

## **TRABAJO PRACTICO**

### **BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS**

#### **Introducción**

El uso de biocatalizadores para llevar a cabo biotransformaciones es un área de la Biotecnología en continua expansión. Un aspecto clave del proceso es el uso del catalizador (célula o enzima) en un sistema continuo que permite extender el uso del mismo en el tiempo dando como resultado una disminución de los costos del proceso y otras ventajas como una mayor pureza del producto, mayor productividad etc. También se puede pensar en la reutilización del biocatalizador en procesos batch. Para lograr este objetivo los biocatalizadores se inmovilizan. La definición de la European Federation of Biotechnology (1983) aclara el concepto. "Los biocatalizadores inmovilizados son enzimas, células u organelos (o combinación de ellos) confinados o localizados en cierta región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica y, si es necesario, de su viabilidad, y que pueden ser usados de modo repetido y continuo. Es necesario analizar tres de los conceptos incluidos en la definición:

"Confinados o localizados": para cumplir con esta condición es necesario formar una fase sólida dispersa, macroscópica, de alta densidad y catalíticamente activa, dentro de, o en contacto con, un medio reactivo líquido libre de biocatalizador. Se dice que el biocatalizador está compartimentalizado. Las características de la fase sólida son tales que el transporte de reactivos hacia y desde el biocatalizador está gobernado por difusión exclusivamente. Por la resistencia al transporte difusional se establecen en la partícula gradientes de concentración o de pH, con lo que el ambiente que rodea a la partícula de biocatalizador inmovilizado difiere grandemente del seno de la fase líquida.

"retención de la actividad catalítica (y viabilidad)": los tratamientos a los que son sometidas tanto las células como las enzimas libres que serán inmovilizadas afectan en cierto grado la actividad. Si bien es deseable, no es necesario que se retenga el 100% de la actividad del biocatalizador libre, pero, para mantener la rentabilidad del proceso, debe alcanzarse un valor que no debe ser menor al 25%. En el caso de células puede ser necesario mantener la viabilidad. La inmovilización, entonces, debe tratar de ser realizada en condiciones tales que la pérdida de actividad sea reducida.

"uso repetido y continuo": surge inmediatamente que la gran ventaja del uso de biocatalizadores inmovilizados se relaciona con la fácil separación del catalizador del medio de reacción sin pérdida de actividad, y por consecuencia directa, con su reutilización. Las células o enzimas inmovilizadas pueden ser separadas fácilmente. Es necesario saber cómo afecta el método de inmovilización la estabilidad del biocatalizador, y por ende la extensión de su uso repetido.

Las células libres en suspensión presentan un rápido decaimiento en su actividad catalítica; sin embargo, las células inmovilizadas presentan una estabilidad mayor, y por lo tanto la inmovilización es un requisito necesario para poder reutilizar las células. El tiempo de vida media, en condiciones operacionales, varía normalmente entre 20 y 50 días.

Un caso particular, ampliamente usado, es aquel en el que se desea efectuar una reacción de una sola etapa donde la viabilidad celular no interesa. Mas aun esta se destruye deliberadamente mediante tratamientos físicos o químicos los que también estabilizan la estructura celular. En este caso las células no viables actúan como soporte de la actividad catalítica de interés.

**METODOS DE INMOVILIZACION:** Para obtener biocatalizadores inmovilizados que retengan actividad y sean estables es necesario aplicar un método de inmovilización adecuado, que dependerá del tipo de actividad catalítica de interés. Existen diversos métodos para inmovilizar células, los cuales pueden dividirse en:

- ENTRECruzamiento Físico (Floculación).
- ENTRECruzamiento Covalente.
- Adsorción sobre matrices insolubles
- Enlace covalente con matrices insolubles.
- Entrampamiento físico en materiales porosos.
- Encapsulamiento.

Según la ruta seguida para su preparación los sistemas pueden clasificarse en cuatro:

1.- **INMOVILIZACIÓN SIN CARRIER:** es el caso de células unidas con otras células, tanto por adsorción o por uniones covalentes. La floculación de células, durante su fermentación o por procesos secundarios mediante variación en parámetros fisicoquímicos (pH, fuerza iónica) es un proceso de unión por adsorción. Este proceso puede ayudarse por el agregado de pequeñas cantidades de agentes de floculación (polímeros). Es también común el uso de agentes químicos bifuncionales, tal como el glutaraldehído para unir células mediante entrecruzamiento químico.

El caso típico es la floculación de algunas cepas de *Zymomonas mobilis*, empleadas en la producción de etanol. El método de inmovilización es sencillo, pues espontáneamente se producen *flocs* cuando se crecen células en un medio adecuado sin agitación. Los *flocs* así formados se utilizan como inóculo de medios de cultivo frescos, y pueden ser usados en la producción de etanol a partir de glucosa en reactores especialmente diseñados. Las células inmovilizadas son retenidas dentro del reactor.

Este método permite alcanzar altas concentraciones celulares, y se lleva a cabo en condiciones de reacción suaves, que no perjudican la estabilidad del biocatalizador. Presenta algunas desventajas: se alcanza una baja resistencia mecánica frente a la agitación y a la compresión, hay limitaciones difusionales al transporte de nutrientes, y está limitado a pocas clases de microorganismos.

2.- **INMOVILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR EN CARRIERS PREFORMADOS:** es la estrategia típica en la inmovilización de enzimas, especialmente por medio de enlaces covalentes. La matriz puede generarse sin las limitaciones en condiciones físicas y químicas (temperatura, pH, etc.) impuestas por el biocatalizador, por lo que pueden mejorarse y optimizarse las características de estabilidad mecánica, la estructura porosa del material, la resistencia, etc. En el caso de células, el problema estriba en cómo favorecer la adhesión de las células (relativamente grandes) a las superficies de la matriz, manteniendo la estabilidad y la resistencia al lavado. La matriz debe presentar poros de mayor diámetro que la célula para permitir la penetración a las superficies internas. Se emplean *carriers* porosos, que son embebidos por inmersión en suspensiones celulares. En el caso de enzimas es necesario activar el soporte, mediante la generación de grupos reactivos capaces de reaccionar con los grupos amino o carboxilo libres presentes en la enzima.

3.- **INMOVILIZACIÓN DURANTE LA PREPARACIÓN DEL CARRIER:** Es la estrategia más común en la inmovilización de células enteras. Si bien hay dos métodos, entrampamiento y encapsulamiento, este último es de limitada importancia.

Debido al tamaño de las células enteras, es relativamente sencillo preparar redes de porosidad

tal que garanticen la completa retención de las células, y que los procesos de transporte de sustratos y productos sean suficientemente rápidos para obtener alta eficiencia en la actividad catalítica. La dificultad se encuentra en la búsqueda de condiciones de preparación de carriers que cumplan con los requerimientos exigidos para que se retenga la actividad del biocatalizador y/o la viabilidad celular. Es el método de inmovilización más usado, debido a su flexibilidad y simplicidad, y a las poco agresivas condiciones de reacción (en el caso de polímeros naturales).

4.- INMOVILIZACION POR CRECIMIENTO DE CELULAS PREVIAMENTE INMOVILIZADAS: En realidad es un caso particular del criterio anterior. Esta estrategia es utilizada para aumentar la concentración de células dentro del carrier, por lo que, evidentemente, sólo sirve para inmovilización de células. Permite inmovilizar células que contienen sistemas multienzimáticos, ya sea en estado estacionario o en condiciones de crecimiento. La desventaja es, al igual que en caso de células libres, la existencia de reacciones laterales no deseadas. Generalmente se realiza por entrapamiento en redes iónicas. Es posible restaurar la actividad catalítica, e inclusive aumentarla. Es un método útil para obtener células difíciles de inmovilizar como tales, como por ejemplo micelio celular. La técnica en este caso consiste en la inmovilización de esporos en matrices insolubles, los cuales originarán micelio una vez inmovilizados en la matriz.

#### TIPOS DE CARRIERS.

Desde el punto de vista químico, las sustancias usadas para soportar a los biocatalizadores pueden ser divididas en inorgánicas u orgánicas, y el origen de las mismas puede ser natural u obtenidas por síntesis.

#### INORGANICOS:

- Naturales: arena, silicatos, arcillas.
- Sintéticos: vidrios de porosidad controlada, cerámicas.

#### ORGANICOS:

- Naturales: virutas de madera, antracita, colágeno, celulosa, alginatos, carragenatos, albúmina.
- Sintéticos: PVC, polipropileno, poliacrilamida, resinas de intercambio iónico, epóxidos, poliuretanos.

La selección del material se realiza siguiendo algunos criterios heurísticos:

- materiales de alta disponibilidad y bajo costo
- materiales que permitan un proceso de inmovilización simple y efectivo respecto de la retención de la actividad.
- materiales con alta capacidad y eficiencia
- materiales que permitan un diseño de reactores sencillo.

Los dos primeros criterios apuntan al uso de materiales naturales y que permitan técnicas de inmovilización por adsorción. Los dos últimos criterios dirigen la elección hacia carriers orgánicos complejos. Obviamente la elección final deberá tener en cuenta el biocatalizador a utilizar, el proceso en el cual va a participar y, fundamentalmente, el producto que se desea obtener.

De todos los métodos mencionados se hará especial énfasis en aquellos que involucran la formación de redes poliméricas a partir de prepolímeros de cadena larga, tales como alginatos y kappa-carragenatos (K-carragenatos). La variedad de sistemas de este tipo es tan grande

que pueden subdividirse según los mecanismos de formación de las redes poliméricas:

1. Precipitación: formación de red sin reacción química, por separación de fases.
2. Gelificación: formación de redes sin reacción química, por transición de fase debida a cambios de pH, temperatura, etc.
3. Gelificación ionotrópica: formación de redes con reacción química (intercambio de iones) debido al entrecruzamiento de cadenas poliónicas con contraiones multivalentes.
4. Entrecruzamiento covalente: formación de redes con reacción química debida al entrecruzamiento de polímeros multifuncionales entre sí o con reactivos bifuncionales de bajo peso molecular.

En el trabajo práctico se estudiará la inmovilización de células de levadura con actividad invertasa en geles de alginato de  $\text{Ca}^{+2}$ , con el fin de emplearlas en la hidrólisis de sacarosa. Por lo tanto, se describirán brevemente los mecanismos de entrapamiento por gelificación y por gelificación ionotrópica.

**GELIFICACION:** La gelificación por transición de fase suele ser promovida por cambios en temperatura o en pH. Los agentes gelificantes usados tradicionalmente son gelatina y agar, los cuales promueven una fácil gelificación pero presentan la desventaja de originar geles blandos y mecánicamente inestables. Una mejora significativa constituye la introducción de K-carragenato, heteroopolisacárico con  $\alpha$ -D-galactosa sulfato y 3,6-anhidro  $\alpha$ -D-galactosa, soluble en agua a temperaturas entre 40 y 60 °C y que gelifica a temperatura ambiente. Este material permite la formación de bolillas, bloques y membranas que pueden ser usados como soporte de biocatalizadores.

Hay dos áreas donde se aplica el K-carragenato:

- Conversiones catalizadas por sistemas monoenzimáticos, donde pueden usarse células muertas. La matriz es post-tratada con glutaraldehído o hexametildiamina, reactivos que estabilizan la actividad catalítica.
- Inmovilización de células vivas, donde hay crecimiento de células en la matriz.

**GELIFICACION IONOTROPICA:** El sistema más común es el entrecruzamiento de alginatos con iones  $\text{Ca}^{+2}$ . Los alginatos son polímeros de ácido manurónico y gulurónico, solubles en agua a temperatura ambiente como alginatos de  $\text{Na}^+$  y que gelifican en presencia de ciertos iones polivalentes. En general una solución de alginato de  $\text{Na}^+$  se deja gotear en una solución de  $\text{CaCl}_2$  obteniéndose en tiempos cortos, bolillas esféricas de tamaño controlado y homogéneo. Es un método que presenta gran flexibilidad, pues alginatos de distinto peso molecular y distinta composición química (distintas proporciones de ácidos gulurónico y manurónico) rinden geles de muy buenas características químicas y físicas. El requerimiento de  $\text{Ca}^{+2}$  depende de la composición química del gel. La concentración de  $\text{CaCl}_2$  en la mezcla de gelificación puede variar entre 0,05 y 2 %. El rango de temperaturas de operación va desde 0 hasta 80 °C. Las bolillas que se obtienen presentan diámetros entre 0,1 y 5 mm. y pueden presentar una alta carga celular por entrapamiento directo (hasta 30 g de células húmedas por ml de catalizador). Este sistema puede someterse a un secado parcial, con lo que el tamaño disminuye y aumenta la estabilidad mecánica sin variación en la porosidad. La desventaja que presenta es la inestabilidad frente a ciertos agentes capaces de secuestrar iones  $\text{Ca}^{+2}$  (p. ej.: fosfatos).

Los puntos destacables de este método son:

- Reversibilidad de la gelificación: obliga a tomar precauciones en cuanto a la

composición del medio a utilizar, principalmente pH y presencia de agentes que puedan secuestrar a los contraiones por precipitación o por formación de complejos.

- Buena estabilidad mecánica respecto al empaquetado en columna y a la agitación.  
e Formación de bolillas regulares, y con tamaño controlado.
  - e Formación de redes macroporosas, que se conserva aún después del secado parcial.
  - Alta capacidad de carga sin pérdida de estabilidad mecánica, pero con pérdida de eficiencia debido a resistencias difusionales.
  - Rendimientos de actividad catalítica de entre 80 y 100% en condiciones de reacción controladas.
- e Método suave, que permite que las células mantengan viabilidad y estabilidad.

## TRABAJO EXPERIMENTAL

Se estudiará la hidrólisis de sacarosa mediante células de levadura común de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) con actividad de invertasa ( $\alpha$ -n-fructosidasa) inmovilizadas en geles de alginato de  $\text{Ca}^{+2}$ .

## FUNDAMENTO

La invertasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en D-fructosa y D-glucosa. En la levadura común, dicha enzima se encuentra como un complejo fosfomanano proteína localizada en el espacio periplasmático y su función hidrolizar la sacarosa proveniente del medio ya que no está descrita la existencia de transportadores específicos para sacarosa en la membrana plasmática. Se utiliza ampliamente en industria de edulcorantes y confitería. La hidrólisis parcial o total de la sacarosa presenta las siguientes ventajas: mayor higroscopicidad, menor actividad acuosa y mayor poder edulcorante (de 1 a 1.1) ya que la mezcla fructosa-glucosa obtenida es sustancialmente más dulce en comparación a la sacarosa original (Tabla 1). Estas propiedades del hidrolizado se aprovechan en confitería para la preparación de fondants, gomas y bombones y en general en confituras húmedas. En ciertos casos la enzima se agrega junto a la sacarosa para proveer centros líquidos en bombones caramelos etc. Industrialmente el azúcar invertido se puede emplear para la producción de sorbitol y manitol.

Edulcorante	Valor edulcorante relativo
Glucosa	70-75
Dextrosa	90
Sacarosa	100
Fructosa	140-175
Azúcar invertido	100-130
Maltosa	30
Lactosa	15
Aspartame	18.000
Ciclamatos	30.000
Sacarina	30.000-50.000

Tabla 1: Valores relativos como edulcorantes de diferentes glúcidos (equivalente a una solución acuosa al 10 % de sacarosa).

Una alternativa es la inmovilización de la enzima purificada en soportes tales como los mencionados en esta guía. Sin embargo, esta estrategia trae aparejada la necesidad de purificar la enzima.

Otra posibilidad es el empleo de células enteras no viables como catalizador. Este método hace innecesario los pasos de separación y purificación, y es el que será empleado en el Trabajo Práctico.

Las células son luego inmovilizadas en una matriz polimérica (alginato de  $\text{Ca}^{+2}$ ). Esto se logra resuspendiendo las células en una solución de alginato de  $\text{Na}^+$ , alcanzándose la gelificación mediante el reemplazo de los iones  $\text{Na}^+$  por iones  $\text{Ca}^{+2}$ . Las bolillas así formadas se emplean para hidrolizar una solución de sacarosa. Para ello se prepara un dispositivo en el cual las bolillas son retenidas en una columna a través de la cual se hace circular la solución de sacarosa.

La conversión alcanzada (que es una medida del grado de hidrólisis) se determina midiendo la concentración de glucosa a la salida del reactor. Ajustando los parámetros de operación (caudal, carga celular, diámetro de bolilla) se puede regular la conversión del sistema.

**PROTOCOLO:** 10 g de levadura comercial de panificación se resuspenden en 90 ml de agua destilada. Por otro lado se prepara 100 ml de una solución de alginato de  $\text{Na}^+$  al 3.0 % en solución fisiológica de NaCl (0,9 %). El alginato no se disuelve fácilmente en agua fría. Conviene para ello ir adicionando el polímero lentamente a la solución fisiológica caliente con agitación intensa (las soluciones de alginato son muy viscosas). Alternativamente se puede agregar una pequeña cantidad de líquido a temperatura ambiente hasta formar una pasta con el polímero, dejar humectar 20-30 min y luego adicionar la solución fisiológica.

Concluida la solubilización del polímero se mezcla la suspensión de levaduras y la solución de alginato. Para formar las bolillas, la mezcla se deja gotear (con ayuda de una bomba peristáltica y una aguja) sobre 200 ml de una solución gelificante de  $\text{CaCl}_2$  (2%). Concluida la operación se adiciona a la solución con bolillas 10 ml de glutaraldehído al 25 % y se incuba 20 min a temperatura ambiente. Las botillas se filtran y lavan con abundante agua destilada.

Las bolillas se colocan en una columna con camisa, que se mantiene a 37 °C, y se hace circular una solución de sacarosa al 10 % ajustada el pH a 5.0 con ácido acético y conteniendo 0.1 % de cloruro de calcio. El efluente de la columna es recogido periódicamente y en él se realiza la determinación de glucosa mediante un método enzimático.

Se estudiará el efecto del caudal de alimentación sobre la conversión

#### BIBLIOGRAFIA

- Klein, J. and Wagner, F. (1983). Methods for the immobilization of microbial cells. Appl. Biochem. Bioeng. 4, 11-51.
- Poulsen, P.B. (1984) Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes. Biotech. Gen. Eng. Rev. 1, 121-138.
- Woodward, J. (1988) Methods of immobilization of microbial cells. J. Microbiol. Meth. 8, 91-102.