorganismos**

Previo a la inmovilización de los microorganismos en las esferas de alginato, se preparó un inóculo de *Chlorella vulgaris*, aislada de los efluentes secundarios de un estanque estabilizador de aguas de tratamiento de Santa Fe de Bogotá, Colombia (González, *et al.* 1997), en 100 mL de medio esteril C30 (Anexo 4) durante 5 días, obteniendo aproximadamente  $6.0 \times 10^6$  cel/mL. *Azospirillum brasilense* se cultivó en 100 mL de medio líquido Nutrient Broth (Oxide, UK - Difco, Detroit, Mi), o en medio TYG (Anexo 4), a  $37^\circ\text{C} \pm 2$  por 16 h, en una mezcladora rotatoria. Ambos microorganismos se cosecharon y prepararon para su inmovilización de acuerdo a los tiempos de cultivo.

#### **6.4.2. Tratamiento de aguas residuales**

Los experimentos se realizaron en frascos Erlenmeyer de 250 mL a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  con iluminación constante (1600 lux). Después del cultivo de los microorganismos, el inóculo se centrifugó a 4000 rpm en dos tubos, durante 10 min. Previamente se preparó una solución de alginato de *M. pyrifera* y *S. sinicola* a una viscosidad de 200 mPa s con 40 mL de agua destilada (50 mL para el control), los cuales se esterilizaron durante 15 min en autoclave a  $250^\circ\text{F}$  y  $1 \text{ kg/cm}^2$  de presión. Dependiendo de la fuente de origen del alginato, la viscosidad y gradiente de degradación durante la esterilización varió, por lo que fue necesario realizar las curvas de concentración vs viscosidad del alginato esterilizado para obtener soluciones homogéneas de ambos alginatos a 200 mPa s de viscosidad. El alginato

control de *M. pyrifer* se preparó con una mezcla de 1.5g de alginato de viscosidad media y 0.5g de alta viscosidad, para obtener una solución con 200 mPa s después de su esterilización.



**Figura 5. Producción de esferas de alginato; inmovilización y co-inmovilización celular.**

*Inmovilizado.* Después de centrifugar la microalga, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 20 mL de solución salina (0.85% NaCl) en uno de los tubos. La solución se homogeneizó, se colocaron 10 mL en cada alginato y se mezcló durante 15-20 min.

*Co-inmovilizado.* Después de la centrifugación de la microalga, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de solución salina. La solución se mezcló y se colocaron 5 mL en cada uno de los alginatos. Adicionalmente, al centrifugado de la bacteria, después de eliminar el sobrenadante, se le agregó suficiente solución salina hasta obtener una densidad óptica de  $1 \pm 0.2$  leyendo la absorbancia a 540 nm en un



espectrofotómetro. De esta solución se agregaron 5 mL más a cada alginato, para posteriormente mezclarlos durante 15-20 min.

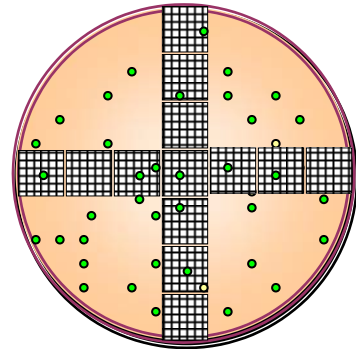
Una vez mezclados, cada una de las soluciones se inyectó por goteo en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% dejando reposar las cápsulas durante una hora. Finalmente se realizaron dos lavados con solución salina para eliminar el exceso de  $\text{CaCl}_2$  y se dejaron las cápsulas en medio líquido Nutrient Broth al 10 %. Después de la preparación de los encapsulados, estos se colocaron en Medio Residual Sintético (Anexo 4), en sistema de cultivo semi-contínuo, con recambio del medio cada 48 h, durante 240 h (5 Ciclos). Los cultivos se mantuvieron con iluminación constante, utilizando 2 lámparas fluorescentes de 39 W, OSRAM, y manteniéndolos en una mezcladora rotatoria, Orbit Shaker, Lab-line, a 150 rpm. En cada ciclo se realizó el conteo de la microalga y la bacteria, así como la cuantificación del contenido de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en el medio, mediante técnicas estándar de análisis de agua, usando kits HACH (Hach Co, Loveland, CO, USA). El amonio fue analizado por el método de salicilato y el fósforo (ortofosfatos) por el método de molibdobanadato.

#### **6.4.3. Conteo celular**

Para la determinación del crecimiento tanto de la microalga como de la bacteria, se tomaron 5 cápsulas de alginato y se disolvieron en 5 mL de solución de bicarbonato de sodio (4%) por una hora a 30° C. Posteriormente se realizó el conteo de la microalga utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. El número de microalgas se calculó por mililitro de alginato, para lo cual, al final del procedimiento experimental se contó el número de esferas que se formaron a partir de los 50 mL de alginato. *A. brasilense* se cuantificó realizando una serie de diluciones en placas de agar nutritivo Difco, Detroit Michigan,

haciendo el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de las bacterias, las cuales se dejaron cultivando a 37°C durante 24 hrs.

Adicionalmente, las esferas de alginato con la microalga inmobilizada y co-inmobilizada se fijaron en parafina y se aplicó una tinción Hematoxilina-Eosina. Estas esferas se utilizaron para hacer cortes histológicos y realizar el conteo de las microalgas, con la finalidad de determinar su forma de crecimiento y distribución en las esferas. Los conteos se hicieron por tratamiento, haciendo el seguimiento por ciclo durante 10 días. De cada tratamiento se seleccionaron cinco esferas con un diámetro superior a



**Figura 6. Determinación espacial del crecimiento de *C. sorokiniana* en cortes histológicos de esferas de alginato (grosor 3µm)**

los 2 mm. Las esferas se observaron en microscopio óptico (40X) y se tomaron fotografías digitales utilizando el programa de análisis de imágenes Sigma Scan Pro V5. Para cada esfera se realizaron fotomontajes de cuadrantes de 200 µm a partir de la porción central y hasta los extremos, y se hicieron los conteos de la microalga *C. sorokiniana* por cuadrante (Fig 6).

#### **6.4.4. Promotores de crecimiento de plantas**

El procedimiento para la preparación de los inmobilizados del promotor de crecimiento de plantas, *Azospirillum brasilense*, es similar al descrito anteriormente. Se preparó una solución de alginato de *M. pyrifera* y *S. sinicola* a una viscosidad de 200 mPa s con 160 mL de agua destilada (200 mL para el control), se esterizaron, y se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiental. El inóculo de la bacteria se centrifugó a 4000 rpm en dos tubos, durante 10 min, a los cuales, después de eliminar el sobrenadante,

se les agregó suficiente solución salina hasta obtener densidad óptica de  $1 \pm 0.2$  leyendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. De estas soluciones se agregaron 40 mL a cada alginato, para posteriormente mezclarlos durante 15-20 min. Una vez mezclados, cada una de las soluciones de alginato-bacteria se inyectó por goteo bajo presión con el prototipo descrito por Bashan *et al.* (2002), en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% y se dejaron reposar las cápsulas durante una hora. Finalmente se realizaron dos lavados con solución salina, y se llevó a cabo un crecimiento secundario manteniendo las esferas en medio TYG 50% durante 16 horas a  $37^\circ \text{C}$  con agitación constante. Este prototipo permite producir esferas de tamaño entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ . Posteriormente las esferas se secaron mediante liofilización (Virtis 5L, Benchtop), durante 48 hrs. Para cada tipo de alginato se realizaron los conteos de la bacteria después de su preparación, y después de deshidratarlas.

Una vez preparado, el inmovilizado de la bacteria, se utilizó para inocular semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*), variedad ACE (Comercializadora GERMNAL<sup>®</sup>, México D.F.) Antes de la inoculación, las semillas se higienizaron; las semillas se colocaron en solución tween (2%) durante 10 min, hipoclorito de sodio (50%) por 5 min y tiosulfato de sodio (2%). Posteriormente, después de secar las semillas, colocándolas en papel secante a temperatura ambiente, se bañaron con una solución de alginato y se mezclaron con los inmovilizados liofilizados de la bacteria.

Las semillas inoculadas se sembraron en tierra esterilizada pobre en nutrientes (tamiz malla 500), en macetas opacas de 5.5 cm de diámetro, manteniendo su cultivo durante 30 días en una cámara de incubación controlada Conviron (TC 16, Controlled environments, Winnipeg, Canada), con las siguientes condiciones: riego diario (según sus requerimientos), humedad de 70 %, ciclo de luz oscuridad 12:12 (2000 lux), a una temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Antes del sembrado de las semillas, el sustrato se saturó con agua

destilada. El procedimiento se llevo a cabo por triplicado, con una muestra de 50 semillas por tratamiento, repartidas en 10 macetas. El análisis del suelo fue previamente publicado por Bashan *et al.* (2000) y Carrillo-Garcia, *et al.* (2000). En cada caso se utilizó alginato solo como tratamiento control, y semillas solas como tratamiento blanco.

Después de los 30 días de cultivo, se extrajeron las plantas y se midieron, separando el tallo de la raíz. Las porciones se secaron a  $75 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas para obtener el peso seco, en un horno Econotherm (Jouan, Inc. Modelo 1025).

### 6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los resultados obtenidos se realizaron las pruebas de homocedasticidad y normalidad. Aquellos datos que presentaron una distribución normal y homocedasticidad se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA factorial o la prueba *t* de student, con la prueba *a posteriori* de Tukey. En los casos en que no se cumplieron los supuestos de normalidad y/o homocedasticidad se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el análisis *a posteriori* de Nemenyi, SNK o Dunn según fuera el caso, de acuerdo a lo siguiente:

Prueba *a posteriori* tipo Tukey no paramétrica de Nemenyi y Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples con igual número de datos.

$$\text{Nemenyi: Error estándar} = \sqrt{\frac{n(nk)(nk+1)}{12}}$$

$$\text{SNK: Error estándar} = \sqrt{\frac{n(np)(np+1)}{12}}$$

Prueba *a posteriori* tipo Tukey no paramétrica de Dunn para comparaciones múltiples con diferente número de datos.

$$\text{Error estándar} = \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left( \frac{1}{nA} + \frac{1}{nB} \right)}$$

Prueba *a posteriori* tipo Tukey no paramétrica de Dunn para comparaciones múltiples con diferente número de datos y rangos empatados.

$$\text{Error estándar} = \sqrt{\left( \frac{N(N+1)}{12} - \frac{\sum t}{12(N-1)} \right) \left( \frac{1}{nA} + \frac{1}{nB} \right)}$$

En todos los casos se utilizó un  $\alpha$  de 0.05.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado con tres repeticiones.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. PRODUCCIÓN DE ALGINATO DE SODIO DE *S. SINICOLA*

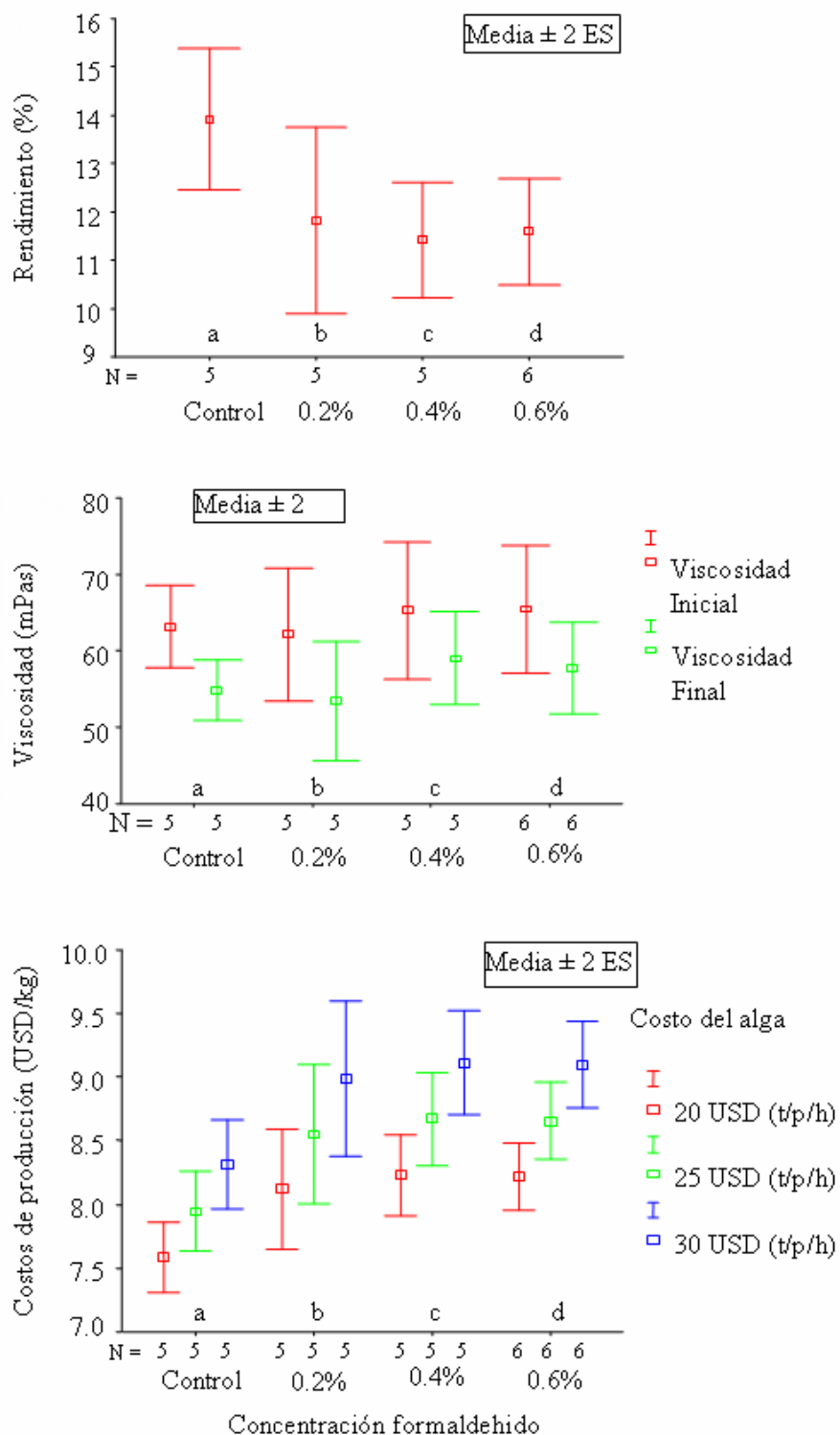
#### 7.1.1. Producción de alginato nivel laboratorio

##### 7.1.1.1. Hidratación

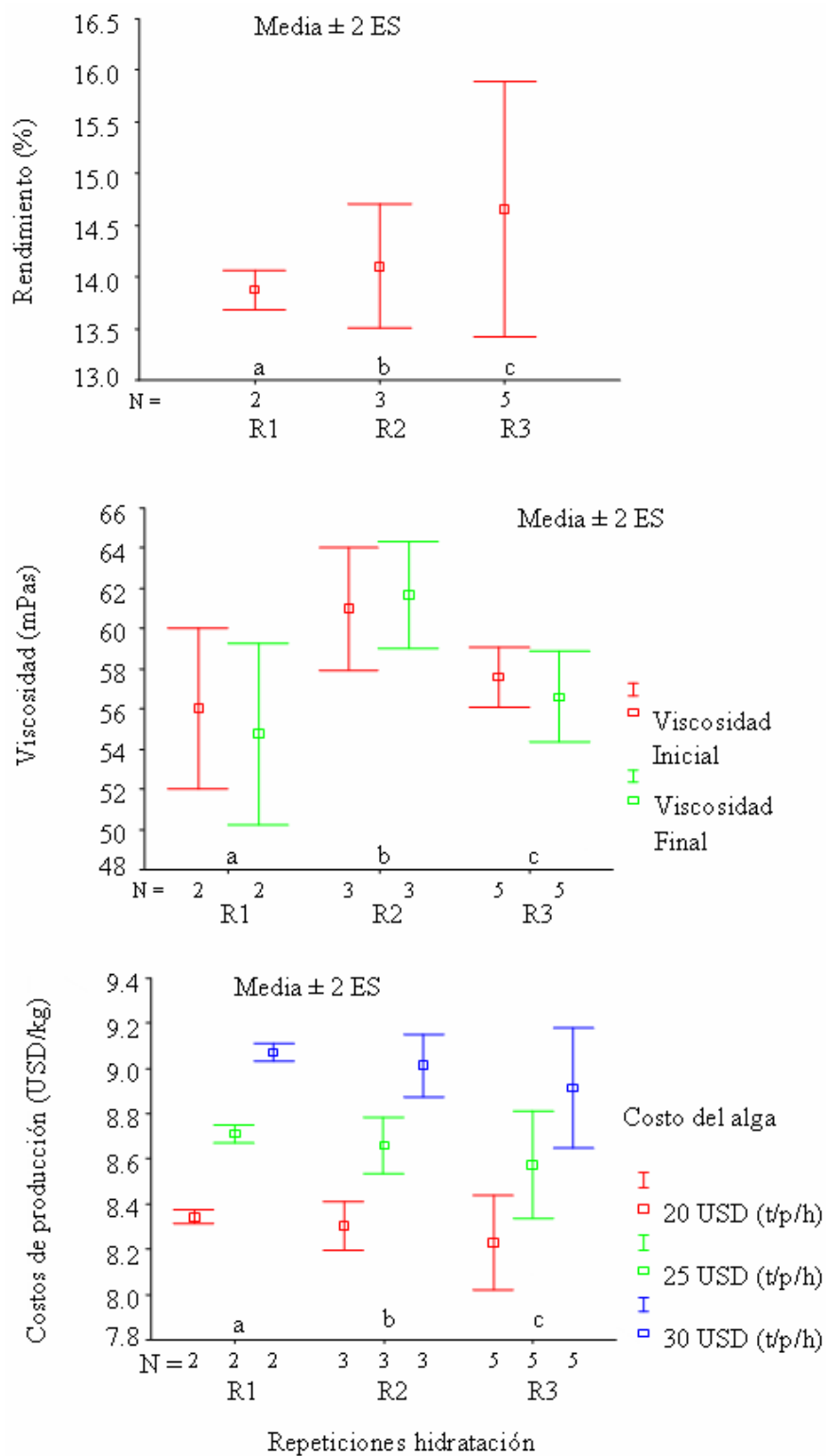
Los resultados obtenidos durante la etapa de hidratación mostraron que no existen diferencias significativas en el rendimiento, viscosidad y costos de producción al variar la concentración de formaldehído (Control, 0.2, 0.4 y 0.6%, figura 7). El promedio del porcentaje del rendimiento obtenido en esta etapa osciló alrededor del 12 %, con un costo de producción por kilogramo de alginato de 8.0 USD, cuando el costo del alga es de 20 USD ton<sup>-1</sup> peso húmedo. La viscosidad del producto, también presentó valores similares, alrededor de los 65 mPa s a una concentración de 2 %.

En cuanto al tiempo y número de repeticiones durante la hidratación (figuras 8 y 9), no se observaron diferencias significativas en el rendimiento y costos de producción del alginato, sin embargo, la viscosidad final del alginato presentó un decremento cuando se aumenta el tiempo de hidratación de 12 a 36 hrs a una concentración de 0.4%

Por otra parte, como se muestra en la figura 10, la coloración del producto mostró una disminución al incrementarse la concentración de formaldehído, así como con las repeticiones durante la hidratación. A pesar de esta disminución, la coloración se mantuvo de un color café más oscuro que para el alginato de *M. pyrifera*.

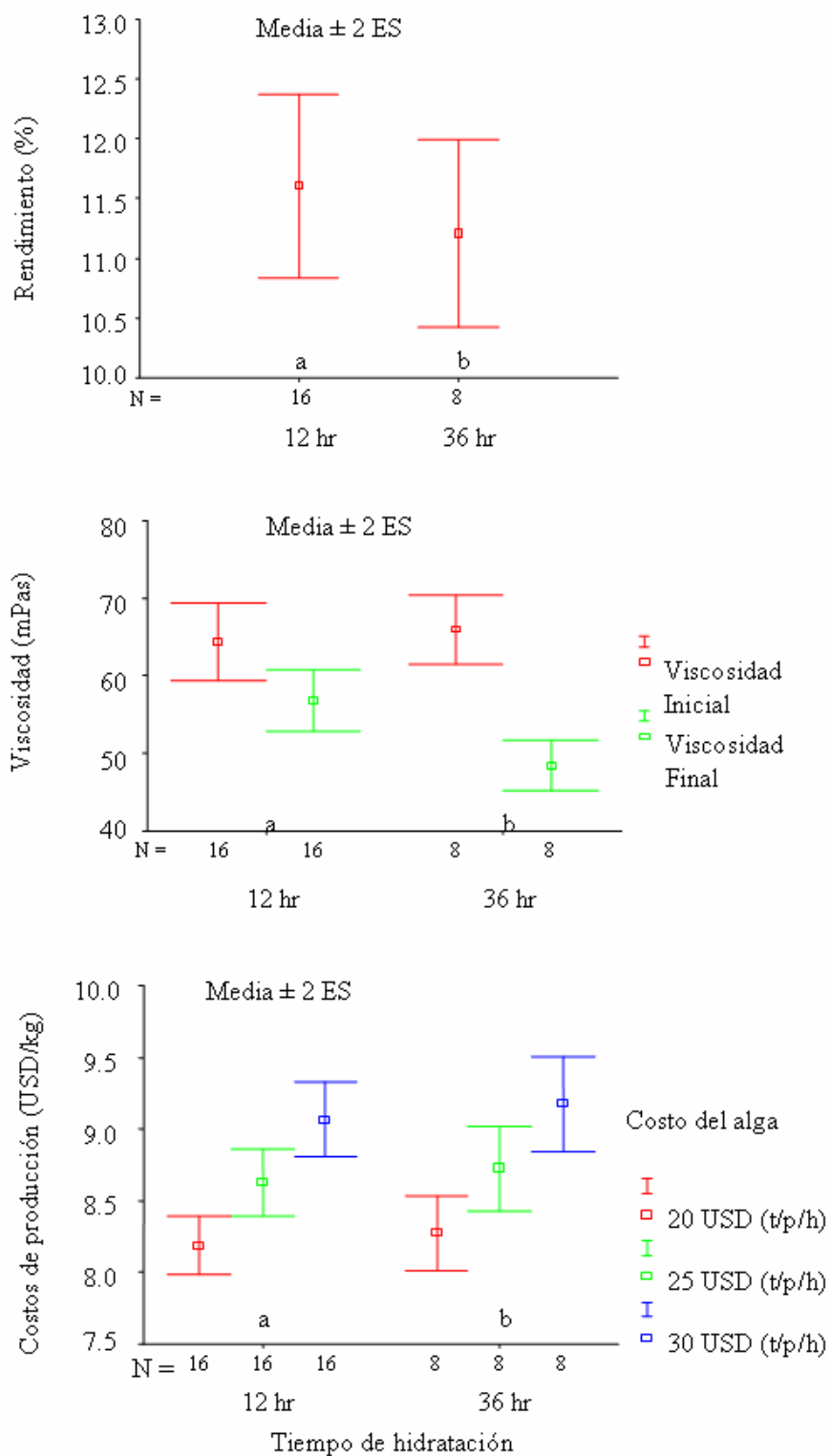


**Figura 7. Análisis del proceso de producción de alginato de *S. sinicola* con diferente concentración de formaldehído durante la etapa de hidratación.** Las letras entre paréntesis representan diferencias significativas entre los grupos. (K-W,  $\alpha = 0.05$ , prueba *a posteriori* Dunn)



**Figura 8. Análisis del proceso de producción de alginato de *S. sinicola* con diferentes repeticiones durante la hidratación.** Las letras entre paréntesis representan diferencias significativas entre los grupos. (K-W,  $\alpha = 0.05$ , prueba *a posteriori* Dunn)





**Figura 9. Análisis del proceso de producción de alginato de *S. sinicola* con diferente tiempo de hidratación.** Las letras entre paréntesis representan diferencias significativas entre los grupos. (K-W,  $\alpha = 0.05$ , prueba *a posteriori* Dunn)



**Figura 10. Características del alginato de sodio con diferentes repeticiones durante la hidratación.**

#### 7.1.1.2. Sistema y pH de Pre-extracción

En la etapa de pre-extracción, se realizaron cuatro procedimientos experimentales:

- i) Sistema de carga a un pH de 4
- ii) Sistema de carga pH 2
- iii) Sistema de flujo continuo pH 2
- iv) Sistema de flujo continuo pH 1.

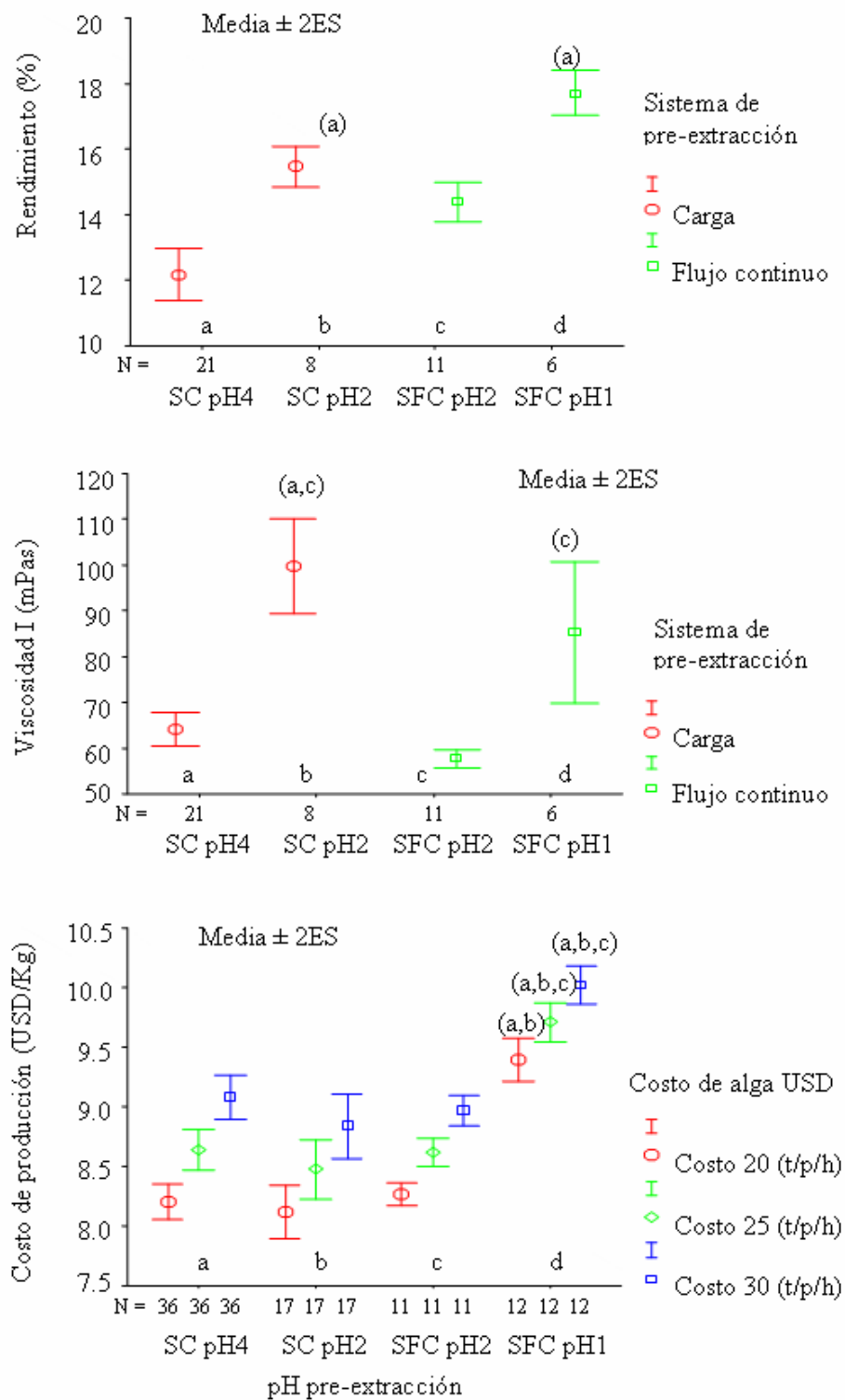
En cada caso se realizaron los procedimientos con hidratación control (0% formaldehído) y con 0.4% de formaldehído, la cual fue la concentración de formaldehído que se seleccionó durante la hidratación, y con la finalidad de valorar si había un efecto por la combinación de ambos factores.

De los cuatro procedimientos experimentales el sistema de flujo continuo pH 1 presentó un rendimiento significativamente mayor, de alrededor del 18 %, seguido del sistema carga pH 2 (15 %), el sistema de flujo continuo pH 2 (14 %) y finalmente el

sistema de carga pH 4 (12 %). A pesar del mayor rendimiento obtenido en el sistema de flujo continuo pH 1, los costos de producción para este procedimiento experimental fueron significativamente superiores a los demás (9.4 USD kg<sup>-1</sup>), sobre todo cuando el costo del alga es de 25 USD kg<sup>-1</sup> en adelante, mientras que los menores costos de producción (7.8 USD kg<sup>-1</sup>) se obtuvieron con el sistema de carga pH 2 (Figura 11). Entre estos dos tratamientos no hubo diferencias estadísticas significativas en la comparación de la viscosidad inicial y final.

El análisis estadístico entre los grupos de 0.0% de formaldehído y 0.4% durante la hidratación, mostró que no hay diferencias significativas en el rendimiento, costos de producción y viscosidad de cada tratamiento por la combinación de la concentración de formaldehído y el sistema de pre-extracción.

La comparación entre ambos sistemas de pre-extracción con un mismo pH de 2, mostró que no existen diferencias estadísticas significativas en el rendimiento obtenido (figura 11), ambos oscilan entre el 14-16 % de rendimiento, sin embargo, el sistema de carga, con este pH de pre-extracción, presenta un incremento importante en la viscosidad del alginato, con valores de  $\approx 100$  mPa s. Además de esto, los costos de producción para el sistema de flujo continuo pH 2 se mantienen ligeramente por arriba del sistema de carga pH 2 (8.3 vs 8.0 USD kg<sup>-1</sup>, respectivamente), aunque sin diferencias estadísticas significativas.



**Figura 11. Análisis del proceso de producción de alginato de *S. sinicola* con diferente pH en el sistema de pre-extracción en carga y sistema de flujo continuo.** Las letras entre paréntesis representan diferencias significativas entre los grupos. (K-W,  $\alpha = 0.05$ , prueba *a posteriori* Dunn).

La figura 12, muestra la tasa de intercambio iónico  $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^{+}$ , en los sistemas de pre-extracción en carga (pH 4) y flujo continuo (pH 2), tanto a nivel laboratorio como en planta piloto. En el sistema de flujo continuo se puede apreciar un mayor intercambio iónico que en el sistema de carga, en ambos niveles de experimentación. Por otro lado, en ambos sistemas, el intercambio iónico es mayor y más rápido a nivel laboratorio que a nivel planta piloto.

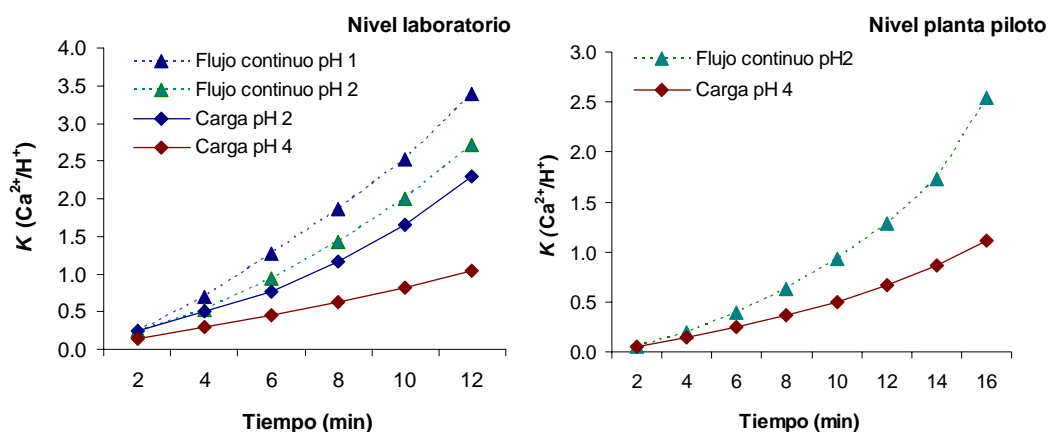
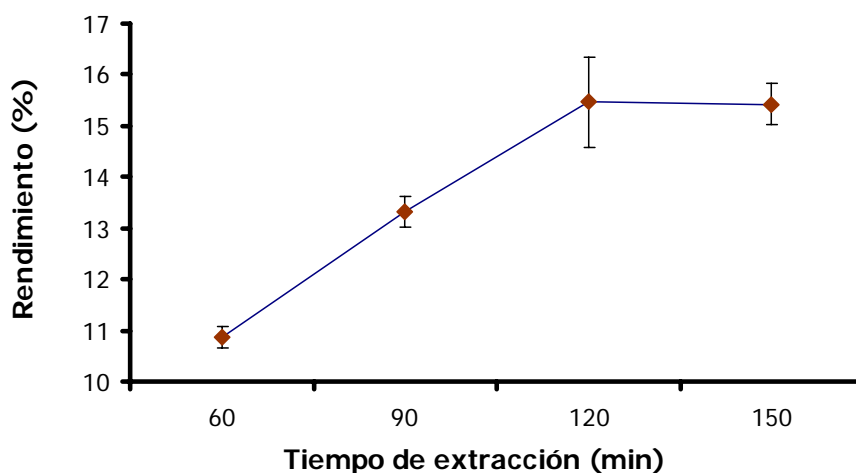


Figura 12. Intercambio iónico ( $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ) durante la pre-extracción.

#### 7.1.1.3. Extracción

En la etapa de extracción, el mayor rendimiento con el procedimiento de pre-extracción en carga pH 4, se obtuvo en un tiempo de dos horas (Fig 13), a una temperatura de 80° C (Fig 14). A los 70° C se obtiene un rendimiento de 11 %, lo cual genera un incremento en los costos de producción (8.3 USD kg<sup>-1</sup>), comparado con los costos de producción que se generan durante la extracción a 80° C, de alrededor de los 8.0 USD kg<sup>-1</sup>, con un rendimiento de 15 %.

La curva de rendimiento por tiempo de extracción (Figura 13), muestra el mayor rendimiento a las dos horas de extracción, sin encontrar diferencias significativas al incrementarse el tiempo de extracción a dos horas y media. Los costos de producción durante el tiempo de extracción muestran un patrón muy similar, encontrando el mayor costo de producción con una hora de extracción (8.9 USD kg<sup>-1</sup>), y el menor costo de producción a las dos horas (8.0 USD kg<sup>-1</sup>). La viscosidad obtenida durante los diferentes tiempos de extracción se encontró alrededor de 65 mPa s.



**Figura 13.** Curva del rendimiento de alginato de sodio obtenido durante la extracción a 80° C (Media ± desviación estándar).

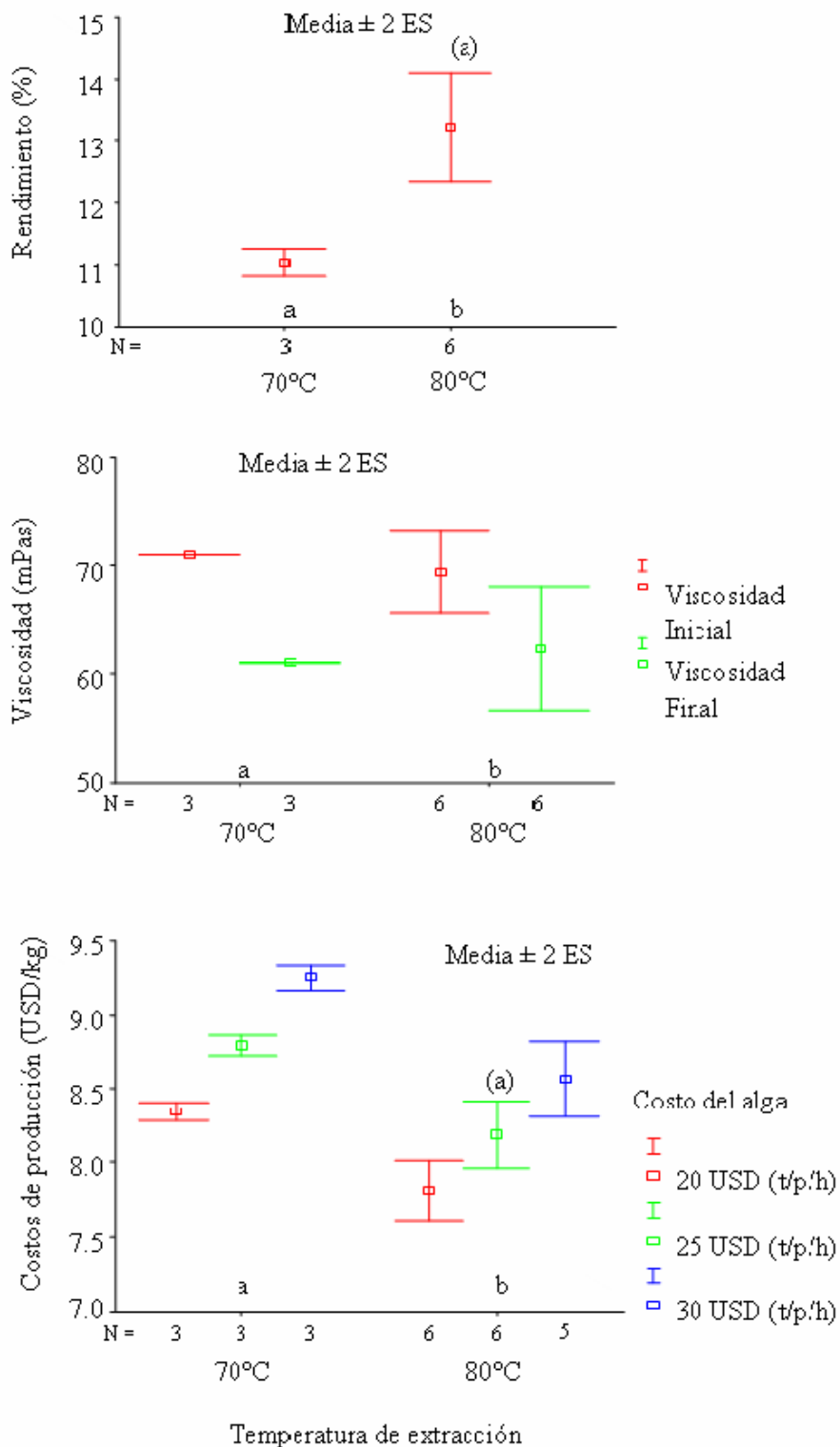


Figura 14. Análisis del proceso de producción de alginato de *S. sinicola* con diferente temperatura de extracción. Las letras entre paréntesis representan diferencias significativas entre los grupos. (K-W,  $\alpha = 0.05$ , prueba *a posteriori* Dunn)

#### 7.1.1.4. Blanqueado

Los resultados obtenidos durante la etapa de blanqueado no mostraron un cambio significativo en la coloración del producto. En las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio que se adicionaron la coloración permanece con un color café muy oscuro, con matiz de 7.5 YR (2.5/3), de acuerdo a las cartas de coloración de Munsell (2000).

#### 7.1.2. Producción de alginato nivel planta piloto

Los resultados obtenidos a nivel planta piloto fueron diferentes que a nivel laboratorio. El rendimiento obtenido a nivel planta piloto fue menor tanto en el sistema de pre-extracción en carga pH 4 (10%) en comparación con el rendimiento a nivel laboratorio (12%), como en el sistema de pre-extracción en flujo continuo SFC pH 2 (12 y 15 %, respectivamente), sin encontrar diferencias significativas por sistema de pre-extracción. El menor rendimiento obtenido durante el proceso, generó un incremento en los costos de producción del alginato, los cuales oscilaron alrededor de los 8.3 USD kg<sup>-1</sup> de alginato.

Proporcionalmente, la concentración de reactivos utilizados a nivel planta piloto, en las etapas en común con el nivel laboratorio, fueron muy similares. Sin embargo, la concentración de CaCl<sub>2</sub> necesario durante la conversión a alginato de calcio a nivel planta piloto fue superior al utilizado con *M. pyrifera* (3:1 de CaCl<sub>2</sub>: solución de alginato, en lugar de 2:1), así como la concentración de HCl durante su conversión a ácido algínico. Las fibras fueron más pequeñas y el drenado durante estas etapas fue más lento, con una mayor pérdida de material.

El producto final, alginato de sodio, también presentó unas fibras pequeñas y fáciles de separar y secar. El molido del material también se facilitó comparado con *M. pyrifera*, y en un menor tiempo.



## 7.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ALGINATO

### 7.2.1. Composición

La composición y parámetros secuenciales del alginato de *S. sinicola*, obtenido en la planta piloto, se llevó a cabo con el análisis de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  RMN), para comparar el contenido de ácido manurónico y gulurónico del alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifera*. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos, denotándose una variación importante en la fracción  $F_{\text{GGG}}$ , donde se observa que el alginato de *S. sinicola* presenta un mayor número de  $F_{\text{GGG}}$  a comparación del alginato de *M. pyrifera*.

NMR	<i>S. sinicola</i>	<i>M. pyrifera</i>
$F_{\text{G}}$	0.64	0.38
$F_{\text{M}}$	0.36	0.62
$F_{\text{GG}}$	0.54	0.18
$F_{\text{MM}}$	0.25	0.42
$F_{\text{MG}}=F_{\text{GM}}$	0.11	0.2
$F_{\text{GGG}}$	0.51	0.13
$F_{\text{GGM}}=F_{\text{MGG}}$	0.04	0.05
$F_{\text{MGM}}$	0.08	0.18
$N_{\text{G}}>1$	14	4

Tabla 4. Contenido de unidades urónicas de alginato de sodio, según su fuente de origen.

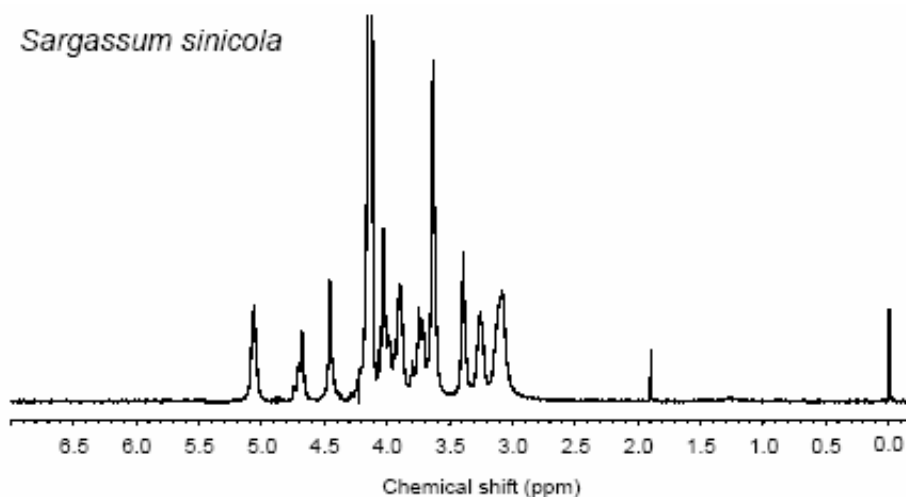


Figura 15. Espectro  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz) de alginato de sodio de *S. sinicola*.

### 7.2.2. Coloración

De acuerdo a las tablas de Munsell (2000) el alginato en polvo de *S. sinicola* presenta un color café muy oscuro, con matiz de 7.5 YR (2.5/3), mientras que el alginato de *M. pyrifer*a tiene una coloración amarillo pálido 2.5Y (7/4).

La determinación del color del alginato en solución (1.25 %) presentó las siguientes:

Fuente del alginato	<i>M. pyrifer</i> a	<i>S. sinicola</i>
pH	6.8	7.6
Longitud de onda dominante	575	580
Pureza (Saturación del color)	10%	80%
Matiz	Amarillo	Anaranjado-amarillento
Porcentaje de luminancia (Grado de brillantez)	81.7	27.4

Tabla 5. Características del color de la solución de alginato de sodio de *S. sinicola*.

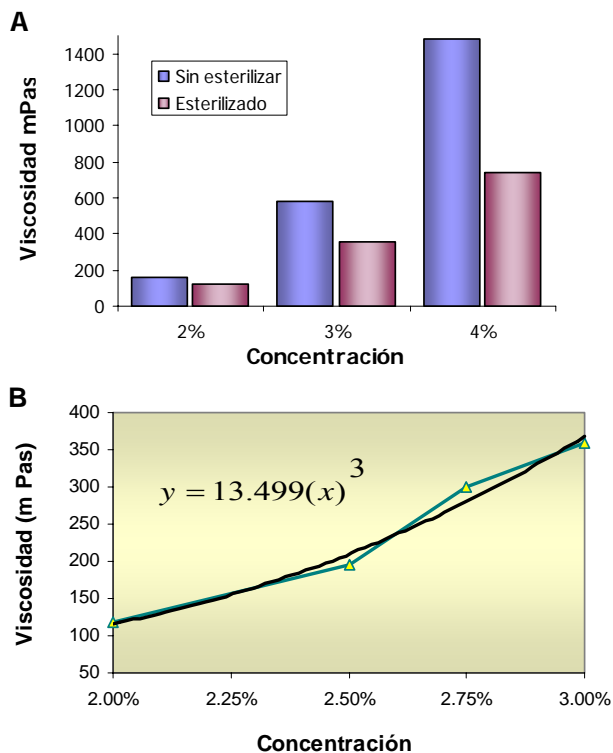
### 7.2.3. Concentración de compuestos fenólicos

El método colorimétrico para la determinación de compuestos fenólicos totales mostró una mayor concentración de polifenoles en el alginato de *S. sinicola* ( $58.83 \pm 8.62$  mg/kg GAE) comparado con el alginatos de *M. pyrifer*a<sup>Sigma</sup> ( $7.13 \pm 3.83$  mg/kg GAE). Esta relación fué directamente proporcional a la concentración del alginato.

### 7.3. INMOVILIZACIÓN CELULAR

#### 7.3.1. Determinación de la curva de viscosidad

El procedimiento para preparar los inmobilizados de alginato implica la esterilización del mismo para evitar el crecimiento de otros microorganismos. Durante este proceso, se observó un decremento de viscosidad diferente para cada tipo de alginato (*M. pyrifera* <sup>Sigma</sup>, viscosidad inicial 1500 mPa s, y *S. sinicola*; viscosidad inicial 550 mPa s), por lo que fue necesario determinar la curva de viscosidad de cada uno de los alginatos y así homogeneizar la viscosidad a 200 mPa s. Para esto, se prepararon disoluciones con 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0% de concentración, y se midió la viscosidad de la solución sin esterilizar y esterilizado (Figura 16, A).



**Figura 16. A. Viscosidad del alginato de *Sargassum sinicola* antes y después de esterilizar. B. Ecuación de la viscosidad según la concentración del alginato.**

Las concentraciones establecidas para obtener una viscosidad de  $\approx 200$  mPa s por cada tipo de alginato fueron las siguientes: Alginato de sodio de *M. pyrifera* <sup>Sigma</sup>® 2% y *S. sinicola* 2.45% (Figura 16, B; R=0.998). A partir de estas concentraciones se realizó el inmobilizado de los microorganismos como se describió en la metodología.

### 7.3.2. Tratamiento de aguas residuales

El aspecto inicial de los encapsulados según el tipo de alginato fue notoriamente diferente (Figura 17). Las esferas de alginato de *S. sinicola* conservan la coloración café en comparación con el alginato de *M. pyrifer*. A pesar de esto, en cada uno de los recambios del medio se observó una pérdida progresiva de la coloración, de manera que al final de los experimentos las esferas tienen una reducción importante en la coloración.



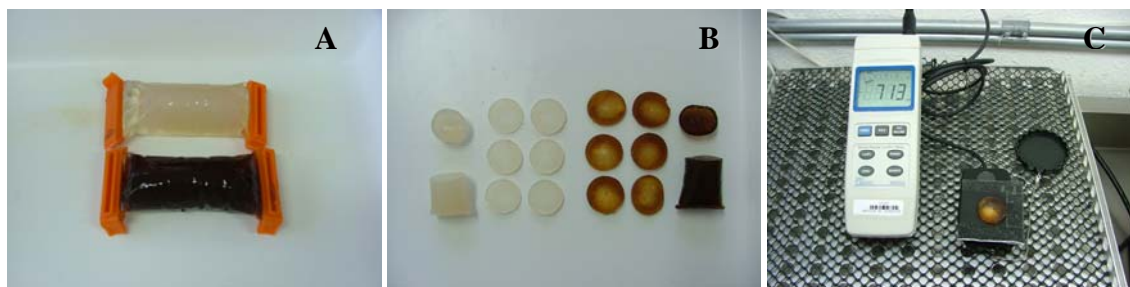
**Figura 17.** Inmovilizado de *C. sorokiniana* y co-inmovilizado con *A. brasilense* en alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifer*

Otra de las diferencias notables fue su forma, encontrando que las esferas producidas con alginato de *S. sinicola* tienden a ser menos esféricas y de mayor tamaño que las esferas del alginato de *M. pyrifer*.

### 7.3.3. Reducción de intensidad luminosa

La intensidad luminosa en la cual se realizó el tratamiento de aguas residuales fue en promedio de 1577 lux. La intensidad luminosa con los cortes del gel de alginato de *S.*

*sinicola* fue de 847 lux, presentando una reducción del 46.28% de la intensidad luminosa, comparada con el 16.03% de reducción del alginato de *M. pyrifera*.

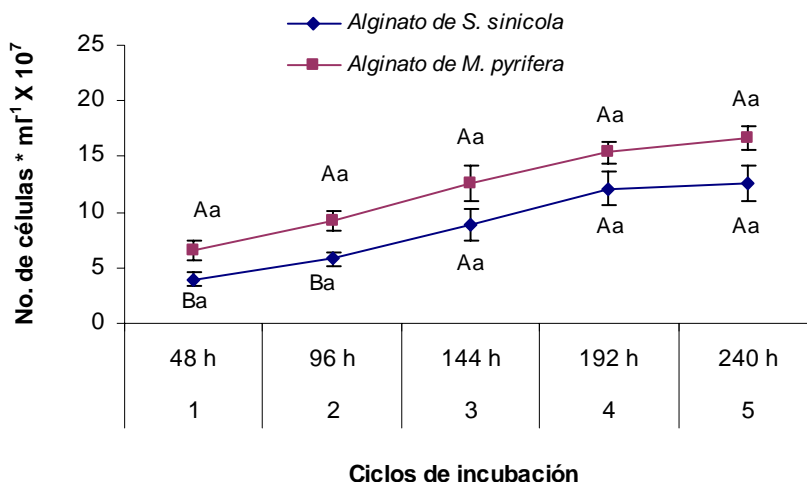


**Figura 18. Determinación de la reducción luminosa en gel de alginato de *S. sinicola*.** A. Preparación de tubos de alginato. B. Cortes  $\approx 3$ mm de tubos de gel. C. Medición de la reducción de la intensidad luminosa de los cortes de tubo de gel de alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifera*.

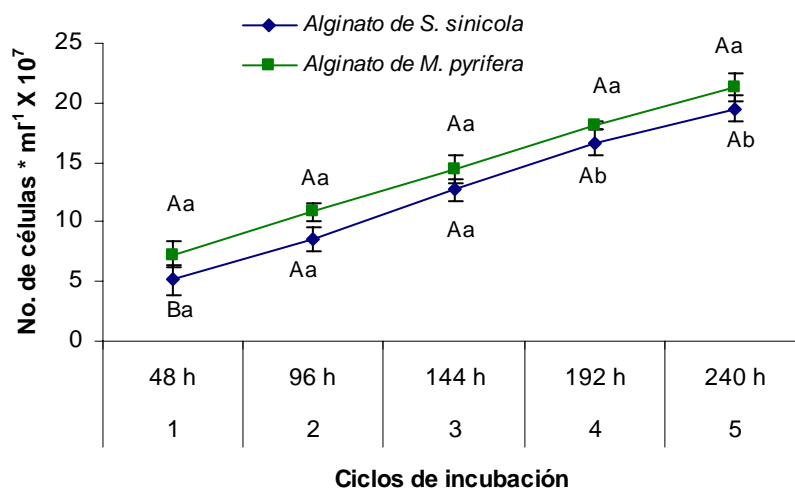
#### 7.3.4. Crecimiento de los microorganismos

A pesar de la coloración que presentan las esferas producidas con el alginato de *S. sinicola*, el crecimiento de la microalga fue muy similar en ambos tipos de alginato durante los 10 días del experimento (Figuras 19 y 20). El mayor crecimiento se observa en las esferas donde *C sorokiniana* está co-inmovilizada con *A. brasilense*, alcanzando una población de  $20 \times 10^7$  en el último ciclo del tratamiento, comparado con  $15 \times 10^7$  en el inmovilizado. Entre los dos tipos de alginato, existen diferencias significativas en el crecimiento de la microalga inmovilizada hasta las 96 horas de tratamiento, siendo superior en el alginato de sodio de *M. pyrifera*, sin embargo para el siguiente ciclo y hasta las 240 hrs ya no se presentan diferencias significativas por tipo de alginato alginatos.

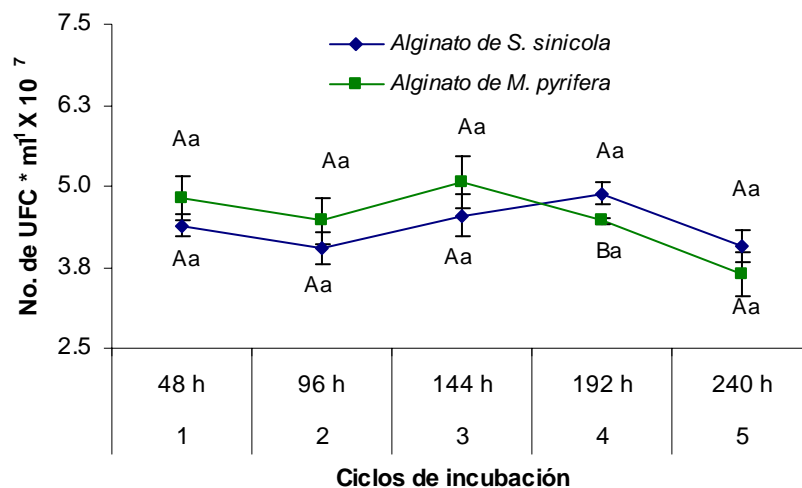
Para el co-inmovilizado a partir de las 96 no hay diferencias significativas en el crecimiento de la microalga por tipo de alginato, en tanto que el crecimiento de *A. brasilense* se mantiene con valores similares para ambos tipos de alginato, sin encontrar diferencias estadísticas significativas entre ellos (Figura 21).



**Figura 19. Crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada en alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifera*.** Las letras mayúsculas indican diferencias significativas en el crecimiento de *C. sorokiniana* por tipo de alginato, las letras minúsculas indican diferencias significativas consecutivas por ciclo de tratamiento. K-W ( $\alpha=0.05$ ), prueba *a posteriori* SNK



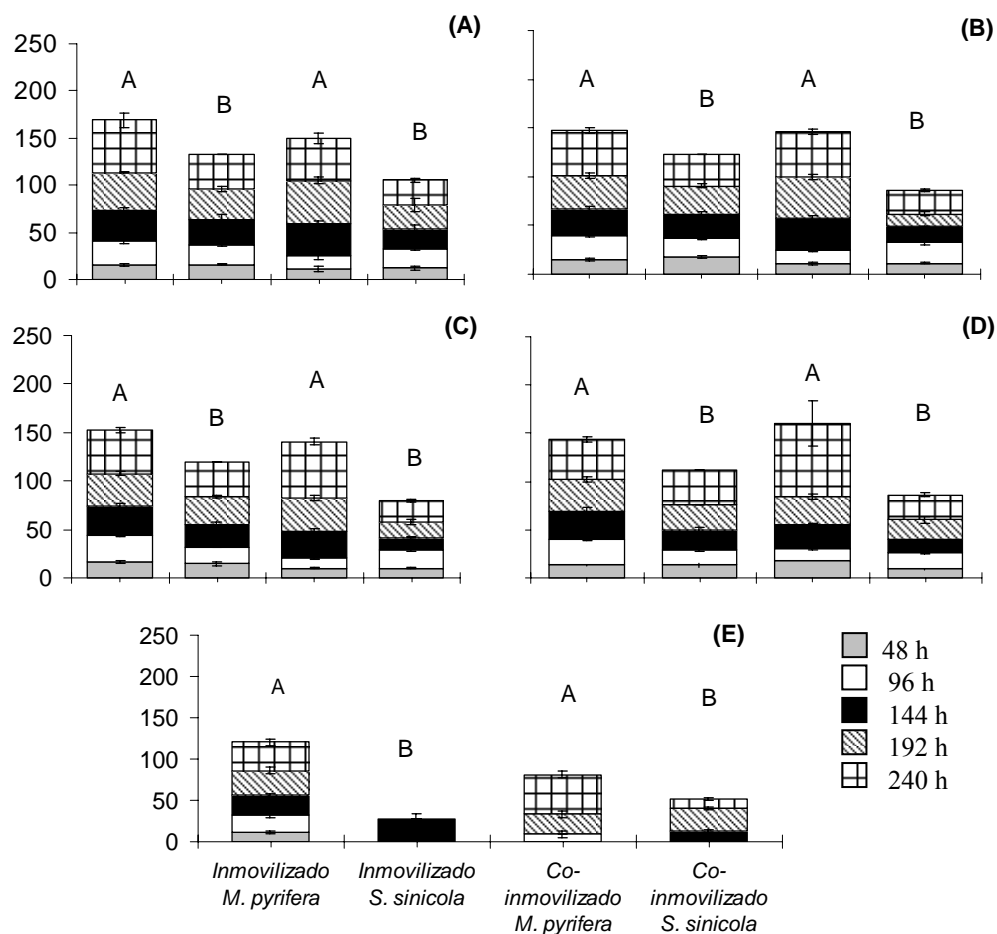
**Figura 20. Crecimiento de *C. sorokiniana* co-inmovilizada en alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifera*.** Las letras mayúsculas indican diferencias significativas en el crecimiento de *C. sorokiniana* por tipo de alginato, las letras minúsculas indican diferencias significativas consecutivas por ciclo de tratamiento. K-W ( $\alpha=0.05$ ), prueba *a posteriori* SNK en la comparación entre tratamientos. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ), prueba *a posteriori* Tukey, en la comparación por ciclo.



**Figura 21. Crecimiento de *A. brasilense* co-inmovilizada con *C. sorokiniana* en esferas de alginato.** Las letras mayúsculas indican diferencias significativas en el crecimiento de *C. sorokiniana* por tipo de alginato, las letras minúsculas indican diferencias significativas consecutivas por ciclo de tratamiento. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ), en la comparación por ciclos. *t* student ( $\alpha=0.05$ ), en la comparación por tipo de alginato.

### 7.3.5. Localización del crecimiento de *C. sorokiniana*

La inclusión de las esferas en parafina y su tinción con Hematoxilina Eosina, permitió una buena precisión en los conteos de la microalga al interior de las esferas. El crecimiento de *C. sorokiniana* fue homogéneo de la parte exterior a la interior de la esfera, sin encontrar diferencias estadísticas significativas (Figura 22). La comparación por tipo de alginato muestra que en el alginato de *S. sinicola* hay una menor concentración por área de la microalga, lo cual se atribuye a una menor reducción en el tamaño de la esfera.

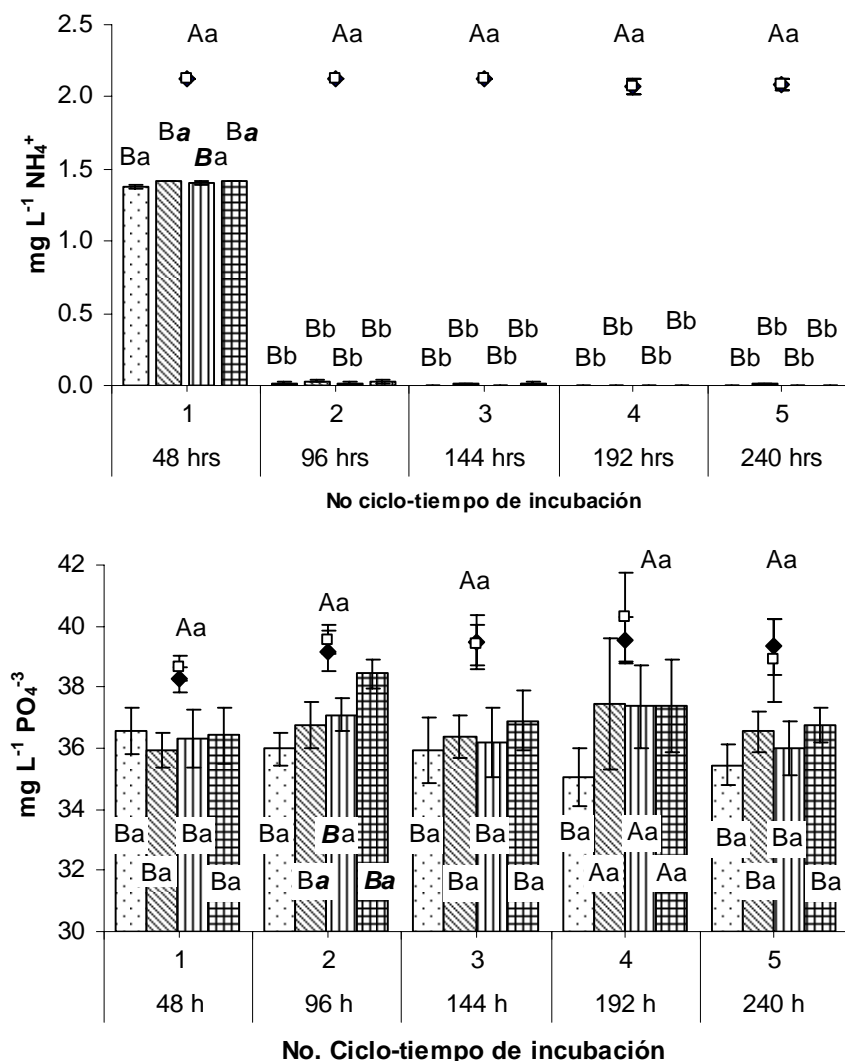


**Figura 22.** Crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada y co-inmovilizada con *A. brasilense*, por distribución en esferas de alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifera*. (A) Zona central, (B) 0.2-0.4 mm del centro, (C) 0.4-0.6 mm, (D) 0.6-0.8 mm, y (E) 0.8-1.0 mm. Las barras con letra mayúscula diferente denotan diferencias significativas por tratamiento, ANOVA ( $p \leq 0.05$ ). Las barras representan error estándar para cada ciclo.



### 7.3.6. Remoción de nutrientes

La remoción de amonio y fosfatos (Figura 23) también tuvo un comportamiento similar entre los dos tipos de alginato. El amonio es removido prácticamente en su totalidad a partir del segundo ciclo y se mantiene así hasta el último ciclo, mientras que la remoción de fosfatos es más irregular aunque se alcanza una remoción del 20% en algunos ciclos.



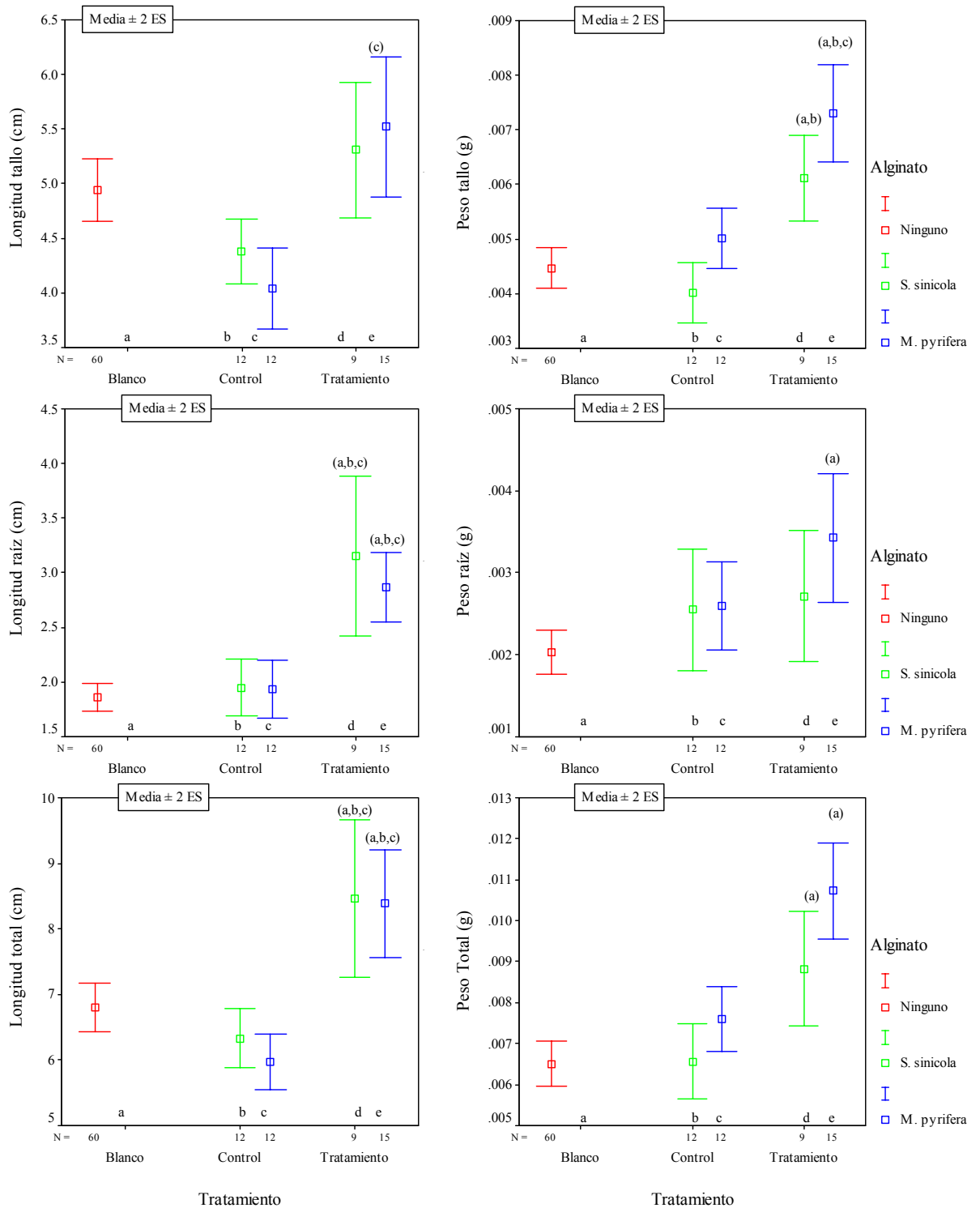
**Figura 23. Remoción de amonio y fosfatos con inmovilizados de *C. sorokiniana* y co-inmovilizado con *A. brasilense* en alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifera*.** Las letras mayúsculas indican diferencias significativas en la remoción de nutrientes con su control. Las letras minúsculas indican diferencias significativas consecutivas por ciclo de tratamiento. Las letras mayúsculas en cursiva indican diferencias por el tipo de alginato. Las letras minúsculas en cursiva indican diferencias significativas entre el inmovilizado y el co-inmovilizado. K-W ( $\alpha=0.05$ ), prueba *a posteriori* SNK

### 7.3.7. Promotores de crecimiento de plantas

En esta etapa se utilizó el alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifer*a para preparar micro-cápsulas de la bacteria promotora del crecimiento de plantas *A. brasilense*, para inocular plantas de jitomate variedad ACE. Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias significativas en el crecimiento de las plantas por tratamiento, donde el mayor crecimiento y ganancia en peso se obtuvo en las semillas inoculadas con *A. brasilense* (Figura 24). La comparación por tipo de alginato no mostró diferencias significativas en la longitud total y el peso total de las plantas inoculadas con micro-cápsulas por tipo de alginato (*S. sinicola* y *M. pyrifer*a).

Tratamiento		Alginato	N	Longitud (cm)	Peso (mg)
Blanco (semillas sin microesferas)	Tallo	-----	60	4.94 ± 1.13	4.47 ± 1.43
	Raíz	-----	60	1.86 ± 0.51	2.03 ± 1.06
	Total	-----	60	6.80 ± 1.42	6.51 ± 2.14
Inoculo control (micro esferas de alginato sin bacteria)	Tallo	<i>S. sinicola</i>	12	4.38 ± 0.51	4.01 ± 0.95
		<i>M. pyrifer</i> a	12	4.04 ± 0.64	5.01 ± 0.95
	Raíz	<i>S. sinicola</i>	12	1.95 ± 0.46	2.55 ± 1.28
		<i>M. pyrifer</i> a	12	1.93 ± 0.46	2.60 ± 0.93
	Total	<i>S. sinicola</i>	12	6.33 ± 0.79	6.57 ± 1.59
		<i>M. pyrifer</i> a	12	5.98 ± 0.73	7.61 ± 1.36
Inoculo Tratamiento (microesferas con <i>A. brasilense</i> )	Tallo	<i>S. sinicola</i>	9	5.31 ± 0.93	6.11 ± 1.18
		<i>M. pyrifer</i> a	15	5.52 ± 1.23	7.30 ± 1.72
	Raíz	<i>S. sinicola</i>	9	3.16 ± 1.09	2.72 ± 1.20
		<i>M. pyrifer</i> a	15	2.87 ± 0.62	3.43 ± 1.52
	Total	<i>S. sinicola</i>	9	8.47 ± 1.81	8.83 ± 2.08
		<i>M. pyrifer</i> a	15	8.39 ± 1.59	10.73 ± 2.28

**Tabla 6. Promoción de crecimiento de plantas inoculadas con alginato de *S. sinicola* y *M. pyrifer*a.**



**Figura 24. Crecimiento de plantas de Jitomate, variedad ACE, inoculadas con la bacteria promotora de crecimiento de plantas, *A. brasilense*, después de 30 días de tratamiento. Las letras entre paréntesis representan diferencias significativas entre los grupos. (K-W,  $\alpha = 0.05$ , prueba *a posteriori* Dunn).**

## 8. ANÁLISIS

### 8.1. PRODUCCIÓN DE ALGINATO DE *S. SINICOLA*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el proceso de producción del alginato de *S. sinicola*, la primera hipótesis del trabajo se debe rechazar, ya que el rendimiento que se obtuvo no fue mayor al reportado previamente. Sin embargo, el análisis de costos de producción para los procedimientos experimentales muestra que elevar el rendimiento no es necesariamente lo más adecuado para optimizar la producción a un nivel industrial, sobre todo cuando el incremento del rendimiento conlleva un aumento importante en los costos de producción.

Es importante resaltar la importancia de las propiedades y características del alginato para una aplicación específica. Por ejemplo, en nuestro caso, no necesitamos generar un gasto en la reducción del color del alginato de *S. sinicola* cuando nuestros resultados indican que el color café del alginato no afecta el crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* que utilizamos para la remoción de nutrientes de aguas residuales. Como tampoco necesitamos reducir el color para los inoculantes promotores de plantas, ya que este no afecta el crecimiento de la bacteria *A. brasilense* ni de nuestras plantas de jitomate. Podemos señalar que lo más importante es la optimización del costo-beneficio durante la producción del alginato de *S. sinicola*, aunque debemos destacar que desde la utilización del alginato de *S. sinicola* ya se estaría generando un beneficio al utilizar un alga con una biomasa importante, que estacionalmente se desprende y se deposita en las playas aledañas a su crecimiento sin tener una utilidad evidente.

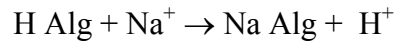
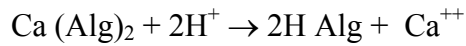
Para poder optimizar el proceso de producción a nuestras necesidades, es necesario destacar las modificaciones que se realizaron durante el proceso, ya que cada una de ellas

tiene una connotación importante en las propiedades del alginato a obtener. Estas modificaciones deberán considerarse en caso de que se busque una nueva aplicación al alginato de *Sargassum sinicola*.

Durante la hidratación se modificó tanto la concentración de formaldehído, como el tiempo y las repeticiones a las que se expusieron las algas a este. El tratamiento con formaldehído, usado por primera vez por Gloahec (1939), y modificado por Haug, (1964), da como resultado el origen de productos insolubles por la reacción de los compuestos fenólicos con el formaldehído (McHugh, 1987). Los grupos fenólicos son responsables de la formación de productos coloreados de café durante la extracción alcalina, debido a que estos dan lugar a productos oxidados/polimerizados con el alcali. Nuestros resultados muestran que la adición de formaldehído tiene un efecto importante en la reducción del color del alginato, no solo en cuanto a la concentración de formaldehído adicionado, sino también al tiempo y al número de repeticiones de hidratación. El incremento en la concentración de formaldehído no mostró un efecto significativo en el rendimiento o costos de producción, aunque habrá que tener cuidado con el tiempo de hidratación ya que se observa una ligera reducción en la viscosidad final del producto cuando la hidratación se lleva a cabo durante 36 horas. La concentración de compuestos fenólicos que obtuvimos en el alginato de *S. sinicola*, teóricamente se puede reducir con el incremento en la concentración de formaldehído o con el número de repeticiones de hidratación en caso de que se requiera.

La etapa de pre-extracción ácida en el proceso de producción del alginato facilita la extracción alcalina del alginato insoluble presente en las algas, a alginato soluble. En las algas cafés, el ácido algínico está presente principalmente como la sal de  $\text{Ca}^{2+}$  de ácido algínico, aunque también puede haber sales de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Na}^{+}$ . (McHugh, 1987;

Hernández-Carmona, *et al.* 1999a). El objetivo de la pre-extracción es precisamente la eliminación de estos iones por medio de un ácido fuerte como el ácido clorhídrico, obteniéndose ácido algínico insoluble dentro del alga. Además, el ácido mineral remueve todos los compuestos fenólicos ácido-solubles.



En algunos casos, se ha mostrado que *S. sinicola* llega a tener una mayor concentración de iones magnesio y calcio que *M. pyrifera*, y menor concentración de potasio ( $\text{Mg}^{2+}$  130,  $\text{Ca}^{2+}$  37,  $\text{K}^+$  29 y  $\text{Mg}^{2+}$  52,  $\text{Ca}^{2+}$  14,  $\text{K}^+$  52  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente; Manzano y Rosales, 1989 y Gojon, 1997). Teóricamente las sales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  del ácido algínico requieren una mayor concentración de ácido para ser intercambiadas durante la pre-extracción, comparadas con las sales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , por lo que la pre-extracción ácida para *S. sinicola* pudiera requerir una mayor concentración de ácido para facilitar la extracción alcalina, comparado con *M. pyrifera*. Sin embargo, las proporciones iónicas son muy variables para esta especie. Pérez Reyes, 1997 y Casas-Valdez, 2004, muestran una mayor concentración de iones potasio en comparación con magnesio y calcio. En nuestro caso, no evaluamos la concentración iónica en el alga *S. sinicola*, por lo que desconocemos que tanta influencia tienen estos iones durante la pre-extacción, aunque suponemos que la concentración iónica es mayor que en *M. pyrifera*, ya que las cantidades de ácido necesarias durante la pre-extracción fueron superiores.

Como se aprecia en los resultados, el intercambio iónico en el sistema de flujo continuo es más eficiente que en el sistema de carga, pero con un incremento significativo en los costos de producción a pesar del rendimiento obtenido. De acuerdo al análisis

estadístico, es más importante el pH que el sistema de pre-extracción, obteniéndose los mejores resultados en cuanto al rendimiento y costos de producción en el sistema de carga a un pH 2. Este sistema no sólo reduce la cantidad de agua y ácido que se utiliza durante la pre-extracción, sino también genera una mayor eliminación de compuestos fenólicos ácido-solubles (McHugh, 1987). Hernández-Carmona y Aguirre-Vilchis, (1987) mencionan que el rendimiento de extracción del alginato para *M. pyrifera* está en función del tiempo del tratamiento ácido y de la capacidad de saturación iónica de la solución, lo cual está relacionado a su vez, con el porcentaje de iones presentes en el alga y a la velocidad del intercambio iónico. En su caso, el mejor rendimiento lo obtienen en el sistema de flujo continuo 0.2N ( $\approx$  pH 1), sin embargo, como observamos en nuestros resultados el costo operacional de elevar la concentración ácida en nuestro caso es demasiado alto, por lo que nos resulta conveniente mantener la pre-extracción a un pH de 2.

Durante la extracción, las sales de calcio y magnesio insolubles son transformadas a la forma soluble, de manera que pueden ser removidas del resto del alga. Las altas temperaturas y los tiempos largos de extracción conducen al rompimiento de las cadenas de ácidos urónicos y consecuentemente disminuir la viscosidad del alginato de sodio para su extracción, sin embargo, estos factores son determinantes para la calidad y rendimiento del alginato extraído. A los 70°C obtuvimos el menor rendimiento de extracción, lo que nos hace suponer que el rompimiento de la pared celular es insuficiente a esta temperatura, lo cual a su vez eleva los costos de producción. A 80° C, durante 2 horas, obtuvimos los mejores resultados, obteniendo un buen equilibrio en el rendimiento, costos de producción, y viscosidad del producto.

Las condiciones de extracción dependen mucho del tratamiento de hidratación y pre-extracción a las que hayan estado sometidas las algas. Una hidratación prolongada o

una pre-extracción demasiado ácida, por largo tiempo, pueden tener como consecuencia la desnaturalización de las cadenas poliméricas del alginato si se combinan con una temperatura de extracción alta o un tiempo excesivo. Hernández- Carmona, et al. (1999a) muestran que una temperatura elevada por largos periodos tiende a reducir el rendimiento de producción del alginato en *M. pyrifera*. Esto no solo genera una disminución en el rendimiento, sino también en la viscosidad del alginato, el cual es uno de los parámetros principales a considerar para su aplicación, lo cual a su vez incrementaría los costos de producción.

El blanqueado es un paso necesario para lograr un color y olor deseado del producto final. Este paso es mejor si se realiza en el estado de alginato de calcio, ya que este es más resistente a la degradación que el ácido algínico (McHugh, 1987). Usualmente se adiciona una solución de hipoclorito de sodio al 1% a la suspensión de alginato de calcio en agua, dependiendo del alga utilizada y a la efectividad de los tratamientos con formaldehído y ácido. En el caso de *M. pyrifera*, se ha mostrado que la adición de 0.48 mL g<sup>-1</sup> de hipoclorito de sodio es suficiente para reducir de manera importante la coloración del alginato (McHugh, et al. 2001). Sin embargo, en nuestro caso, el blanqueado del material fue menos eficiente que el tratamiento con formaldehído y el pre-tratamiento ácido para la eliminación de la coloración. Esto conlleva el incremento en los costos de producción, aunado al poco beneficio que nos genera remover el color del alginato. En base a esto, la aplicación del alginato en la inmovilización celular para el tratamiento de aguas residuales y como promotores de crecimiento de planta no requiere de un proceso de blanqueado muy exhaustivo, lo cual nos genera una importante reducción en los costos de producción.

Durante la producción a nivel planta piloto se utilizó el método de cloruro de calcio. Este procedimiento incluye tres pasos más que el realizado durante la extracción a nivel



laboratorio. El alginato de sodio después de ser filtrado se precipita a alginato de calcio, en lugar de ser neutralizado directamente con alcohol. Las fibras de alginato de calcio, son más fáciles de manejar y permiten la eliminación de agua eficientemente. Posteriormente se realiza la conversión a ácido algínico con tres lavados ácidos (HCl), para facilitar su conversión nuevamente a alginato de sodio mediante la adición de  $\text{NaCO}_3$  y alcohol. Este proceso reduce cuantiosamente la cantidad de alcohol necesario para la neutralización del alginato de sodio hasta su presentación final. Debido al mayor número de etapas durante la producción con el método de cloruro de calcio, la pérdida de material durante el proceso también se incrementa, por lo que nuestro rendimiento se reduce notablemente.

Comparativamente con el alginato de *M. pyrifera*, el alginato de *S. sinicola*, requiere una mayor concentración de  $\text{CaCl}_2$  durante su conversión a alginato de calcio (3:1 de  $\text{CaCl}_2$ : Solución de alginato, en lugar de 2:1). Sin embargo, debido a que la viscosidad del alginato de sodio de *S. sinicola* es menor que la de *M. pyrifera*, el proceso de producción se puede llevar a cabo con una mayor cantidad de material a procesar. Mientras que para *M. pyrifera* la producción se realiza con 10 kg de alga, con *S. sinicola* podemos procesar 20 kg. Esto no solo reduciría los costos de producción, sino también el tiempo del proceso de producción.

## **8.2. CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO DE *S. SINICOLA***

Las diferencias en la estructura de los alginatos, generalmente está relacionada con las especies y sus requerimientos ambientales (Panikkar y Brasch, 1996), dando lugar a la conformación de alginatos con características diferentes y únicas. Aparentemente el alginato de *S. sinicola*, presenta una mayor estabilidad que el alginato de *M. pyrifera*, ya que tiene una mayor cantidad de unidades de ácido gulurónico. Los enlaces biaxiales (GG)

de la cadena polimérica dan como resultado una rotación más larga y difícil alrededor del enlace glucosídico, lo que debe contribuir a la rigidez y extensión de las cadenas de alginato (Draget, *et al.* 2002). De acuerdo a esto, la alta composición de  $F_{GGG}$  (0.51) en el alginato de *S. sinicola*, debería de reflejarse en la viscosidad del alginato, sin embargo esta es baja. Posiblemente la composición  $F_{GGG}$  del alginato se refleje más en la estabilidad del alginato que en su viscosidad. Durante el procedimiento de esterilización del alginato observamos que de acuerdo al porcentaje de reducción de la viscosidad del alginato, el de *S. sinicola* es mucho más estable (35% reducción) que el de *M. pyrifera* (500% reducción). La composición y estructura de las unidades de ácido gulurónico también está relacionada con la capacidad de gelificación. Esto se ve reflejado en el valor promedio de la longitud de los bloques de ácido gulurónico superior a uno ( $N_G > 1$ ) (Smidrød, *et al.* 1992, Draget, *et al.* 2002), donde se ha observado que un alto contenido de triadas de ácido gulurónico genera una mayor fuerza mecánica, mayor estabilidad con la combinación con cationes monovalentes, y menor encogimiento durante la formación del gel (Martinsen, *et al.* 1989, Skjåk-Bræk, & Martinsen, 1991b). Adicionalmente, estas características afectan las propiedades de difusión en el gel, siendo mejores cuando el contenido de ácido gulurónico es alto (Martinsen, *et al.* 1989, 1992).

### 8.3. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

*Chlorella sorokiniana* es un alga verde unicelular que en su crecimiento exponencial contiene cerca de 50% de proteína, 5% de clorofila, y un gran número de vitaminas, con la incorporación de nitrógeno y fósforo, y generando una reducción de la demanda biológica de oxígeno del medio (Lee, 1980). Su incorporación en el alginato de *S. sinicola* en la preparación de inmovilizados y co-inmovilizados, mostró ser eficiente, sin encontrar

diferencias significativas en su crecimiento y en la remoción de amonio y fosfato por tipo de alginato. A pesar de la coloración del alginato de *S. sinicola*, lo cual generó una reducción en la penetración de luz adicional de 30%, la microalga *C. sorokiniana*, se desarrolló en forma similar a su control con alginato de *M. pyrifera*. Robinson *et al.* (1985), mencionan que la luz no es un factor limitante para el crecimiento de *Chlorella*, sino más bien la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, lo cual puede generar un efecto de zonación en la superficie de las esferas.

Como hemos mencionado, las propiedades del gel de alginato también están relacionadas con la fuente y tipo de alginato del que se trata. Por un lado, se ha observado que la fuerza mecánica del gel, la capacidad de difusión dentro del gel y la estabilidad del volumen son directamente proporcionales al contenido y longitud en promedio de los bloques-G de la cadena polimérica (Martinsen, *et al.* 1989), mientras que por otro lado, la concentración del alginato es inversamente proporcional a la difusión en la red del gel (Martinsen, 1992). La combinación de estos factores nos sugiere que efectivamente la capacidad de gelificación y estabilidad del gel es mayor cuando utilizamos el alginato de *S. sinicola*, así como la capacidad de difusión dentro de la esfera, sin embargo dado que la concentración que se utilizó en el alginato de *S. sinicola* fue mayor que en *M. pyrifera*, para la homogeneización de la viscosidad de ambos alginatos, esto podría originar una disminución en la capacidad de difusión dentro de la matriz del gel.

Otro de los factores que puede interferir con el crecimiento de microorganismos en el gel de alginato es la concentración de compuestos fenólicos, la cual fue mayor en el alginato de *S. sinicola*. Consecuentemente, es posible pensar que existe un equilibrio entre los factores negativos (alta concentración, compuestos fenólicos, color) y positivos (mayor

cantidad de unidades G y cadenas más largas) propios del alginato de *S. sinicola*, ya que en general no observaron diferencias en la capacidad de remoción de nutrimentos.

Otra de las diferencias importantes que se observaron entre las esferas por tipo de alginato, fue el tamaño de las esferas. Durante el proceso de formación del gel se genera una reducción en tamaño o encogimiento del gel relacionado con la cantidad de ácido gulurónico del alginato. El mayor encogimiento se presentó en el alginato de *M. pyrifer*a, dando lugar a esferas con un menor tamaño que a las esferas formadas con alginato de *S. sinicola* ( $2.41 \pm 0.10$  mm y  $2.66 \pm 0.12$  mm, respectivamente). Esto da como resultado una menor difusión en las esferas de *M. pyrifer*a con una mayor concentración por área del número de microalgas.

El crecimiento de la microalga fue superior cuando estuvo co-inmovilizada con la bacteria *A. brasilense*, lo cual concuerda con lo descrito por distintos autores (Gonzalez y Bashan, 2000; Lebsky, *et al.* 2001), donde la bacteria ejerce un efecto positivo para el desarrollo de la microalga, como se explicará posteriormente.

Particularmente, durante el proceso de solidificación del alginato a esferas, se ha observado la formación de pequeñas cavidades de varios tamaños que se generan azarosamente dentro de la esfera (Gonzalez y Bashan, 2000). Las microalgas tienden a concentrarse, y tener cierta preferencia para su crecimiento, dentro de estas cavidades. Sin embargo, en el alginato de *S. sinicola* no se observan estas cavidades internas como en el alginato de *M. pyrifer*a, sino más bien una especie de canales donde aparentemente hay una mayor concentración y un crecimiento preferente de las microalgas. Las observaciones de los cortes histológicos de las esferas incluidas en parafina mostraron un crecimiento similar en el número total de microalgas por zona dentro de la esfera para ambos tipos de alginato, donde la distribución de las microalgas fue estadísticamente uniforme de los extremos

hacia el centro. La formación de cavidades en el alginato de *M. pyrifera* y de canales en el alginato de *S. sinicola*, fue homogénea en las esferas

#### **8.4. INOCULANTES COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS**

El crecimiento de plantas de jitomate fue similar entre las semillas inoculadas con las microesferas de *A. brasilense*, inmovilizado en alginato de *M. pyrifera* y *S. sinicola*. En ambos casos hay una estimulación del crecimiento de las plantas, sin embargo existen algunas diferencias importantes entre ellos a considerar. Por un lado, la estabilidad de las esferas esta relacionada con la concentración de unidades de ácido gulurónico. Entre mayor sea el número y longitud de los bloques de ácido gulurónico, mayor será la estabilidad del alginato y tardarán más en degradarse las esferas. Esto conlleva que la liberación de la bacteria sea más lenta, aunque de manera más prolongada, en el alginato de *S. sinicola*. Esta estabilidad a su vez podría generar un mayor tiempo de almacenamiento si pensamos en semillas comerciales inoculadas con microencapsulados de alginato, dado que la degradación sería menor. Por otro lado, la coloración del alginato podría ser una ventaja durante la manipulación de los microencapsulados, ya que facilitaría su cuantificación.

El efecto más notorio en el desarrollo de las plantas de jitomate se observó en el crecimiento a nivel de la raíz. Se ha descrito que uno de los principales efectos de la inoculación de plantas con bacterias promotoras del crecimiento es precisamente la estimulación de la formación de pelos radiculares de la raíz, lo cual promueve a su vez el desarrollo de la raíz y de la planta (Michiels, et al. 1989). Al tener un crecimiento y mantenimiento adecuado de la bacteria inmovilizada en el alginato de *S. sinicola*, estamos asegurando la estimulación del crecimiento de la raíz y de la planta.

## 9. CONCLUSIONES

El alga *S. sinicola* puede ser utilizada para la producción de alginato de sodio, con un rendimiento aproximado de 15 %, viscosidad de  $\approx 100$  mPa s (2%), y a un costo aproximado de 7.8 USD kg<sup>-1</sup> alginato. Este alginato tiene una alta cantidad de F<sub>GGG</sub> en su composición estructural, lo cual determina su alta estabilidad y capacidad de formación de gel.

El método más adecuado para la producción de alginato de *S. sinicola* es el siguiente:

- Hidratación con formaldehído al 0.4% durante 12 horas.
- Pre-extracción ácida en sistema de carga pH 2.
- Extracción a 80°C durante 2 horas pH 10.
- Filtración al vacío con filtro revestido con tierra de diatomeas.
- Conversión a alginato de calcio en proporción 3:1 (CaCl<sub>2</sub>: Solución de alginato).
- Sin procedimiento de blanqueado

Durante la etapa de hidratación se observa un decremento importante en la coloración del alginato al aumentar la concentración del formaldehído, sin llegar a tener efectos deletéreos en el rendimiento y viscosidad del alginato. La pre-extracción en sistema de carga y pH 2 no mostró diferencias significativas en el rendimiento del alginato, sin embargo, durante la extracción en carga hay un aumento importante en la viscosidad del mismo, así como una reducción en la cantidad de agua que se utiliza durante el proceso. El mayor rendimiento durante la extracción se obtuvo a 80° C en un lapso de 2 horas. El

procedimiento de blanqueado no mostró tener un efecto favorable en la reducción del color del alginato.

De acuerdo al proceso utilizado para la producción de alginato a nivel planta piloto, el alginato de *S. sinicola* tiene una coloración café intensa, con una concentración de compuestos fenólicos de  $(58.83 \pm 8.62 \text{ mg kg}^{-1} \text{ GAE})$ .

A pesar de estas características, que usualmente no son recomendables en la industria de producción de alginato, el alginato de *S. sinicola* mostró ser útil para su aplicación en la remoción de nutrientes de aguas residuales y para la promoción de crecimiento de plantas, mediante la inmovilización de la microalga *Chlorella sorokiniana* y la bacteria *Azospirillum brasilense*. Ambos microorganismos crecieron favorablemente al ser inmovilizados y co-inmovilizados en el alginato de *S. sinicola*, sin encontrar diferencias significativas tanto en la remoción de nutrientes de agua residual como en la promoción del crecimiento de plantas de tomate, en comparación con el alginato control de *M. pyrifera*.

## 10. RECOMENDACIONES

Durante la etapa de extracción a nivel planta piloto, es necesario disminuir el volumen de dilución de la solución de alginato para facilitar su procesamiento hasta la precipitación a alginato de calcio, en donde también es necesario aumentar considerablemente la concentración de cloruro de calcio para que la precipitación se lleve adecuadamente.

Para reducir la composición de compuestos fenólicos y la coloración del alginato, se recomienda aumentar el número de hidrataciones a 3 (durante 30 min.), e intercalarlas con 2 procesos de pre-extracción a pH 2 con un tiempo de 7 minutos cada uno. Esto reduce importantemente la coloración y la composición de compuestos fenólicos, con un ligero incremento en los costos de producción (8.3 USD kg<sup>-1</sup>), sin afectar la viscosidad del producto. Sin embargo, cuando los compuestos fenólicos y la coloración no sean un factor importante, se deberán optimizar los costos de producción.

La concentración del alginato de *S. sinicola* utilizado para la inmovilización celular fue de 2.45%, sin embargo, dado que la concentración de F<sub>GGG</sub> del este alginato es alta, es posible reducir dicha concentración sin afectar la capacidad de formación de gel.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aponte de Otaola, N. E., M. Diaz-Piferrer y H. D. Graham. (1983) Seasonal variations and anatomical distribution of alginic acid in *Sargassum spp* found along the coasts of Puerto Rico. *Journal of Agriculture University of Puerto Rico*. 47 (4): 464-475
- Arvizu-Higuera, D. L., G. Hernandez-Carmona y Y. E. Rodríguez-Montesinos. (1995) Sistemas de carga y en flujo continuo durante la etapa de pre-extracción ácida en el proceso de extracción de alginatos. *Ciencias Marinas*. 21(1): 25-37
- Bashan, Y. (1986) Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (5): 1089-1098.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*. 16 (4): 729-770
- Bashan, Y., E. A. Davis; A. Carrillo-García y R.G. Linderman (2000) Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to establishment of cactus seedlings under mesquite nursetrees in the sonoran desert. *Appl. Soil. Ecol.* 14: 165-176
- Bashan, Y., J-P. Hernandez, L. A. Leyva y M. Bacilio. (2002) Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*.
- Bashford, L. A., R. S. Thomas y F. N. Woodman. (1950) Manufacture from brown marine algae. *Joun. Soc. Chem. ind.* 69: 337-343
- Booth, E. (1975) *Seaweeds in Industry*. Chapter 22, En: J. P. Riley and G. Skirrow. Chemical Oceanography. Vol. 4; 2<sup>a</sup> edición. USA: 219-265pp
- Carrillo-Gracia, A., Bashan, Y., Diaz-Rivera, E., y Bethlenfalvay, G. J. (2000) Effects of resource - island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Restor. Ecol.* 8: 65-73
- Casas-Valdez, M. M. (1975) *Extracción, cuantificación y caracterización parcial de alginatos procedentes de seis especies de Phaeophyta de las costas de México*. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- Casas-Valdez, M. M. (1982) Avance para la industrialización de los alginatos en México. *Serie técnica # 1 CICIMAR*. 20 pp
- Casas-Valdez, M. M. (1985) Cuantificación y caracterización parcial de alginatos de algunas especies de algas feofitas de las costas de México. *Inv. Mar. CICIMAR*. 2(1): 46-58
- Casas-Valdez, M. M., I. Sanchez.-Rodríguez y G. Hernández-Carmona. (1993) Evaluación de *Sargassum spp* en la costa oeste de Bahía Concepción, B.C.S., México. *Inv. Mar. CICIMAR*. 8(2): 61-68
- Casas-Valdez, M. M. (2001) *Efecto de la variabilidad climática sobre la abundancia de Macrocystis pyrifera y Gelidium robustum en México*. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México. 133pp.
- Casas-Valdez, M. M. (2004) Uso de dietas elaboradas con *Sargassum spp* en camarón; I. Escalamiento a nivel piloto comercial para camarón blanco; II. Evaluación en camarón café. *Informe Técnico, CICIMAR-IPN*.
- Castillo-Ferrer, M. (1993) *Obtención y caracterización del alginato de Cobre*. Tesis de licenciatura Universidad de la Habana, Cuba. 60 pp

- Chauhan, V. D. (1970) Variations in alginic acid content with growth stages in two species of *Sargassum*. **Bot. Mar.** 13 (1): 57-58
- Cottrell, I. W. y P. Kovacs. (1980) *Alginate*. Chapter 2 En: RL Davidson. Handbook of water-soluble gums and resins. McGraw-Hill. New York, USA. 2\_2-2\_44
- Degusa, (2003). WWW.degusa-foodingredients.com
- de-Bashan, L. E., M. Moreno, J-P. Hernández y Y. Bashan. (2002) Ammonium and phosphorous removal from continuous and semi-continuous cultures by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with *Azospirillum brasilense*. **Water Res.** 36: 2941-2948
- de-Bashan, L. E. y Y. Bashan (2004) Recent advances in removing phosphorous from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). **Water Res.** 38: 4222-4246
- de la Noüe, J., P. Chevalier y D. Proulx. (1990) *Effluent treatment with immobilized microalgae and cyanobacteria: A critical assessment*. Capítulo 6, en: Wastewater treatment by immobilized cells. Tyagi R. D. y K. Vembu Editores. CRC. 144-149
- Draget, K. I., O. Smidsrød y G. Skjåk-Bræk. (2002) *Alginates from algae*. En: Steinbüchel, A., De Dates, S. y E. J. Vandame. Biopolymers. Vol 6: Polysaccharides II. Wiley-VCH, Weinheim. 636pp
- Duville, C. A., J. L. Duville y E. Panzarasa. (1974) Estudios básicos sobre ácido algínico de algas pardas del litoral patagónico. 1: pre-tratamiento ácido, su influencia y aplicación. **CIBIMA. Contrib Tec.** 16. Buenos Aires, Argentina. 16pp
- Gojon, B. H. (1997) *Degradabilidad in situ y digestibilidad rumial de M. pyrifera (Laminariales; Phaeophyta) y Sargassum spp (Fucales; Phaeophyta) en ganado Bovino*. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Baja California Sur. B. C. S. 51pp
- González, F. J. G. (1983) *Variaciones individuales en la composición química y determinación del tamaño mínimo de muestra en mantos de Macrocytis pyrifera (L)* C Ag. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Baja California. México. 47pp
- Gonzalez, L. E., R. O. Cañizares y S. Baena. (1997) Efficiency of ammonia and phosphorous removal from colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology.** 60: 259-262
- Gonzalez, L. E. y Y. Bashan. (2000) Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 (4): 1527-1531.
- Grizeau, D. y N. J. Navarro. (1986) Glycerol production by *Dunaliella tertiolecta* immobilized with calcium alginate beads. **Biotechnol. Lett.** 8: 261-264
- Hardy, A. C. 1936. **Handbook of colorimetry**. In: APHA, AWWA, WPCF (American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Pollution Control Federation) Standard methods for the examination of water and wastewater. 18ª edición. Washington D.C. 1992, 1105pp
- Haug, A. (1964) *Composition and properties of alginates*. Rept. 30. Norwegian Inst. of Seaweed Res. Trondheim, Norway. 123 pp.
- Haug, A., B. Larsen y O. Smidsrød. 1966. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. **Acta Chem. Scand.** 20 (1): 183-190.

- Hernández-Carmona, G. (1985) Variación estacional del contenido de alginatos en tres especies de feofitas de Baja California Sur, México. *Inv. Mar. CICIMAR*. 2 (1): 30-45
- Hernández-Carmona, G. y M. M. Casas-Valdez. (1985) Precipitación del ácido algínico y su conversión a alginato de sodio en muestras de *Macrocystis pyrifera*. *Inv. Mar. CICIMAR*. 2(1): 18-28
- Hernández-Carmona, G. y M. Aguirre-Vilchis. (1987) Propiedades de intercambio iónico de *Macrocystis pyrifera* durante la pre-extracción ácida para la extracción de alginatos. *Inv. Mar. CICIMAR*. 3(2): 53-64
- Hernández-Carmona, G., M. M. Casas-Valdez, C. Fajardo-León, I. Sánchez-Rodríguez y Y. E. Rodríguez-Montesinos. (1990) Evaluación de *Sargassum spp* en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Inv. Mar. CICIMAR*. 5(1): 11-18
- Hernández-Carmona, G., M. M. Casas-Valdez y M. Aguirre-Vilchis. (1991) Proceso mejorado para la obtención de alginato de sodio a partir de *Macrocystis pyrifera*. *Inv. Mar. CICIMAR*. 6(2): 259-266
- Hernández-Carmona, G., M. Aguirre-Vilchis y Y. E. Rodríguez-Montesinos. (1992) Recirculación del ácido residual de la etapa de pre-extracción en el proceso de obtención de alginato de sodio. *Ciencias Marinas*. 18(1): 125-137
- Hernández-Carmona, G., D. McHugh, D. L. Arvizu-Higuera y Y. E. Rodríguez-Montesinos. (1999a) Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatment on yield and quality of alginate. *J. Appl. Phycol.* 10: 507-513
- Hernández-Carmona, G., D. J. McHugh y F. López-Gutierrez. (1999b) Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *J. Appl. Phycol.* 11: 493-502
- Hernández-Carmona, G., D. J. McHugh, D. L. Arvizu-Higuera y Y. E. Rodríguez-Montesinos. (2002) Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 4. Conversion of algínico acid to sodium alginate, drying and milling. *J. Appl. Phycol.* 14: 445-451
- Hirst, E. L., E. Percival y J. K. Wold. (1964) The structure of alginic acid. Part 4. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Soc.* 1493-1994.
- ISP: [www.isp.com](http://www.isp.com)
- King, A. H. (1983). *Brown seaweed extracts (alginates)*. In: Glicksman M. (ed.) Food Hydrocolloids. CRC Press. 115-188.
- Larsen, B. (1981) *Biosynthesis of alginate*. Xth International Seaweed Symposium. Tore levring editor; Walter de Gruyter y Co, Berlin, New York. 7-34
- Lebsky, V. K., L. E. Gonzalez-Bashan y Y. Bashan. (2001) Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 47: 1-8
- Lee, R. E. (1980) *Phycology*. Cambridge University Press. USA. 478pp
- Li, Y. Y., Q. Ding, P. C. K. Cheung, P. O. Ang Jr, y V. E. C. Ooi. (1999) Characterization of water-soluble polysaccharides (alginates) from subtropical brown seaweed. *Annual meeting IFT*. 65B-4
- Lukachyov, O. P. y V. K. Pochkalov. (1965) Method to obtain alginate from brown algae. *USSR Patent*, 200,416

- Manzano, M. R. E. y E. Rosales. (1989) *Aprovechamiento de las algas marinas *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum sinicola* en la alimentación humana y animal*. Tesis profesional. Universidad La Salle. México, D. F. 109pp
- Marinalg. www.marinalg.org
- Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk y O. Smidsrød. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering*. 33: 79-89
- Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk y O. Smidsrød. (1992) Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnology and bioengineering*. 39: 186-194
- McGhee, J. E.; M. E. Carr y G. St. Julian. (1984) Continuous bioconversion of starch to ethanol by calcium alginate-immobilized enzymes and yeast. *Cereal Chem.* 61: 446-449
- McHugh, D. J. (1987) Production, and utilization of products from commercial seaweeds. *FAO Fish Tech Pap.* 288:189pp
- McHugh, D. J., G. Hernández-Carmona, D. L. Arvizu-Higuera y Y. E. Rodríguez-Montesinos. (2001) Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversión of calcium alginate to alginic acid. *J. Appl. Phycol.* 13: 471-479
- McHugh, D. J. (2003) A guide to the seaweed industry. *FAO Fish Tech Pap.* No. 441. 105pp
- Munsell. (2000) *Munsell soil color charts*. GretagMacbeth ed. NY.
- Michiels, K., J. Vanderleyden y A. Van Gool. 1989. Azospirillum-plant root associations: a review. *Biol. Fertil Soils*. 8: 356-368
- Myklestad, S. (1968) Ion-exchange properties of brown algae. I. Determination of rate mechanism for calcium- hydrogen ion exchange for particles from *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata*. *J. Appl. Chem.* 18: 30-36
- Onsoyen, E. (1989) Marine Hydrocolloids in biotechnological applications. En: M. N. Voigt and J. R. Botta. Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability. Papers from the 34th Atlantic fisheries technological Conference and seafood biotechnology workshop. *Technomic*. St. Johns, Canada. 265-288pp
- Ortega, C. G. y A. G. Zaragoza. (1983) *Determinación de los parámetros de extracción de ácido algínico del alga café *Macrocystis pyrifera**. Tesis profesional, Universidad Autónoma de Baja California. México. 103pp.
- Pacheco-Ruiz, I., J. A. Zertuche-González, A. Chee-Barragán y R. Blanco-Betancourt. (1998) Distribution and Quantification of *Sargassum* Beds along the West Coast of the Gulf of California, México. *Bot. Mar.* 41:203-208
- Panikkar, R. y D. J. Brasch. (1996) Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 293: 119-132
- Pati, P. K. *et al.* (2002) Efficient method of protoplast culture. *U. S. Patent Office*. Application No. 20020173037.
- Perez-Reyes, C. (1997) *Composición química de *Sargassum* spp colectado en la Bahía de La Paz, BCS, y la factibilidad de su aprovechamiento en forma directa o como fuente de alginato*. Tesis M en C. IPN-CICIMAR. 76pp.
- Prevost, H., C. Divies y E. Rousseau, (1985) Continuous yogurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in calcium alginate. *Biotechnol. Lett.* 7: 247-252

- Reyes-Tisnado, R.; F. López-Gutiérrez; G. Hernández-Carmona y P. Castro-Moroyoqui. 2000. *Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones de los alginatos, polisacáridos de las algas phaeophytas*. SEMARNAT-INP. 72 pp.
- Rivera-Carro, H. D. (1984) Block structure and uronic acid sequence in alginates. *PhD Thesis, Norwegian Institute of Marine Biochemistry, University of Trondheim norway*. 144pp.
- Robinson, K. K., A. L. Dainty, K. H. Goulding, I. Simpkins y M. D. Trevan. (1985) Physiology of alginate-immobilized *Chlorella*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 212.
- Rodríguez-Montesinos, Y. E. y G. Hernández-Carmona. (1991) Variación estacional y geográfica en la composición química de *Macrocystis pyrifera* en la costa occidental de Baja California. *Ciencias Marinas*. 17(3): 91-107
- Sánchez-Rodríguez, I. (1995) *Fenología de Sargassum sinicola (Setchell y Gardner) en Bahía Magdalena, B.C.S., México*. Tesis de M en C. CICIMAR-IPN. 84pp
- Schwarzenbach, G. y H. A. Flaschka. (1969) *Complexometric titrations*. Barnes y Noble, USA. 490pp.
- Secconi, M. G. (1967) Procede de fabrication d'alginates pariant des cystosires ou algues similaires, et produit industriel obtenu. *Republique Francaise. Patente* 1,464,840
- Shymali, M., C. De Silva y N. Savitri-Kumar. (1984) Carbohydrate constituents of the marine algae of Sri lanka part II. Composition and sequence of uronate residues in alginates from brown seaweeds. *J. Natn. Coun. Sri Lanka*. 12(2):161-166
- Skjåk-Bræk, G. y A. Martinsen. (1991a) *Applications of some algal polysaccharides in biotechnology*. En: M. D. Guiry y G. Blunden. Seaweed resources in Europe: Uses and potential. John Wiley y Sons. New York, USA. 219-257pp
- Skjåk-Bræk, G. y A. Martinsen. (1991b) *Uses and potential*. En: Guiry, M. D., Blunden G. (ed) Seaweed resources in Europe. John Wiley y Sons. 259-308
- Smidsrød, O. y A. Haug. (1972) Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates. *Acta chem. Scand.*, 26: 2563-
- Smidsrød, O., S.T. Moe, K. Draget, y G. Skjåk-Bræk. (1992) *Microgels, superswelling gels and macrogels from alginates. New possibilities for an old polymer?* In: Phillips, G.O., Williams P.A., and Wedlock, D.S. (Eds), IRL Press, Oxford. 463-469
- Steiner, A. B. y W. H. McNeely. (1951) Organic derivatives of alginic acid. *Industrial and engineering chemistry*. 41 (9): 2073-2077
- Steiner, A. B. y W. H. McNeely. (1950) High-stability glycol alginates and their manufacture. *U.S. Patent* 2,494,911
- Steiner, A. B. (1947) Manufacture of glycol alginates. *US. Patent* 2,426,215.
- Valderrama, L.T., C. M. del Campo, C. M. Rodríguez, L. E. de-Bashan y Y. Bashan. (2002) Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*. 36: 4185-4192
- Valencia, O. L. (1995) *Fundamentos de fitoquímica*. Trillas, México. 235pp.
- Van den Hoek, C; DG. Mann y HM Jahns. (1995) *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Great Britain. 623pp
- Waterhouse, A.L. (2002) Determination of total phenolics. In: Current protocols in food analytical chemistry. John wiley and sons. USA. Supplement 6, Unit 11.1.1-11.1.8

## 12. ANEXOS

1. Costos de producción.

**Precio por kg alginato** = *Materia prima + suministros + mano de obra + mantenimiento (6 % de la inversión) + seguro contra accidentes (2 % de la inversión) + empaque del producto + gastos administrativos (15 % de las ventas) + investigación y desarrollo (5 % de las ventas) + depreciación.*

$$\text{Producción anual estimada (PAE)} = A \times R \times T$$

*A* es igual a la cantidad de algas procesadas durante 24 ciclos diarios con 150 kg de algas por ciclo (3600kg), *R* es el rendimiento experimental obtenido y *T* es el número de días de trabajo anual (312 días).

**Costos de la materia prima por kg de alginato:**

*Costo de algas + formaldehído + ácido clorhídrico + Carbonato de sodio + Tierra de diatomeas + Cloruro de calcio + Hipoclorito de sodio + Alcohol.*

$$\text{Algas} = C \times \frac{1}{R}$$

*C* es el costo del alga, donde se estimaron tres valores posibles de costo del alga *Sargassum sinicola*.: 20, 25 y 30 USD ton/peso/húmedo, y *R* el rendimiento.

$$\text{Formaldehído} = F \times 0.232 \text{ USD } L^{-1}$$

*F* es el estimado de la cantidad de formaldehído necesaria para realizar la hidratación en un tanque de 1000L a la concentración, tiempo y repeticiones durante la hidratación experimental: 0.0, 0.2, 0.4 y 0.6%, durante 12 o 36 horas con 1, 2, o 3 repeticiones.

$$\text{Acido clorhídrico} = A \times 0.137 \text{ USD } L^{-1} \times \frac{1}{R}$$

$A$  es la sumatoria de la cantidad experimental de ácido clorhídrico utilizado por g de alga durante la pre-extracción ácida en laboratorio y los lavados ácidos para la conversión a ácido algínico en planta piloto. El volumen de HCl se modificó de acuerdo al gasto por sistema experimental durante la pre-extracción: Sistema de pre-extracción en carga pH 2 ó 4, y sistema de flujo continuo pH 2 ó 1, y  $R$  el rendimiento.

$$\text{Carbonato de sodio} = Na \times 0.098 \text{ USD } kg^{-1} \times \frac{1}{R}$$

$Na$  es la sumatoria de la cantidad experimental de carbonato de sodio utilizada durante la extracción por g de alga procesada y durante la conversión a alginato de sodio en planta piloto. El volumen de  $Na_2CO_3$  se calculó proporcionalmente al utilizado durante el proceso experimental para alcanzar un pH de 10 durante la extracción y de 7 en la conversión, y  $R$  el rendimiento.

$$\text{Tierra de diatomeas} = T \times 0.2 \text{ USD } kg^{-1}$$

$T$  es la cantidad experimental de tierra de diatomeas utilizada durante la filtración por ciclo en planta piloto (3kg).

$$\text{Cloruro de calcio} = Ca \times 0.211 \text{ USD } kg^{-1}$$

$Ca$  se calculó en base al promedio experimental de cloruro de calcio que se utilizó durante la precipitación por ciclo en planta piloto, la cual varió según la formación de fibras.

$$\text{Hipoclorito de sodio} = H \times 0.242 \text{ USD } L^{-1}$$

$H$  es la cantidad experimental de hipoclorito de sodio por g de alga procesada utilizada durante el blanqueado a nivel laboratorio, de acuerdo a la concentración experimental.

$$\text{Alcohol} = ROH/10 \times 0.179 \text{ USD } L^{-1}$$

*ROH* es la cantidad experimental de alcohol que se utilizó durante la conversión a alginato de sodio a nivel planta piloto por ciclo.

### **Costos de la mano de obra por kg de alginato:**

24 personas para la producción, con un sueldo de 500 USD mensuales y 4 personas para la administración con un sueldo de 1000 USD mensuales.

$$\text{Mano de obra} = (\Sigma P_1 \times \Sigma S_1) + (\Sigma P_2 \times \Sigma S_2)$$

Donde  $P_i$  es el No. de personas por categoría y  $S_i$  es el salario anual por categoría por kg de alginato de acuerdo a:

$$S_i = \frac{\text{Sueldo} \times 12}{PAE}$$

### **Costos de mantenimiento por kg de alginato:**

$$\text{Mantenimiento} = \frac{6\% \text{ de la inversión}}{PAE}$$

### **Costos de seguro por kg de alginato:**

$$\text{Seguro para accidentes} = \frac{2\% \text{ de la inversión}}{PAE}$$

### **Costos de empaque por kg de alginato:**

$$\text{Empaque} = \left( \frac{PAE}{22.5 \text{ kg} \times 0.5} \right) / PAE$$

Donde 22.5 es la capacidad de empaque y 0.5 es el costo del empaque (USD/pieza)

### **Costos de administración, ventas y gastos generales por kg de alginato:**



$$\text{Administración} = \frac{15\% \text{ventas}}{PAE}$$

**Costos de investigación y desarrollo por kg de alginato:**

$$\text{Investigación y desarrollo} = \frac{5\% \text{ventas}}{PAE}$$

**Depreciación:**

$$\text{Depreciación} = \frac{\frac{\text{Inversión}}{11}}{PAE}$$

**2. Protocolo espectrofotométrico para la determinación del color, de acuerdo al Standard methods for the examination of water and wastewater, 1989 (Hardy, 1936).**

Se preparó una solución de alginato al 1 %, y se filtro en frascos de 250 mL, con la ayuda de una bomba de vacío y papel filtro Whatman No. 1. Se colocaron 2 mL en microcubetas de cuarzo, y se determinaron los valores de porcentaje de transmitancia con las siguientes longitudes de ondas (10 ordenadas):

No ordenada	X	Y	Z
	Longitud de onda (nm)		
2	435.5	489.5	422.2
5	461.2	515.2	432.0
8	544.3	529.8	438.6
11	564.1	541.4	444.4
14	577.4	551.8	450.1
17	588.7	561.9	455.9
20	599.6	572.5	462.0
23	610.9	584.8	468.7
26	624.2	600.8	477.7
29	645.9	627.4	495.2
Factor	0.09806	0.10000	0.11814

Después de determinar el porcentaje de transmitancia para cada longitud de onda, se suman los valores de cada columna y se multiplica por el factor apropiado para obtener los valores de tristimulo X, Y y Z. El valor del tristimulo Y es el porcentaje de luminancia. A partir de estos se calculan los coeficientes tricromáticos  $x$  y  $y$  de las ecuaciones:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}$$

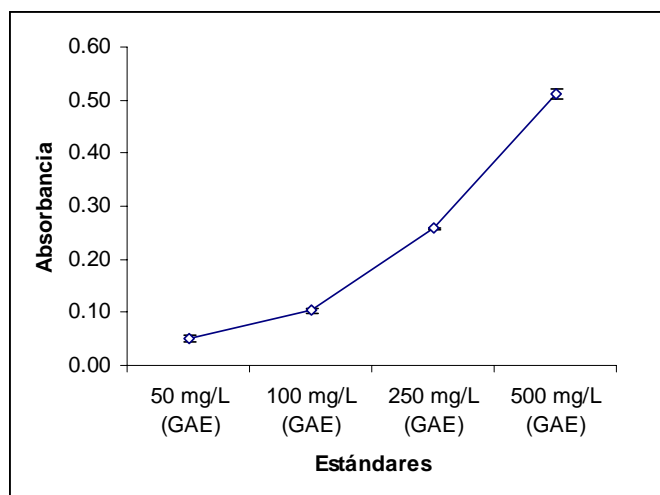
$$y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

Finalmente, los coeficientes  $x$ ,  $y$  se ubican en un diagrama de cromaticidad y se determina la longitud de onda dominante, y la pureza directamente del diagrama. El matiz del color se determina de acuerdo a los intervalos de la tabla de matices según los intervalos de distribución de la longitud de onda dominante.

### 3. Protocolo en microescala para la determinación de fenoles totales por colorimetría Folin-Ciocalteae, según el Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2002.

- Se colocan 20  $\mu\text{L}$  de muestra, estándar de calibración de ácido gálico, o blanco (agua desionizada o destilada) en una cubeta de 2 mL.
- Se adicionan 1.58 mL de agua, seguido de 100  $\mu\text{L}$  del reactivo FC, y se mezcla de 1 a 8 min.
- Se agregan 300  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato de sodio y se mezcla, incubando durante 2 hrs a temperatura ambiente.
- Se mide la absorbancia a 765 nm, restando la absorbancia del blanco para todas las lecturas y formando una curva de calibración de los estándares.
- Se usa la curva para determinar la concentración de ácido gálico correspondiente, y se reportan los valores en equivalentes de ácido gálico (GAE) usando las unidades de mg/L o mg/kg para sólidos.

Curva de calibración:



#### 4. Medios de cultivo y experimentales

##### Medio Residual sintético.

	mg/L
1 NaCl	7
2 CaCl <sub>2</sub>	4
3 MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2
4 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.7
5 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5
6 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.4
7 NH <sub>4</sub> Cl	10

##### Medio TYG

	g/L
1. KOH	4.8
2. C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	5
3. NaCl	1.2
4. MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.25
5. K <sub>2</sub> HPO	0.13
6. CaCl <sub>2</sub>	0.22
7. K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.17
8. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.4
9. NaHCO <sub>3</sub>	0.5
10. NH <sub>4</sub> Cl	1.0
11. NaCO <sub>3</sub>	0.09
12. EDTA-Ferrico	0.07
13. Triptona	5
14. Extracto de levadura	5
15. Dextrosa anhidro	5

##### Solución C30

	mg/L
1 KNO <sub>3</sub>	12.5
2 MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	5
3 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
4 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
5 Oligoelementos	0.5
6 FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.5