

## ANEXO 4

### MICROORGANISMOS

#### 4.1 Tipos de microorganismos con aplicación industrial

Se llama microorganismo a todos los organismos microscópicos que existen como células aisladas o agrupaciones celulares independientes de su estructura celular.

Algunos microorganismos son utilizados en procesos industriales.

Para que un microorganismo sea de interés industrial, este debe cumplir serie de condiciones que hagan que su uso resulto rentable.

Su crecimiento en un medio de cultivo económico debe ser rápido. Debe ser un cultivo puro con capacidad de reproducirse en las condiciones de laboratorio y de la planta industrial. Una característica importante es la susceptibilidad a la manipulación genética para conseguir así una mutación más rentable y optimizar el proceso.

Se pueden considerar microorganismos a las bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas.

En este estudio se empleará un tipo de microorganismo específico, perteneciente a la familia de los hongos. Se trata de la levadura, y dentro de esta especie, se usará la *Saccharomyces Cerevisiae*.

Las levaduras son microorganismos pertenecientes al grupo de las criptógamas, dentro de los hongos. Son incapaces de emplear la fotosíntesis para su alimentación. No poseen flagelos por lo que las células individuales son inmóviles entre sí. Son capaces de transformar los hidratos de carbono en alcohol con desprendimiento de dióxido de carbono.

Las levaduras son hongos unicelulares que se han usado durante siglos para la producción de vino, cervezas, licores y también para la obtención de pan.

Estos organismos metabolizan los azúcares y los transformas en productos cotizados industrialmente. Este proceso se llama fermentación, que es el cambio de las sustancias orgánicas complejas a otras más simples producidas por la acción de las enzimas.

En los procesos donde se requieren estos tipos de microorganismos se pueden usar también las enzimas extraídas de tales seres microscópicos y así desarrollar el proceso a través de las reacciones enzimáticas en vez de biológicas.

Todas las levaduras son capaces de metabolizar los azúcares como la glucosa, fructosa y manosa. Pero existen algunas que también son capaces de hacerlo en condiciones anaeróbicas, y este proceso es el llamado fermentación.

En la fermentación los azúcares simples son transformados en alcohol etílico y dióxido de carbono. Esto es la fermentación alcohólica.

La mayoría de las levaduras que se cultivan para este proceso son del género *Saccharomyces*, concretamente la especie ***Saccharomyces Cerevisiae***.

Cuando estas cepas son utilizadas para la fabricación de pan, usos médicos o para la fabricación de alimentos, el medio de cultivo en donde han crecidos dichas levaduras carece de interés y es considerado un residuo después de haber sido usado.

Por lo contrario, en el proceso de fermentación alcohólica el medio de cultivo es el producto final y las levaduras contenidas en tal producto líquido son filtradas para ser reutilizadas o desechadas.

*Tabla 2. Clasificación de los microorganismos según la temperatura*

<b>Tipos</b>	<b>Rango</b>	<b>Óptimo</b>
<b>Termófilos</b>	25 - 80 °C	50 - 60 °C
<b>Mesófilos</b>	10 - 45 °C	20 - 40 °C
<b>Psicrófilo</b>	-5 - 30 °C	10-20 °C

*Tabla 3. Clasificación microorganismos según el pH*

<b>Tipos</b>	<b>pH externo</b>	<b>pH interno</b>
<b>Acidófilos</b>	1.0 - 5.0	6.5
<b>Neutrófilos</b>	5.5 - 8.5	5.5 - 8.5
<b>Alcalófilos</b>	9.0 - 10.0	9.5

#### **4.2 Selección de la biomasa. *Saccharomyces Cerevisiae* y *Zymomonas Mobilis***

El éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, para la selección del mismo se deberán tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación:

- La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
- Su velocidad de crecimiento deberá ser alta.
- La cepa debe estar libre de contaminantes, incluidos fagos.
- Sus requerimientos nutricionales deberían ser satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido.
- Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.
- Debería llevar a cabo el proceso fermentativo completo en un tiempo corto.
- Si el objetivo del proceso es un producto, éste debería ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.

Los microorganismos que se utilizan en un proceso, pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. A nivel industrial, en general, cada firma posee su propia colección de organismos, muchos de los cuales han sido mejorados a través de técnicas clásicas de mutación o de ingeniería genética. Sin embargo, estas cepas sólo son empleadas por la industria que las posee, debido al gran valor comercial de las mismas.

En algunos casos se dispone de organismos modificados genéticamente para llevar a cabo reacciones específicas de biosíntesis, degradación o biocatálisis, los cuales están protegidos por patentes. Esto significa que un gran porcentaje de organismos aislados o modificados no son disponibles para uso general en laboratorios.

En este estudio se obtuvieron del departamento de genética de la facultad de biología. Estas cepas estaban contenidas en una caja de petri y fueron sacadas del congelamiento a través de nitrógeno líquido.

La **levadura** de la especie *Saccharomyces Cerevisiae* es la más utilizada en la fermentación de los azúcares a etanol ya que de forma eficaz transforma los azúcares de seis carbonos en etanol. Pero el sustrato orgánico vegetal además de tener hexosas como la glucosa también tiene pentosas como es el caso de la xilosa. Los azúcares de cinco carbonos no son metabolizados por las levaduras y como consecuencia no son utilizados como fuentes de carbono.

Esto hace disminuir el rendimiento del proceso ya que parte de los azúcares presentes en el medio de cultivo no se pueden transformar a etanol.

Para ello se podría recurrir al uso de otros microorganismos que fuesen capaces de aprovechar tales pentosas pero se requerían dos tanques de fermentación individuales y el coste global del proceso aumentaría considerablemente.

Una opción actualmente utilizada es la modificación genética de esta especie de levadura mediante la ingeniería biomolecular.

Se le introduce a la levadura *Cerevisiae* genes de otras levaduras que sí son capaces de metabolizar los azúcares de cinco carbonos.

Mediante estas **mutaciones** incitadas se consiguen levaduras más eficaces.

Día tras día se promueven investigaciones en el desarrollo de levaduras más eficaces en los procesos de fermentación y también se invierte en la búsqueda de un sustrato barato y de alto rendimiento.

Así se ha descubierto una **bacteria** bastante eficaz llamada ***Zymomonas mobilis***.

La descripción fenotípica de *Zymomonas* corresponde a los siguientes puntos:

- Bastón gramnegativo de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de largo.
- Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofotricos
- Arreglo celular peomorfico (cadenas, rosetas, filamentos)
- Ausencia de esporas, de cápsulas y constituyentes de almacenamiento celular.
- Catalapsa positiva y oxidasa negativa.
- Anaeróbico y microaerofílico.
- La utilización de sacarosa es inducible y puede ir acompañada de formación de levanas.
- Las únicas fuentes de carbono que metabolizan son: glucosa, fructosa y sacarosa.

La *zymomonas mobilis* forma parte de la microflora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales.

A parte de estas características físicas, lo más importante es su comportamiento frente a las condiciones del proceso. Es decir, cómo se comporta ante una alta concentración de azúcares, alcohol, ante la temperatura,...

La *zymomonas* es capaz de crecer en un amplio intervalo de temperaturas, desde los 25°C hasta los 45°C. Pero su temperatura óptima está acotada en un rango menor de temperaturas, entre los 30-35°C.

Cuando se opera a temperaturas mayores de los 30°C, la producción de etanol y de biomasa se ve afectada. La temperatura tiene un efecto muy importante sobre la composición y la fluidez de la membrana celular.

A altas temperaturas la fluidez de la membrana disminuye proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos insaturados, favoreciendo así la acumulación de etanol en el interior de las células.

Es decir, a altas temperaturas se favorece el efecto inhibitor del etanol ya que al encontrarse depositado dentro de la célula se amplifica la inhibición.

El etanol tiene grandes consecuencias sobre la composición de la membrana celular.

A través de las investigaciones realizadas se ha demostrado que el efecto que tiene la adición externa de etanol o el propio formado por las células causa un efecto inhibitor mayor sobre el crecimiento celular que sobre la producción de etanol.

Este hecho es importante porque si se pretende regular el crecimiento celular se puede aumentar la concentración de alcohol etílico en el medio de cultivo.

El oxígeno causa una disminución en la producción de etanol ya que las altas concentraciones de oxígeno disuelto incitan la formación de subproductos fermentativos. El efecto inhibitor del oxígeno está ligado a la concentración de los sustratos.

El comportamiento de la levadura ante la temperatura depende de la naturaleza de ésta.

La selección de este parámetro influye tanto en los factores fisiológicos como en los problemas físicos derivados, pérdidas por evaporación de etanol al trabajar con temperaturas elevadas.

Se debe tener en cuenta que para cada levadura existe una temperatura óptima en la cual muestra su máxima actividad. Además existe una zona independiente de la temperatura óptima donde la levadura aún presenta actividad.

A medida que la temperatura de operación se aleja de la óptima, se reduce considerablemente la actividad de dicha levadura, haciendo disminuir el rendimiento global del proceso.

Cuando se sobrepasa el mínimo o el máximo del rango de temperaturas de trabajo de los microorganismos, las levaduras permanecen en estado latente. Para toda levadura si se sobrepasan los 55°C durante un tiempo mayor a los cinco minutos se produce la muerte.

Para la *Cerevisiae* su desarrollo óptimo está entre los 28-35°C. Siendo la óptima los 30°C.

La levadura es afectada en alto grado por la concentración de alcohol. Una concentración alcohólica superior al 3% ya influye en el crecimiento. Una concentración sobre el 5% influye tanto en el crecimiento como en la fermentación.

Cuando la concentración de etanol alcanza el 10% se produce una paralización total en el crecimiento.

El pH es un factor bastante importante en el proceso de fermentación ya que controla la contaminación por microorganismos extraños al proceso. Además también influye en el crecimiento de la levadura y en la producción de etanol.

Durante el proceso la levadura toma nitrógeno de los aminoácidos orgánicos perdiendo así su carácter anfótero y pasando a ácido.

Esto causa una reducción del pH en el medio. Cuanto menor sea el pH del medio menor es la probabilidad de contaminación, ya que se hace un medio hostil para posibles microorganismos extraños que quieran crecer allí.

Pero a medida que el pH se hace menor la fermentación se hace más lenta porque las levaduras no se desarrollan adecuadamente.

El rango de pH para las Cerevisae es de 4,4-5,5 siendo el óptimo de 4,5 para su crecimiento.

La presencia de sustancias nutritivas en una concentración considerable es una condición necesaria en el crecimiento celular, mantenimiento de los microorganismos y en la producción del etanol.

Las principales sustancias nutritivas son carbohidratos, nitrógeno, fósforo, azufre, vitaminas y trazas de algunos elementos.

El suministro de oxígeno en todo proceso fermentativo es vital, como ya se explicará en apartados posteriores.

El crecimiento se ve influenciado de forma muy positiva por una buena aireación.

Las cantidades de aire que se precisan para la producción de levadura varían entre los 0,017 y 0,033 m<sup>3</sup> de aire por gramo de levadura conteniendo esta última un 30% de materia seca.

Al inicio de la fermentación la potencia de aireación no debe de ser muy intensa ya que en estos instantes iniciales la concentración de alcohol es pequeña y el medio se hace susceptible de ser infectado por microorganismos como los mohos, atacando a las levaduras del cultivo. Los efectos de aireación son más críticos operando en continuo debido a la necesidad de mantener el crecimiento de las levaduras y además el de procurar una velocidad de fermentación satisfactoria.

Ambos parámetros aumentan y disminuyen en sentido contrario, al aumentar la concentración de oxígeno se mejoran las condiciones para el crecimiento de la biomasa pero esto hace que el sustrato invertido en la producción de etanol disminuya, consiguiendo de tal forma reducir la eficiencia de la producción del etanol.

Es claro que al inicio el caudal de aire suministrado será pequeño aumentado en una etapa posterior cuando el pH disminuye y el medio se hace más hostil. Después, cuando el proceso ya es avanzado se debe introducir un caudal menor de oxígeno.

Si se comparan ambos microorganismos, La *Zymomonas Mobilis* con la *Saccharomyces Cerevisiae* se puede demostrar que existen algunas ventajas de la primera sobre la segunda. También se dan desventajas.

Las ventajas son las siguientes:

- La tolerancia osmótica a concentraciones superiores de azúcares con un máximo de 400 g/l. En el caso de la levadura su límite máximo de concentración de azúcar es de 1 g/l. Esto hace que el proceso sea más rentable ya que si hay más sustrato hay más producción de etanol y más rápido crecimiento celular.
- También tiene una tolerancia mayor al etanol, con un máximo en 130 g/l. El etanol actúa como un producto inhibitorio para la actividad de las levaduras y de las bacterias. A medida que avanza el proceso la actividad de las células se ve disminuida por el aumento considerable del etanol en el medio, llegándose a una concentración crítica que inhibe completamente el crecimiento de las células.

Las levaduras son más sensibles al etanol que las clases bacterias *Zymomonas*.

Como dato las levaduras son inhibidas más fuertemente por los alcoholes producidos por ellas mismas que por la adición de alcohol desde una fuente exterior.

- Las *Zymomonas* tienen una velocidad de crecimiento mayor, 0,27  $\mu\text{m/s}$  frente a 0,13  $\mu\text{m/s}$  de las *Cerevisiae*.
- El metabolismo anaerobio de los carbohidratos se lleva a cabo a través de la vía de Entner Doudoroff en donde solo se produce un mol de ATP por mol de glucosa utilizada. Esto significa que existe una reducción de la cantidad de glucosa que se convierte en biomasa en lugar de etanol, así que hay un mayor rendimiento en la producción del alcohol. Todo esto indica que el factor de conversión de sustrato a producto es más alto en las *Zymomonas* siendo su producción de células menor.
- El rango de pH óptimo es más amplio, siendo éste de 5-7.
- Y la temperatura óptima es más alta, llegando su valor máximo a 37°C.

Pero aparte de todas estas ventajas, las bacterias tienen una capacidad de reutilización menor. Además estas comparaciones se hacen de forma general y no se especifica las cepas concretamente. La cepa usada en este estudio pertenece a la familia de la *Saccharomyces* y cumple con más exigencias los parámetros de operación que la bacteria *Zymomonas*.

Según todo esto se busca un microorganismo con resistencia al alcohol ya que así se pueden obtener productos más puros, haciendo más económica la destilación ya que habrá menor consumo de combustible. Como mínimo debe permitir valores del 8-9% de alcohol en volumen. También debe de ser resistente a la acidez, este parámetro podrá aumentar para evitar infecciones. Y su resistencia a los cambios de temperatura es fundamental.

La cepa de *Saccharomyces Cerevisiae* IFI 256 cumple todas estas características de forma eficiente, aguantando pH comprendidos entre 4,5 – 4,0. Su temperatura óptima de trabajo es de 32°C. Aguanta altas concentraciones de azúcares, 22%v/v. También soporta altas cantidades de alcohol.

La levadura del tipo *Saccharomyces Cerevisiae* permite una conversión aproximada del 85% al cabo de 32 horas y del 90% al cabo de 75 horas en la producción de etanol. Su porcentaje en peso de carbono es del 45%, de oxígeno el 30,6%, de hidrógeno el 6,8% y de nitrógeno el 9%.

Si las condiciones de crecimiento son anaeróbicas el mantenimiento es de 0,036 gramos de células por gramo de sustrato y hora.

Sin embargo en condiciones aeróbicas la energía de mantenimiento es mucho menor, 0,022 gramos de células por gramos de sustrato y hora.

#### 4.3 Mantenimiento de los cultivos

Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos:

- Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- Preservar los niveles de su productividad inicial.
- Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad.

Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación.

Tanto para el mantenimiento, preparación y propagación de inóculos se deben usar métodos reproducibles que no produzcan variaciones o pérdidas de las características de la cepa empleada.

Los métodos de preservación o mantenimiento más importantes se describen a continuación.

El subcultivo es un método común de conservación, que consiste en el repique periódico del cultivo en un medio nutritivo fresco. El intervalo de transferencia varía con el microorganismo, debiendo considerarse el medio adecuado para cada especie.

Una vez desarrollados los cultivos se mantienen a 4 °C durante periodos que oscilan entre 15 días y 2 meses.

Los inconvenientes que presenta son varios:

- Incremento de la posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdida de las características del organismo.
- Riesgo de contaminación.
- Alteraciones en el medio de cultivo, durante la etapa en frío se produce una desecación gradual del mismo.

El Mantenimiento bajo una capa de aceite es una técnica simple y efectiva para prolongar la conservación de muchos organismos y consiste en cubrir completamente el cultivo después de su desarrollo en medio sólido, con una capa de aceite mineral o vaselina estéril. Los cultivos en esta forma se pueden conservar a temperatura ambiente o aún mejor en heladera por períodos de varios años. Algunos autores sostienen que en estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose, con posibilidades de aparición de mutantes; sin embargo se acepta que estas alteraciones no se observan hasta los tres años de mantenimiento.

La congelación es una técnica de elección, ya sea para cortos o largos períodos de tiempo debido a que la actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura.

La mayor disponibilidad de nitrógeno líquido (-196 °C) y el mejoramiento de los equipos de refrigeración han contribuido en mejorar esta técnica de conservación y hacerla más asequible.

Los cultivos son sometidos a congelamiento en la etapa de crecimiento estacionario, ya que en general en esta etapa las células son más resistentes a los daños por congelación y descongelación, que las de fase exponencial.

Muchos estudios señalan que una velocidad de congelación lenta y una rápida descongelación dan los mayores números de células viables. Dependiendo de la naturaleza de las células, existe una velocidad de congelación óptima en cada caso.

La temperatura de conservación más baja recomendada es -70 °C, ya que a temperaturas más altas ocurren algunas recristalizaciones, las cuales si son intracelulares son letales para las células.

En caso de nitrógeno líquido, la conservación podría prolongarse por años, asegurando una buena provisión del mismo y disponiendo de equipos con sistemas de alarma en caso de fluctuaciones de temperatura.

El empleo de un soporte de papel para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas.

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

#### **4.4 Biocatalizadores libres e inmovilizados**

Las células se pueden encontrar de forma libre dentro del tanque de reacción. Este modelo correspondería al de un reactor de mezcla perfecta, que mediante el sistema de agitación mezclaría el medio de cultivo con dicho cultivo. Dentro del sistema se crearían más células y se generaría el etanol, producto deseado.

Para un instante de tiempo distinto del inicial, se tendría un caldo de sustrato, biomasa y producto. Además se debe de contar con el aporte de oxígeno, es decir, que en aquel instante de tiempo también se tendría una concentración de oxígeno disuelto.

Al ser un tanque de mezcla completa, se supone que tiene una homogenización perfecta, es decir, para dicho instante de tiempo se tendrá una concentración determinada de cada especie válida para todo el reactor.

En este tipo de sistemas las limitaciones de transferencia interna de materia entre las mismas células es despreciable, ya que se encuentran agitadas y la difusión del oxígeno es facilitada.

Es un sistema sencillo, económico y fácil de diseñar. El inconveniente principal que tiene es la dificultad de recuperar las células una vez terminado el proceso, para así poderlas reutilizar mediante una recirculación o conservarlas para procesos posteriores.

Este inconveniente se ve acentuado a la hora de operar en continuo.

Por ello se prefiere la inmovilización de las células en procesos a escala industrial. La eficiencia es mayor.

La inmovilización de un biocatalizador, entendiendo por biocatalizador aquel cultivo de microorganismos o enzimas de interés industrial, consiste en fijar su localización en una región definida del reactor manteniendo al mismo tiempo una actividad catalítica requerida y la mayor viabilidad posible.

Con esto último se quiere decir que cuando se procede a la inmovilización de una cepa, a veces, según el método, se pierde parte de la viabilidad de las células.

La característica general de cualquier sistema con biocatalizadores inmovilizados es la existencia de mecanismos difusionales para el transporte de sustrato y producto. Y si existiese suministro de oxígeno también habría una difusión de éste hacia el biocatalizador inmovilizado.

Las ventajas de la utilización de las células son las siguientes:

- La posibilidad de trabajar en continuo, el biocatalizador se queda retenido en el interior del reactor mientras se mantiene un flujo de entrada y salida de líquido. Así se puede operar con caudales mayores a los correspondientes del límite de lavado cuando se opera con células libres. Esta ventaja hace aumentar la productividad ya que se opera con caudales mayores, con concentraciones de biomasa más altas y de todo esto resulta una mayor conversión de sustrato.

- En sistemas discontinuos la inmovilización favorece la reutilización del biocatalizador.
- Además esta forma de operar permite aumentar sensiblemente la concentración de microorganismos frente a las células que se encontraban en suspensión.
- Se reducen los efectos de contaminaciones accidentales del proceso porque la población de células extrañas que se encuentran en suspensión es fácilmente eliminada respecto a las de interés industrial que se encuentran inmovilizadas y en mayor concentración.

Los inconvenientes son los que se describen a continuación:

- La actividad de una célula puede quedar directamente afectada por las condiciones a las cuales se lleva a cabo el proceso de inmovilización. Esto puede llevarlas a perder parte de su actividad o viabilidad.
- Además los efectos de la velocidad de difusión de materia toman relevancia. Es decir, la velocidad de difusión de los sustratos y productos dentro del sistema de células inmovilizadas puede limitar sus actividades y su eficiencia cuando dicha velocidad sea más lenta que la velocidad de la transformación que se esté dando.
- Desde el punto de vista del proceso global, la incorporación de una nueva etapa al proceso introduce mayor complejidad, y ésta se ha de ver compensada de forma clara con un aumento de productividad y mejoras en las operaciones de separación entre el producto y los microorganismos. También debe aumentar los periodos de operación.
- El uso de estos sistemas de inmovilización dependerá del tiempo de conversión del proceso, de la productividad requerida y de la escala a la cual se esté trabajando. Además también influirá de forma fundamental el tipo de reactor a utilizar, ya que en sistemas con agitación es mucho más difícil contener una fase inmovilizada.

Existen diversos métodos de inmovilización según sean los mecanismos en los cuales se basen.

- Adsorción: Se produce por una interacción de tipo iónico o mediante fuerzas atractivas débiles sobre la superficie del soporte.
- Enlaces cruzados y autoinmovilización: No existe un soporte propiamente dicho sino que las células mediante una interacción directa llegan a inmovilizarse. Este proceso se llama floculación.
- Atrapamiento: A través de la formación de estructuras tridimensionales las células quedan atrapadas de forma uniforme en su interior.
- Sistemas con membranas (microencapsulación, membranas preformadas): En los dos casos el biocatalizador se inmoviliza en el interior de un espacio limitado por una membrana. Las microcápsulas se producen en presencia del biocatalizador y queda incorporado en su interior. En el segundo caso, las membranas preformadas se generan con anterioridad y después se introducen los microorganismos en su interior.

Estos métodos de inmovilización son usados preferentemente en los reactores del tipo de lecho fijo, fluidizado o con membranas.

En menor proporción se usa para reactores de tanque agitado ya que como se dijo anteriormente, la agitación afecta de forma severa a la integridad física de las células inmovilizadas.

## 4.5 Tipos de sistemas de inmovilización

### Inmovilización por adsorción

Se trata del procedimiento más simple y sencillo. Se pone en contacto la suspensión de microorganismos con un adsorbente activo. Después de un tiempo, cuando se ha dado la adsorción de lava el complejo formado para eliminar cualquier microorganismo que no se haya fijado. Las interacciones que favorecen la adsorción son de tipo iónico o enlaces débiles como los puentes de hidrógeno o fuerzas de Van Der Waal. Además si se desarrollan polímeros extracelulares la adsorción se favorece.

Este método de inmovilización es muy suave y no afecta a la viabilidad de las células. El inconveniente más relevante es la reversibilidad del proceso, ya que si existe un cambio en el pH, en las fuerzas iónicas o en la temperatura se puede dar la desadsorción del soporte.

Existen pretratamientos para favorecer la inmovilización.

Se suele hacer en cubos de madera, antracita, piezas de PVC,... El soporte a utilizar debe cumplir una serie de características, tales como: alta capacidad de retención de células para conseguir concentraciones mayores de microorganismos, ser inerte bioquímicamente, resistencia a la tensión y a las presiones ejercidas por los gases generados, permitir la difusividad de los reactantes y los productos formados para minimizar la influencia de las limitaciones por transferencia de masa.

### Autoinmovilización

Algunas células tienen la capacidad de formar agregados macroscópicos (flóculos o pellets) con lo que no se requiere la adición de ningún reactivo ni soporte para realizar la inmovilización.

La formación de agregados celulares depende de las condiciones en las que se realiza el cultivo, como la agitación, composición del medio, pH o la concentración de oxígeno disuelto.

Todos estos parámetros afectarán en el mecanismo de agregación de las células, hasta tal punto que células iguales se agregarán de diversa forma si las condiciones son distintas.

Este método de inmovilización depende de si la célula tiene tal capacidad para producirla. Es frágil ante cambios de operación, como la agitación o composición de medio. Se necesitan largos periodos de tiempo para obtenerlos.

Se debe añadir que existen agentes floculantes como el glutaraldehído y el tolueno diisocianato. Estos agentes fomentan la agrupación de células y su consecuente agregación.

### Inmovilización por inclusión

Se forma una matriz de tres dimensiones en presencia de las células quedando éstas atrapadas dentro de su estructura.

La naturaleza de la matriz debe cumplir una serie de condiciones como la de retener sin dificultad en su interior al cultivo de microorganismos y la de facilitar la difusión de sustratos y reactivos.

El hecho de que el proceso de formación de la matriz no interaccione directamente con las células hace que se puedan inmovilizar con un % de viabilidad muy elevado, manteniendo

unas condiciones suaves, es decir, controlando la toxicidad, pH, T y concentraciones de reactivos.

### Inmovilización por membrana

Existen dos formas de inmovilización basadas en la retención del biocatalizador en un espacio limitado por una membrana semipermeable.

Estas dos formas son las siguientes:

La inmovilización por microencapsulación se usa en presencia de partículas de tamaño pequeño que quedan incluidas en su interior. Estas partículas permanecen en suspensión.

También están las membranas preformadas que se usa para tamaños de partículas mayores. Son membranas fabricadas con anterioridad a ala introducción del biocatalizador en su interior.

Las más usadas son las fibras huecas. Este sistema de inmovilización se encuentra fabricado e incorporado dentro del reactor.

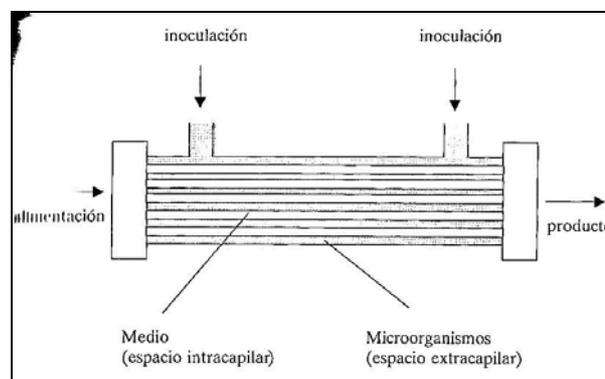


Fig.28 Esquema de un reactor de fibras huecas.

En ambos casos se puede controlar el tamaño de poro y así el transporte de las moléculas a su interior, es decir, se controla qué tipo de células pueden entrar o no, todo ello esta en función de su peso molecular.

La microencapsulación permite mantener a los microorganismos suspendidos en el medio líquido y al mismo tiempo separados del medio exterior de reacción, de esta forma se cumplen los objetivos de la inmovilización de células pero con la ventaja de que no se actúa de forma directa sobre tales células.

El inconveniente de las microcápsulas es su complejo proceso de formación.

A la hora de elegir el método de inmovilización de microorganismos se debe de tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- Naturaleza de las células
- Condiciones de operación
- Facilidad de preparación
- Regeneración del soporte
- Estabilidad
- Costes

Se ha de tener en cuenta que en este estudio se realizará la fermentación con células libres, y la cinética descrita corresponderá a tales células y no a las inmovilizadas.

