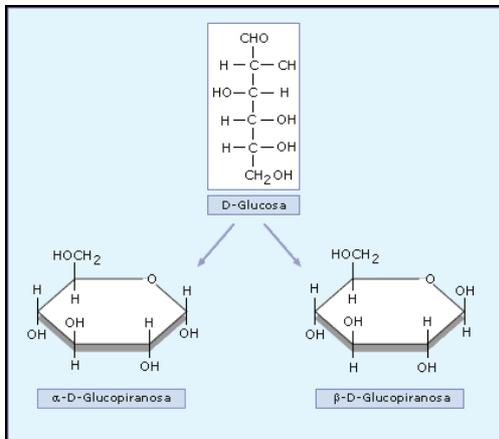
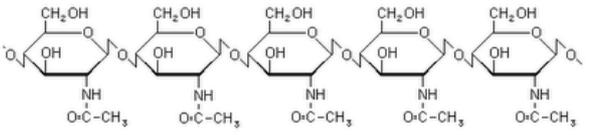
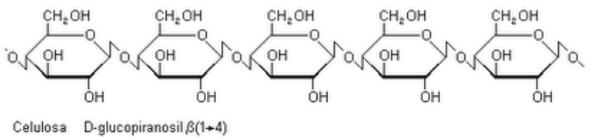
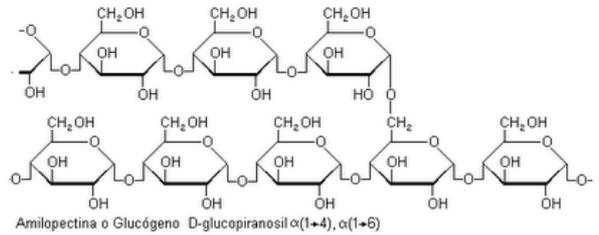
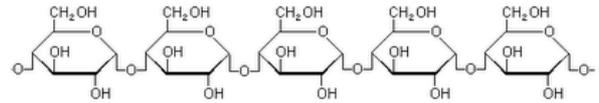


Biotecnología. Reacciones químicas amb microorganismes.

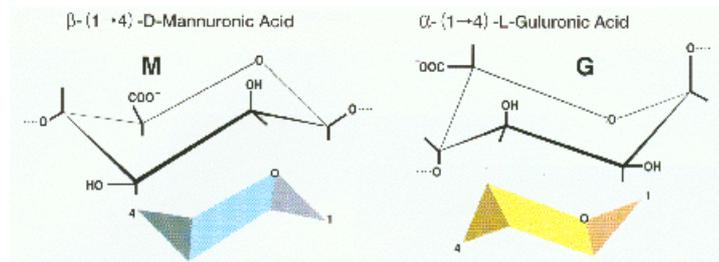
Los alginatos son unos biopolimeros que se obtienen de las algas pardas marinas de la familia de las "feofíceas". Fueron estudiados por primera vez en 1883 por el químico E. C. Stanford. Actualmente, las algas siguen siendo la fuente principal de materia prima para la producción de este biopolímero.



1.5 - Polisacáridos



Los alginatos son las sales del ácido algínico, un polisacárido natural formado por cadenas lineales constituidas por dos unidades repetitivas que derivan de los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G). Las fórmulas de las dos unidades constituyentes son:



Estructuras cíclicas de los ácidos manurónico y gulurónico

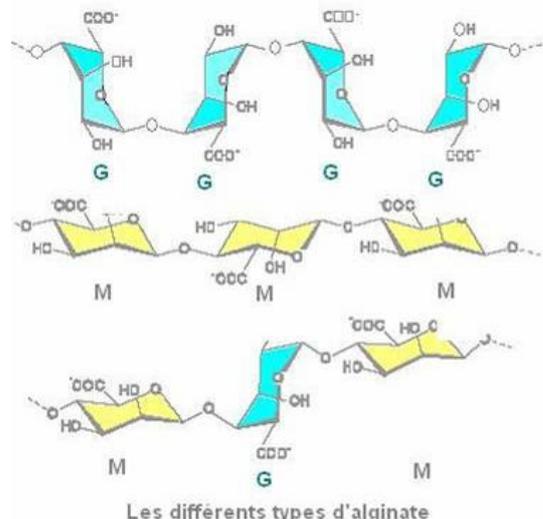
Estas unidades repetitivas no se disponen completamente al azar en el polisacárido, sino que se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$; y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. El contenido relativo de cada uno de estos bloques depende del tipo de alga y, en menor medida, de las condiciones de su crecimiento.

Composición de diferentes algas. Determinado por RMN

Tipo de alga	% MM	% MG+GM	% GG
<i>Laminaria hyperborea</i> (tallo)	17	26	57
<i>Laminaria hyperborea</i> (hojas)	36	38	26
<i>Lessonia trabeculata</i>	25	26	49
<i>Laminaria digitata</i>	43	32	25
<i>Eclonia maxima</i>	38	34	28
<i>Ascophyllum nosodun</i>	44	40	16

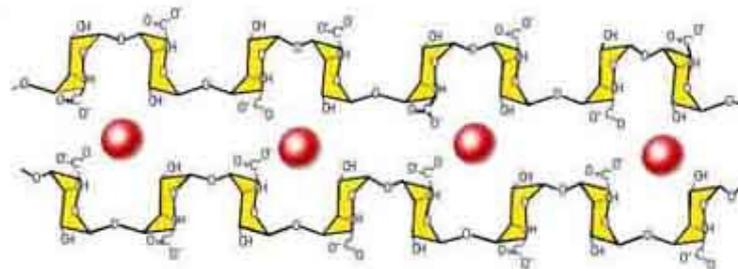
La forma que adopta la macromolécula depende de su composición, los bloques de ácido manurónico originan zonas casi planas, con estructura semejante a una cinta, mientras que las de ácido gulurónico presentan una estructura con entrantes y salientes.

La importancia de los alginatos viene dada por su capacidad para formar hidrocoloides, es decir la capacidad de hidratarse en agua caliente o fría dando lugar a soluciones viscosas, dispersiones o geles. Los alginatos son, de esta manera, modificadores del comportamiento de una masa de agua y por tanto útiles como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas. El resultado es un elevado número de aplicaciones en la industria química, farmacéutica y alimentaria.



El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH superiores a 3,5. También es soluble en mezclas de agua y algunos solventes orgánicos como el alcohol, pero es insoluble en leche que contiene calcio. La viscosidad de las soluciones de alginato depende de la concentración, elevándose mucho a partir del 2%, y de la temperatura, disminuyendo al aumentar ésta.

En presencia de calcio u otros iones divalentes, el alginato forma una solución espesa que normalmente presenta el aspecto de gel. El gel se forma por la acción coordinada de varias cadenas que se sitúan paralelas, alojándose en los huecos entre ellas varios iones calcio. La estructura se denomina "caja de huevos" y su estabilidad y resistencia se relaciona con lo bien que el catión encaja en los huecos que se forman entre los bloques de gulurónico. Así el estroncio, más voluminoso, forma estructuras aún más resistentes que el calcio y por el contrario el magnesio, más pequeño, no queda firmemente unido y, las soluciones de alginato de magnesio no forman geles.



Estructura en "caja de huevos" del alginato de calcio

Las propiedades físicas de los alginatos dependen de las cantidades relativas de bloques G, M y MG que contienen. Por ejemplo, la formación de geles con Ca^{2+} depende de la proporción de bloques G; a mayor proporción de éstos, mayor es la consistencia del gel. Los geles de alginato con calcio son irreversibles térmicamente, por lo que se utilizan mucho en materiales que van a ser calentados posteriormente, para su conservación o procesado posterior.

La industria alimentaria hace un amplio uso de los alginatos, ya que son polímeros comestibles que prácticamente carecen de sabor. Por ejemplo se utilizan para obtener "piezas de fruta" para su uso en repostería, o incluso

piezas con forma definida como "aros de cebolla" o "guindas". Las esferas de alginato, denominadas "perlas" se preparan a partir de una solución de alginato sódico en el zumo o salsa cuyo sabor queramos incorporar a las perlas.

También se emplean en la fabricación de aceitunas rellenas "de anchoa" o "de pimiento". El relleno consiste en una pasta formada por el componente básico triturado, los saborizantes que procedan, alginato, y un compuesto que aporte calcio para la formación del gel. Después de la solidificación, las aceitunas pueden procesarse térmicamente al ponerlas en conserva, sin que el relleno se licúe y salga al exterior.

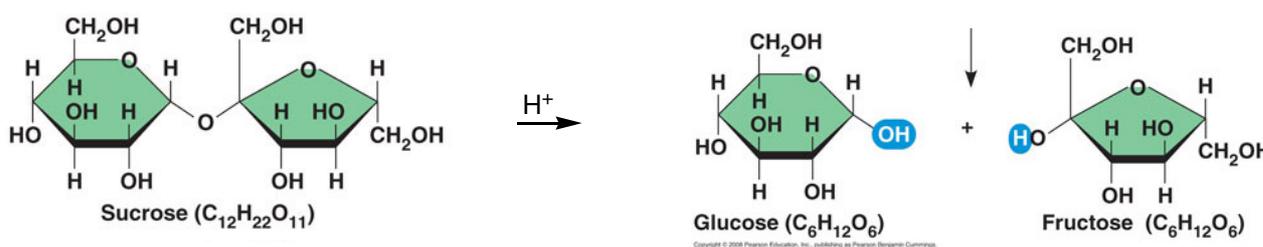


Tres ejemplos de utilización de alginatos: a) moldes en odontología, b) perlas con sabor a cerezas; c) relleno para aceitunas

Aplicaciones típicas de alginatos

Cerveza	Mantiene y mejora la calidad de la espuma
Creimas en pastelería	Instant gelling and thickening; heat stability; range of different textures; good mouthfeel and flavor release
Jugos de fruta	Stabilizing, emulsifying
Yoghurt	Stabilizing; good mouthfeel, texture and flavor release
Papel	Enhance greaseproof properties, oil resistance, and solvent holdout; improves rheology, water-retention, runability, ink holdout, and printability
Impresión en tejidos	Gives the desired rheology to print pastes; is inert to dyes and fibers; has excellent wash-out properties.

En esta práctica vamos a utilizar un gel de alginato para englobar, inmobilizar, un biocatalizador. La ventaja de esta metodología consiste en que, acabada la reacción, el catalizador biológico es fácilmente eliminable del medio de reacción sin tener que proceder a separaciones complicadas. La reacción que vamos a efectuar es la "clásica" hidrólisis de la sacarosa, el azúcar común, en sus dos componentes glucosa y fructosa.



EXPERIMENTAL

1. Preparación de una solución de alginato

Verter con una probeta 33 ml de tampón acetato 0,1M / pH 4,75 en un matraz de 100 mL y precalentar a 70 °C. Añadir poco a poco y con agitación 0,50 g de alginato de sodio a la solución caliente. La solución debe agitarse

unos minutos hasta que se disuelven todos los grumos y queda perfectamente homogénea. Enfriar la solución con agua hasta alcanzar la t^a ambiente.

2.- Preparación de la solución de sacarosa.

El profesor os suministrará una solución de sacarosa (azúcar común) al 20 % obtenida al añadir 2 g de azúcar (sacarosa) en un vaso pequeño que contiene 10 cm^3 de agua destilada.

3.- Inmovilización de la levadura en las esferas de alginato

Suspender 1,0 g de levadura de panadería en los 33 mL de solución de alginato al 1,5 % anteriormente preparada, agitar durante unos minutos hasta homogeneizar. Con una jeringa (con boquilla amarilla), coger porciones de 5 mL de la suspensión de levadura y añadirla gota a gota sobre un vaso de 200 ml que contiene 50 ml de una solución de CaCl_2 0,1 M. Dejar caer la gotas lo más cerca posible de la superficie de la solución de Ca^{2+} . Mantener las esferas en el interior de la solución de Ca^{2+} durante al menos 15 min para completar la gelificación de las esferas.

4.- Preparación de los bioreactores

Mientras tanto, disponer una jeringa de plástico de 10 ml con un tubo de silicona acoplado a su salida y una pinza de Hoffman para controlar el flujo de líquido. Colocar un filtro de papel en la parte inferior de la jeringa para evitar que las esferas taponen la salida

Añadir cuidadosamente con una espátula las esferas de alginato a la jeringa, de forma que contenga 5 mL de esferas. Lavar el contenido de la jeringa para eliminar el exceso de Ca^{2+} pasando pequeños volúmenes de tampón acetato. Finalmente, lavar y enrasar con agua destilada hasta aproximadamente a 5 mL.

Para apreciar la diferencia entre las células libres y las inmovilizadas, se observarán en un microscopio óptico una gota de una suspensión de levaduras en el tampón, y a continuación, una perla ligeramente aplastada. Se puede verificar las limitaciones de movimiento en la células inmovilizadas.

5.- Hidrólisis de la sacarosa en el bioreactor.

Con la jeringa sujeta con una pinza, verter cuidadosamente 0,3 mL de solución de sacarosa al 20 % y rotar manualmente para homogeneizar su contenido. Comenzar a contar el tiempo de contacto entre esferas y solución de carbohidrato que será de 20 min, rotar la jeringa 2 minutos.

Finalizado el tiempo previsto, abrir la llave de la jeringa y recoger todo el líquido en un tubo de ensayo. Homogeneizar el contenido del tubo.

6.- Hidrólisis química de la sacarosa.

En un tubo de ensayo vierta 2 ml de solución de sacarosa al 2% y pida al profesor que agregue 3 gotas de HCl (ácido clorhídrico). Caliente 5-10 minutos en un baño de agua a 70°C , y luego enfríe en el grifo. Neutralice la solución con pequeñas porciones de Na_2CO_3 (atención al desprendimiento de burbujas) y controle con papel indicador.

7.- Detección de glucosa en las soluciones de hidrólisis.

En una gradilla prepare tres tubos de ensayo y rotúlelos A, B y C. En el tubo A coloque la solución recogida del bioreactor. En el tubo B vierta 0,3 mL de la solución de sacarosa original sin hidrolizar; y en el C añada 0,3 mL de la solución de hidrólisis química neutralizada. Diluya con agua destilada los tubos B y C hasta obtener el mismo volumen que en el A.

En cada uno de los tubos vierta 0,2 ml de reactivo de Fehling A y 0,2 ml de reactivo de Fehling B. Caliente a 70°C , agite ligeramente e, interprete los resultados obtenidos.