

Inmovilización de *Saccharomyces bayanus* en alginato y quitosana

MARÍA ESTELA AYALA GALDÓS

Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Carretera a Ventanilla Km 5.200. Callao 1
Apartado Postal 0360

Palabras Clave : Gelificación , glicólisis, inmovilización, matrices, quitosana.

RESUMEN

Se presenta un breve estudio sobre inmovilización de *Saccharomyces bayanus* en matrices de alginato y quitosana para la obtención de etanol. Siendo la quitosana una matriz adecuada para la inmovilización de células microbianas, animales y vegetales se investigó su posible uso en la fermentación de glucosa utilizando levaduras. Los resultados sugieren un posible efecto inhibitorio de la quitosana como matriz para fermentación de glucosa.

ABSTRACT

A brief survey on immobilization of *Saccharomyces bayanus* in alginate and chitosan matrixes to obtain alcohol is presented. Since chitosan is an adequate matrix to immobilize microbial, animal and vegetal cells, it was evaluated to immobilize yeasts in order to ferment glucose. The results are in agreement with the possible inhibitory effect of chitosan on the fermentation of glucose by yeasts.

INTRODUCCION

Células inmovilizadas son aquellas células confinadas en forma física en un determinado espacio, dentro del cual retienen su actividad catalítica y en algunos casos, su viabilidad (2,19).

En general, las técnicas de inmovilización tienen como principal objetivo el incremento de la productividad y la máxima utilización del sustrato (7).

Frente a la inmovilización de enzimas, el proceso de inmovilizar células (ver Fig.1) ofrece ventajas tales como el no requerir separación ni purificación, además de una mayor estabilidad de la enzima celular especialmente

en el caso de enzimas intracelulares y microorganismos que no contengan enzimas interferentes, previene la inactivación interfacial, excreta metabolitos secundarios y permite la regeneración del cofactor. En algunos casos, el uso de células inmovilizadas evita la inestabilidad enzimática permitiendo que la enzima se mantenga en su estado nativo.

En general, aún cuando la preparación y utilización de células inmovilizadas es más sencilla que inmovilizar enzimas, existen algunos factores limitantes tales como el hecho de que las células contienen otras enzimas que catalizan reacciones adicionales, la porosidad de las matrices y su interacción con el medio, que incluye el posible daño de la célula por el

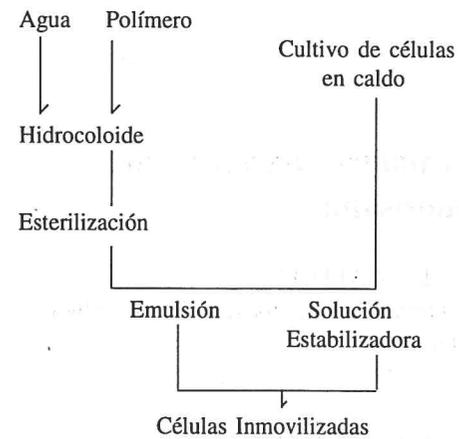


Figura 1. Esquema del Proceso para Inmovilización de Células en un Gel.

producto, así como algunos agentes bloqueadores, aún en estudio, que inciden en el ingreso del sustrato a las matrices de inmovilización (6).

Para trabajos de fermentación de glucosa mediante inmovilización, la producción de etanol es más dependiente de la composición del medio que de la tolerancia intrínseca de las cepas industriales. Otro factor importante es la presencia de cofactores tales como el Ca o el Mg, cuya deficiencia influye notablemente en la integridad de las membranas celulares y la prolongación de la fase exponencial (12). Dombek e Ingram sugieren el efecto de algunos nutrientes complejos que podrían suplir tal deficiencia (5).

Entre los numerosos trabajos sobre inmovilización es muy frecuente el uso de polisacáridos, en especial de alginatos que presentan una gran capacidad de gelificación y se utilizan en forma de membranas o perlas, y sobre los cuales se ha descrito las bondades de su uso así como algunas limitaciones (10,12,16).

En lo referente a la formación de geles firmes, es muy importante resaltar que el mecanismo de gelificación del alginato y de la quitosana presentan un patrón similar al de la quitosana (10,17). La quitosana es un polisacárido de gran interés y el más abundante

en la naturaleza después de la celulosa, siendo una de sus principales fuentes de obtención las caparzones de organismos marinos.

Existen referencias sobre la formación de perlas de quitosana mediante gelificación para inmovilizar *E. coli* en la síntesis de triptofano (17). Se viene desarrollando una gran área de investigación en base a la adaptabilidad de las membranas y perlas de quitosana y su permeabilidad para inmovilizar diversos tipos de células. Así, han resultado exitosos algunos estudios sobre inmovilización de células animales y vegetales en quitosana. (10,11,14,20)

En el trabajo que se presenta, se realiza un estudio de inmovilización de *Saccharomyces bayanus* utilizando perlas de alginato y perlas de quitosana a fin de evaluar la adaptabilidad de este último como soporte de células para la obtención de etanol a partir de glucosa, transformación debida a reacciones enzimáticas múltiples acompañadas por sistemas de regeneración de ATP y NADH utilizando la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas.

MATERIALES Y METODOS

La preparación de materiales así como la realización de los ensayos tuvo lugar en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Reading, Inglaterra.

Microorganismo: Para el presente estudio se utilizó una cepa de *Saccharomyces bayanus* (FSBC 54) del Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Reading, Inglaterra, cepa actualmente conocida como *Saccharomyces cerevisiae* [30]. Esta es una cepa comercial muy utilizada para la elaboración de vinos espumantes y que para efectos del presente estudio se mantuvo en precultivo en caldo glucosado a 37 °C y se repicó 12 horas antes de su inoculación en el medio de cultivo.

Sustrato de Fermentación: Se utilizó un medio glucosado en concentración del 10%. La

formulación del medio consistió de 1% de extracto de levadura, 0.1% de sulfato de amonio, 0.05% de sulfato de magnesio y 0.1% de difosfato de potasio, el pH del medio se ajustó en 6.7 ± 0.3 utilizando hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

Soluciones para Inmovilización: Se preparó 1000 ml de una solución de alginato de sodio (Sigma Type V sodium salt) al 3% y 1000 ml de solución de quitosana (750 cp, 86%, Protan Lab) al 1% disuelta en ácido acético 1.5%, a estas soluciones se les denominó en adelante hidrocoloideos.

Soluciones Estabilizadoras. Para cada hidrocoloide fueron necesarias soluciones estabilizadoras: 2000 ml de Cloruro de sodio 0.2 M y 2000 ml de tripolifosfato de sodio 2% (para alginato y quitosana respectivamente).

Las soluciones para inmovilización y estabilizadoras fueron esterilizadas a 121°C por 15 minutos.

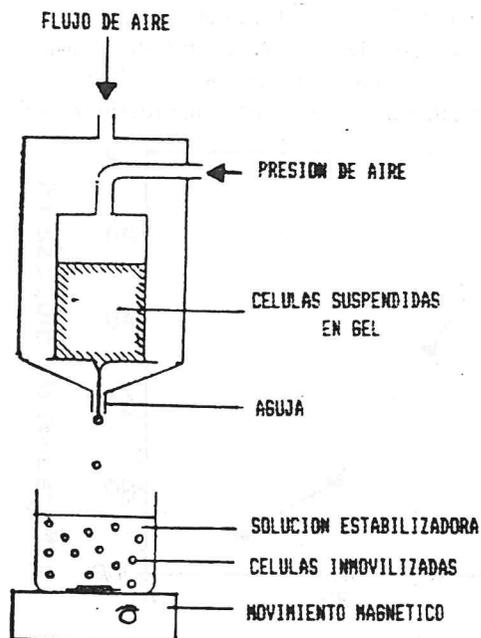


Figura 2. Preparación de Células inmovilizadas utilizando aire a presión.

Preparación de las Perlas. Se preparó una mezcla de cada hidrocoloide con una cantidad previamente calculada de cultivo, tal como se refiere en la sección de Métodos Analíticos. Estas mezclas fueron denominadas emulsiones. La formación de las perlas se realizó bombeando cada emulsión en su respectiva solución estabilizadora, utilizando para el efecto una bomba peristáltica de vacío. Para ambos casos las emulsiones se dejaron caer a una velocidad de 50 - 60 gotas por minuto. Así se obtuvo perlas de alginato y quitosana de 3 a 4 mm de diámetro, que se dejaron en reposo durante tres horas dentro de su respectiva solución estabilizadora (Fig. 2).

Las perlas obtenidas tuvieron una densidad de 1.02 g/ml (alginato) y 1.14 g/ml (quitosana).

Métodos analíticos

Cálculo de la concentración de biomasa.

Se realizó primero el cálculo del número de células en el cultivo inicial a fin de determinar la cantidad a agregar en las soluciones de alginato y quitosana.

La preparación de la emulsión se realizó de la siguiente manera: el primer cálculo del número de células se efectuó en el caldo de cultivo inicial, cuyo contenido era 4.8×10^9 células/ml, de éste se tomó un volumen de 21 ml que fue mezclado con cada una de las soluciones de alginato y quitosana. La concentración final en cada emulsión fue de 1.1×10^6 células/ml de emulsión de alginato y 1.2×10^6 células/ml de emulsión de quitosana.

La fermentación se llevó a cabo agregando 5.1 g de perlas de alginato y 5.7 g de perlas de quitosana en matraces conteniendo 500 ml del sustrato de fermentación respectivamente. Estas cantidades fueron equivalentes a una biomasa de 1×10^6 células/ml. Para el tratamiento testigo o de Células Libres (CL) se agregó 0.10 ml del cultivo inicial en 500 ml de caldo glucosado al 10%, con lo cual la concentración final para este tratamiento fue de 1×10^6 células por ml de caldo.

El cálculo para determinar la biomasa fue realizado en base a correlaciones de peso, densidad óptica (D.O.) y número de células.

Para determinar el peso de la biomasa, se filtró 10 ml de cultivo utilizando un filtro Gelman Sciences 47 mm, 0.45 μ m, sometido a secado hasta peso constante. El peso de la biomasa fue obtenido por diferencia. La medición de la densidad óptica (D.O.) se realizó en un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 20, a 610 nm (8). El conteo del número de células fue realizado utilizando un hemocitómetro modificado de Neubauer (3) y los datos fueron expresados en ciclos logarítmicos.

Medición de sustrato y producto. Las concentraciones del sustrato glucosa y del producto etanol fueron determinadas utilizando los procedimientos Sigma N° 510 con lecturas en el espectrofotómetro a 430 nm para Glucosa y a 340 nm para Etanol (8).

Fermentación. Se consideró los siguientes tratamientos:

- A: células inmovilizadas en perlas de alginato
- Q: células inmovilizadas en perlas de quitosana

CL: células libres

Todas las muestras fueron incubadas a 37°C con agitación orbital a 2000 rpm.

RESULTADOS

Utilización del Sustrato. De las pruebas realizadas se puede apreciar en la Fig. 3 las diferencias en el uso del sustrato por el microorganismo *S. bayanus* inmovilizado mediante los tratamientos en estudio.

Las diferencias mencionadas se observaron a partir de las 5 horas de cultivo, las células libres (CL) y las inmovilizadas en alginato (A) utilizaron el 19 y 29.4% de glucosa respectivamente, en tanto que el valor de utilización de glucosa para las células inmovilizadas en quitosana (Q) fue de sólo 3.4%.

A las 10 horas el consumo de glucosa por los tratamientos CL y A (55 y 61.4%) superaban en 6 y 7 veces el correspondiente al tratamiento Q, siendo esta tendencia continua hasta las 20 horas, al cabo de las cuales los tratamientos CL y A disminuyeron sus valores debido posiblemente al agotamiento de sustrato.

En cambio, el tratamiento Q, a las 20 horas, presentó un valor de 16% que recién a las 25

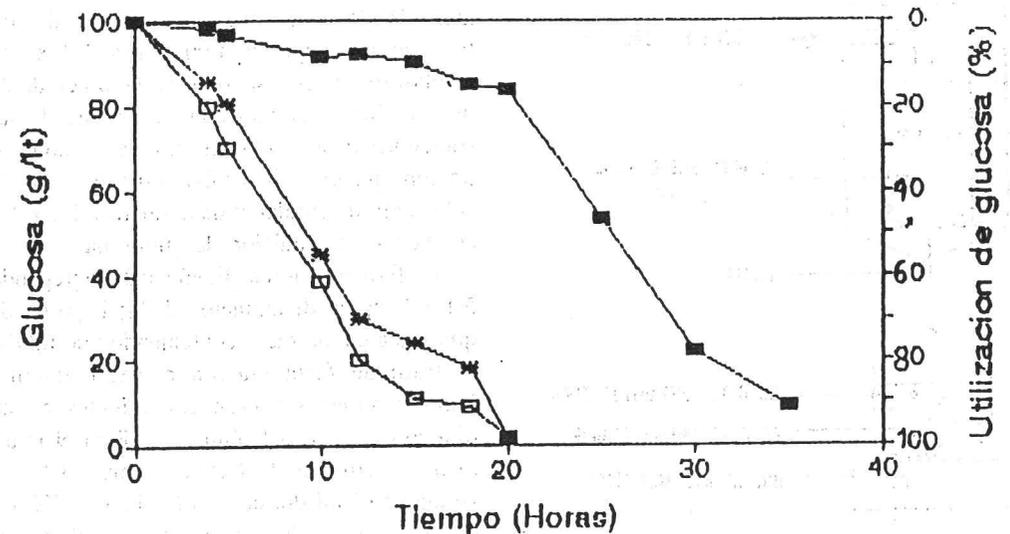


Figura 3. Utilización de Glucosa por *S. bayanus*. Inmovilizado en: —*— Células libres, —■— Quitosana y —□— Alginato

horas se incrementó a 46.7%. Los mayores valores: 78.4 y 91% ocurrieron al transcurrir las 30 y 35 horas respectivamente.

Producción de Etanol. Los resultados observados en la Figura 4, muestran una relación inversamente proporcional al comportamiento de utilización de sustrato anteriormente descrito en la Fig. 3, lo cual es concordante y típico del curso de la transformación de sustrato en producto.

Desde las 5 horas se produjo un incremento en la producción de etanol mediante el tratamiento A (9.7 g/lit) que es mayor a la observada en los tratamientos CL (4.5 g/lit) y Q (2.3 g/lit). La mayor producción de etanol en CL se observa entre las 18 y 20 horas con 41 g/lit (4.1%), en tanto que para el tratamiento A se produce entre las 15 y 18 horas alcanzando 44 g/lit (4.4%). Esto parecería indicar una ligera ventaja en el uso del alginato.

El tratamiento Q arrojó 34.4 g/lit (3.44%) como valor máximo de conversión de sustrato

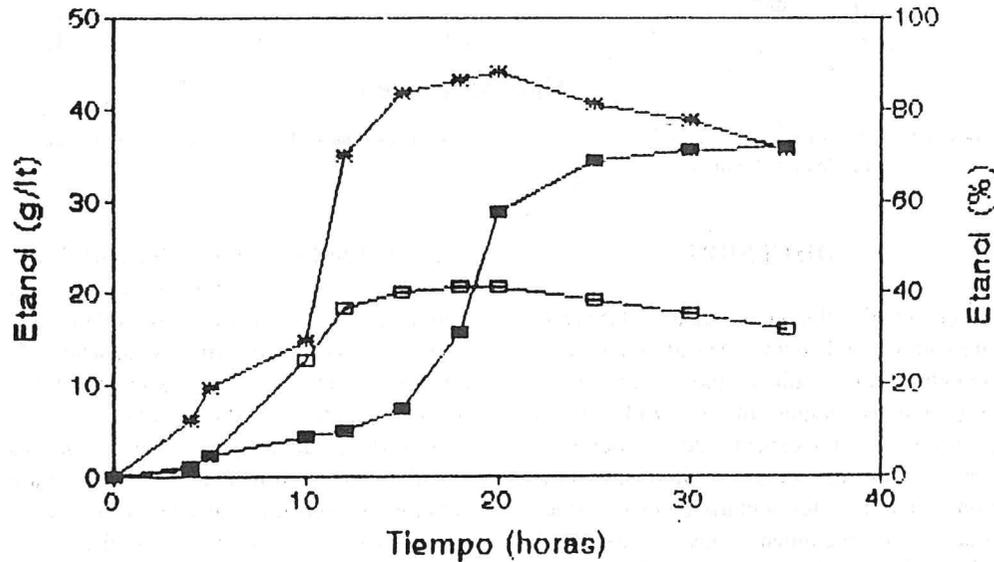


Figura 4. Producción de Etanol por *S.bayanus* Inmovilizado en: —□— Células libres, —■— Quitosana, —*— Alginato

en producto, valor que es notoriamente menor a los obtenidos por CL y A, además de que, como valor máximo se presentó bastante posterior: a los 35 días.

Crecimiento Celular. En la figura 5 se observa el crecimiento de *S. bayanus* en el sustrato bajo las condiciones en estudio.

La curva de crecimiento correspondiente a CL muestra el comportamiento típico del crecimiento microbiano. Entre las 10 y 20 horas se observa el desarrollo de la fase exponencial, de 7.8×10^6 a 8×10^9 células/ml.

A su vez, la curva de crecimiento para el tratamiento A presentó valores casi constantes, desde 2.1×10^0 células/ml a las 4 horas, 1.4×10^1 células/ml a las 20 horas e inclusive hasta los 35 días con sólo 8.5×10^1 células/ml.

Para el caso del tratamiento Q, la curva de crecimiento presentó la misma tendencia que la correspondiente al tratamiento CL, también entre las 10 y 20 horas se produjeron incrementos de 1.2×10^1 células/ml inicial a 5.9×10^5 células/ml, aunque el valor máximo fue de 7.8×10^6 células/ml a las 25 horas.

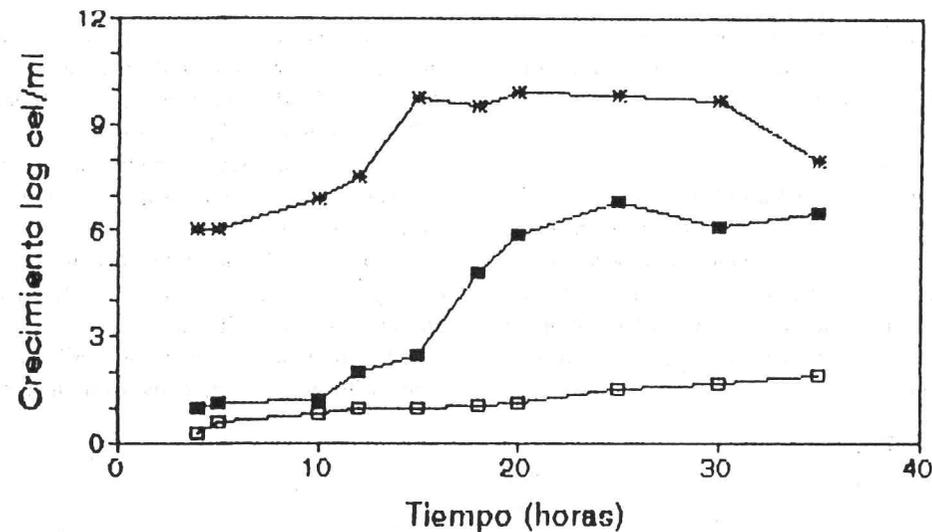


Figura 5. Crecimiento de *S. bayanus* —*— Células libres, —■— Inmovilizadas en Quitosana, —□— Inmovilizadas en Alginato.

DISCUSION

El número de células confinadas en las perlas de alginato y la utilización de sustrato para este tratamiento parece indicar que las células se encontraban realmente inmovilizadas y no migraron fuera del espacio dentro del cual estaban confinadas, además de lo cual mantuvieron su actividad fermentativa y una productividad (4.4%) ligeramente mayor a la correspondiente de las células libres (4.1%).

En relación a la diferencia entre los valores de utilización de sustrato y la elaboración de producto mediante los tratamientos CL y A, ésta parece coincidir con lo explicado por muchos autores sobre la interacción del etanol con el interior de las membranas celulares en sistemas de células libres (inhibición por producto) (5,12,18), lo cual en el caso de la inmovilización con alginato tuvo un menor efecto. Existen evidencias sobre la presencia de etanol y la reducción de la actividad de las enzimas glicolíticas, así como la acumulación intracelular de AMP que a su vez inhibe las hexoquinasas.

En el caso del tratamiento Q, hasta las 10 horas no se observó mayor variación en el valor

inicial de 1.6×10^1 . Sin embargo, a partir de las 12 horas y hasta las 20 horas, el crecimiento celular se incrementó considerablemente de 1×10^2 a 7×10^5 células/ml de sustrato. Este comportamiento continuó hasta las 30 y 35 horas, llegando a 3.1×10^6 células/ml.

Resulta evidente que las curvas de crecimiento celular y utilización de sustrato para el tratamiento con quitosana, no se asemejan al modelo característico de inmovilización que presenta el tratamiento con alginato, y más bien sugieren la migración o liberación de células hacia el sustrato, lo cual iniciaría el proceso de fermentación bastante retrasado y de menor índice de productividad en comparación a los obtenidos mediante células libres e inmovilizadas en alginato.

Se conoce algunos casos de inmovilización en los cuales la porosidad de la matriz facilita la liberación de las células en el medio, algo similar al comportamiento de los geles de carragenina, lo cual es una característica positiva en el caso de algunos productos lácteos (1); sin embargo, para el caso de matrices de quitosana, no se ha reportado liberación de células siendo su uso exitoso para inmovilizar *E. coli* (17) así como células animales y vege-

tales (11,20). Por lo tanto, no sería adecuado considerar en este caso, la porosidad de la matriz de quitosana como causa del crecimiento celular en el sustrato

Existen reportes que sugieren la atracción electrostática entre las cargas negativas de las paredes celulares en las levaduras y la naturaleza catiónica de la quitosana, especialmente en condiciones de elevada acidez, lo cual inhibiría el ingreso de glucosa a la célula y su subsiguiente utilización y transformación (13).

En condiciones menos acídicas se produce agregación y dispersión de las células (17). Tomando en cuenta que el medio de cultivo y el tripolifosfato de sodio podrían haber ejercido un efecto de neutralización y consecuente baja de la acidez de las matrices de quitosana se explicaría la obligada dispersión de las células hacia el sustrato, considerando además que la falta de sustrato habría coadyuvado a dicha migración o liberación.

En relación a los valores de producción de etanol reportados por la literatura éstos son, utilizando células libres de *Saccharomyces bayanus* IST 154 4.0% (peso/vol) a partir de un medio de glucosa 32% a 30°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizado en alginato se obtuvo 4.6% (peso/vol) (4) y en algunos casos óptimos 4.8% de un medio con 10% de glucosa (5).

Comparando lo anterior con los resultados obtenidos, los valores de 4.1% (peso/vol) para células libres y 4.4% (peso/vol) en inmovilización con alginato resultan eficientes. En el caso de la inmovilización con quitosana, estos valores no corresponden a células inmovilizadas sino mas bien a células ocluidas y limitadas en su acceso de glucosa, "liberadas" para su busca de sustrato y consiguiente elaboración de producto, lo cual excluye cualquier comparación.

CONCLUSIONES

1. Para las condiciones del presente estudio, las células de *Saccharomyces bayanus*

libres e inmovilizadas en Alginato presentaron tiempos similares de fermentación del sustrato, alrededor de las 10 horas.

2. Debido a su mayor productividad las células inmovilizadas en Alginato mostraron mayor eficiencia en la utilización del sustrato. Los porcentajes de productividad de etanol fueron de 4.1% en células libres y 4.4% en células inmovilizadas en Alginato.

4. Las células inmovilizadas en Quitosana desarrollaron una actividad fermentativa lenta, conclusión que concuerda con las observaciones de Raltson (13) sobre inhibición de la fermentación de algunas cepas de levaduras en matrices de quitosana.

RECOMENDACIONES

Considerando que la quitosana es un polímero de gran interés industrial, y habiéndose desarrollado con ésta algunas técnicas de inmovilización de microorganismos, se ha encontrado que no existirían mayores ventajas en su uso como matriz de inmovilización de levaduras. Sin embargo, en base a los antecedentes de su uso con bacterias resulta de gran interés el continuar investigaciones de inmovilización utilizando otros microorganismos, especialmente del ambiente marino, por ser éstos una gran fuente de importantes sistemas enzimáticos.

REFERENCIAS

1. Audet P., Paquin C. y Lacroix C. (1989). Sugar Utilization and Acid Production by Free and Entrapped Cells of *Streptococcus salivarius*, L.delbrueckii, in Whey Permeate Medium. Applied and Env. Microbiol. vol 55, 185-189.
2. Butterworth & Co. (1983). Guidelines for the Characterization of Immobilized Biocatalysts. Enzyme Microb. Technol. 1983, Vol 5, July, 304-307.
3. British Standard Specification (1982). Haemocytometer and Particle Counting Chambers. BSS. 748: 1982.
4. Dombek K. e Ingram L. (1987). Ethanol Production during Batch Fermentation with *S. cerevisiae*: Changes in Glycolytic Enzymes and Internal pH. Applied and Env. Microbiology, June, 1987, vol 53, 1286-1291.

5. **Dombek K. e Ingram L.** (1988). Intracellular Accumulation of AMP as a Cause for the Decline in Rate of Ethanol Production by *S. cerevisiae* During Batch Fermentation. Applied and Env. Microbiology, Jan, 1988, vol 54, 98-104.
6. **Godia F., Casas C. y Sola C.** (1987). A Survey of Continuous Ethanol Fermentation Systems Using Immobilized Cells. Process Biochem. April 1987, 43-48.
7. **Grootjen D., Meijlink H, van der Lans R y Luyben K.** (1990). Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Tech. vol 12, November, 860-864.6.
8. **Hong K., Tanner R., Malaney G. y Wilson D.** (1987). A Spectrophotometric Method for Estimating the Yeast Cell Concentration in a Semi-solid state fermentation. Process Biochem. October, 1987, 149-153.
9. **Knorr D.** (1988). Utilization of Chitinous Polymers in Food Processing and Biomass Recovery. Dep. of Food Science and Human Nutrition. En: Biotechnology of Marine Polysaccharide. 1988. Hemisphere Publishing Corporation. 314-332.
10. **Knorr D., Miazga S and Teutonico R.** (1985) Immobilization and Permeabilization of Cultured Plant Cells. Food Tech. October, 135-142.
11. **Knorr D. y Berlin J.** (1987). Effects of Immobilization and Permeabilization Procedures on Growth of *Chenopodium rubrum* Cells and Amaranthin Concentration. Journal of Food Sc., Vol 52, N°5, 1397-1400.
12. **Nabais R., Sa-Correia I., Viegas C. y Novais J.** (1988). Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *S. bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. (1988). Applied and Env. Microbiology, Oct. 1988, vol 54, N°10, 2439-2446.
13. **Ralston G., Tracey M. y Wrench P.** (1964). The Inhibition of Fermentation in Baker's Yeast by Chitosan. Biochem. Biophys. Acta 93, 652.
14. **Rha C, Rodriguez-Sanchez D y Kienzle Sterzer C.** (1988). Novel Applications of Chitosan. En: Biotechnology of Marine Polysaccharide. Hemisphere Publishing Corporation.
15. **Salgueiro S., Sa-Correia I. y Novais J.** (1988). Ethanol-Induced Leakage in *S. cerevisiae*. Applied and Env. Microbiol. April, 1988, vol 54, N°4, 903-909.
16. **Smidsrod O. y Skjak-Braek G.** (1990) Alginate as Immobilization Matrix for Cells. Tibtech-March 1990, vol. 8, 71-77.
17. **Vorlop K. y Klein J.** (1981) Formation of Spherical Chitosan Biocatalysts by Ionotropic Gelation. Biot.Lett. Vol.3, N°1, 9-14
18. **Walker C. H., Casey W. y Parks L.** (1990). *Saccharomyces cerevisiae* Membrane Sterol Modifications in Response to Growth in the Presence of Ethanol. Applied and Env. Microbiology, Sept, 1990, vol 56, N°9, 2853-2857.
19. **Woodward J.** (1988). Methods for Immobilization of Microbial Cells. Journal of Microb. Methods. 8, (1988), 91-102.
20. **Yoshioka T., Hirano R, Shioya T. y Kako M.** (1990) Encapsulation of Mammalian Cell with Chitosan-CMC Capsule. Biotech. and Bioeng., vol 35, 66-72.