RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Britos, Claudia Noelia

Bioprocesos con microorganismos inmovilizados en polímeros macroporosos

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Britos, C. N. (2018) Bioprocesos con microorganismos inmovilizados en polímeros macroporosos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/789

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Britos, Claudia Noelia, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
diciembre de 2013,
http://ridaa.unq.edu.ar
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Bioprocesos con microorganismos inmovilizados en polímeros macroporosos

TESIS DOCTORAL

Claudia Noelia Britos

cbritos@unq.edu.ar

Resumen

En general, para que un proceso de bioconversión industrial basado en micro- organismos sea factible es necesario operar en condiciones de alta densidad celular. El uso de biocatalizadores heterogéneos con altas actividades catalíticas y estables por tiempos prolongados puede satisfacer este requerimiento.

Uno de los aspectos que puede garantizar el éxito del biocatalizador es el so- porte. Idealmente, debe poseer gran área superficial con características físicas y/o químicas que promuevan la adhesión celular, y estabilidad mecánica, química, térmica y biológica. Para ello, en este trabajo se desarrollaron soportes para inmovilización de células basados en HDPE y fibras de celulosa. La modificación de los polímeros se realizó a través de polimerización por injerto radio-inducido, y adicionalmente para el caso de fibras de celulosa, por cationización química.

Los soportes obtenidos se estudiaron en cuanto a sus características superficiales y como soportes para la inmovilización de microorganismos. Para ello, se optimiza- ron las condiciones de inmovilización, carga bacteriana, reusos y recuperación de los materiales desarrollados.

E. coli inmovilizada en los soportes desarrollados en el presente trabajo no pierde capacidad catalítica respecto al estado libre. Adicionalmente, se determinó que es posible aumentar la carga de biomasa inmovilizada por incubaciones sucesivas (valor óptimo: 4 re-inmovilizaciones) y/o favoreciendo el crecimiento celular de las bacterias inmovilizadas.

En este trabajo se demostró que una vez que la biomasa inmovilizada pierde actividad, es posible recuperar el soporte a través de un proceso de lavado. La optimización del proceso de lavado con detergentes enzimáticos permitió obtener la recuperación total del soporte hasta 9 veces, lo cual mejora sustancialmente su vida útil.

Se realizaron cinéticas de inmovilización para determinar el tiempo óptimo de incubación del soporte con la suspensión bacteriana, permitiendo reducir el tiempo del proceso 4 veces (de 16 a 4 horas). Además, se ensayaron reacciones biocatalíticas sucesivas o reúsos con las células inmovilizadas para demostrar la estabilidad del inmovilizado en condiciones de operación.

Se comprobó que los soportes obtenidos (HDPE-EDA, Cel-EDA y Cel-TMA) son adecuados tanto para la inmovilización de E. coli como de un microorganismo representativo de las bacterias Gram positivas como L. lactis.

Las fibras de celulosa modificadas químicamente (Cel-TMA) se utilizaron como soporte para el desarrollo de un sistema de operación en continuo con L. lactis inmovilizadas para la producción de nisina a partir de un medio de cultivo basado en un desecho industrial. Para ello se formuló un medio de cultivo basado en

suero de ricota y harina de soja y se optimizaron las condiciones de crecimiento y producción. Con el objetivo de diseñar un proceso de producción integrado, se diseñó un dispositivo para la recuperación in situ del producto.

Se obtuvieron valores de producción de nisina del orden de los 16 mg/l de suero utilizando los medios basados en suero de ricota formulados en este trabajo, y se duplicó este rendimiento con la recuperación in situ de la nisina con cultivos en batch. La producción de nisina obtenida en batch fue superior que la reportada para la fermentación en leche.

Por último, se diseñó un reactor empacado con fibras de celulosa para la in- movilización de L. lactis y un dispositivo para la recuperación de nisina por extracción con espuma para un proceso en continuo. La fermentación continua se llevó a cabo durante 560 horas y se ensayaron diferentes velocidades de dilución. Se determinaron condiciones de operación en las cuales la lactosa se consume en su totalidad y se produce nisina. El biocatalizador inmovilizado mostró gran estabilidad y resistencia mecánica en las condiciones de operación. El reactor con fibras de celulosa empacadas resultó apropiado para el uso de medios de cultivo con sólidos en suspensión similares a los utilizados a nivel industrial, dado que no se presentaron obstrucciones durante el desarrollo del proceso. La alta estabilidad del inmovilizado lo convierte en una opción para la obtención de numerosos productos metabólicos microbianos no ligados al crecimiento que se excreten al medio de cultivo, como la producción de vitaminas y/o probióticos.

En síntesis, los resultados reportados en el presente trabajo muestran la prepa- ración de materiales poliméricos con características apropiadas para la obtención de biocatalizadores inmovilizados con gran actividad y estabilidad para la producción de compuestos biotecnológicos de alto valor agregado.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Quilmes y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por aportar los recursos e infraestructura para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Aplicaciones Tecnológicas y Agropecuarias del Laboratorio de Polímeros del Centro Atómico Ezeiza (CNEA), y en particular al Dr. Eduardo Smolko, por proveer del equipamiento y espacio físico para realizar los experimentos de radiaciones.

A los Dres. Mariano Grasselli y Jorge Trelles por su guía y apoyo permanente durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Cristina Taira por su paciente predisposición y desinteresados consejos.

A todos los compañeros del laboratorio, actuales y pasados, con quienes he aprendido y disfrutado de largas horas de trabajo. En particular quiero agradecerles a Laura, Cintia, Jorge y Sonia quienes siempre me han brindado su apoyo y amistad.

Le quiero agradecer nuevamente a la Universidad Nacional de Quilmes pero en otro sentido, por la oportunidad de poder estudiar y trabajar en lo que me apasiona. Espero poder devolver algún día todo lo que me dio la Universidad Pública.

A todos mis amigos y compañeros que he conocido en el CECyT, con quienes aprendí a luchar por lo que creo y cambiaron mi visión del mundo.

Por último, quiero agradecerles a Betty, Miriam, Mateo, Elena y, Matias. Porque sin su amor, alegría y apoyo incondicional no hubiese llegado nunca a transitar este camino. A ellos les dedico este trabajo.

Todos nosotros sabemos algo. Todos nosotros ignoramos algo. Por eso, aprendemos siempre

Paulo Freire

INDICE GENERAL

Página

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO 1

ESTRUCTURA DEL TRABAJO 3

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN 5

PROCESOS CON CÉLULAS INMOVILIZADAS 6

Ventajas de los procesos con células inmovilizadas 8

Métodos de inmovilización de células 9

Inmovilización superficial sobre soportes sólidos …. 10

Atrapamiento en una matriz porosa 12

Agregación 13

Contención mecánica por barrera 13

Características deseables de un soporte para inmovilización 13

POLÍMEROS FUNCIONALIZADOS PARA INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS 15

Técnicas de modificación de superficies poliméricas 16

Modificación química "húmeda" 16

Química de silanos 17

Tratamientos ionizantes 17

Modificación de polímeros por injerto inducido por radiación γ 19

Fundamento de la modificación 19

Métodos de injerto por radiaciones 20

Características de los injertos sintetizados por radiación 22

Estudio y caracterización de soportes para inmovilización 23

Método gravimétrico 23

Determinación de grupos epóxido 24

Ángulo de contacto 24

Adsorción de colorantes 24

Adsorción de proteínas 24

Actividad Biológica 25

Potencial Z. 25

Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) 25

Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) 25

Espectrometría de masa ToF-SIMS 26

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) 26

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) 26

INTERACCIÓN CÉLULA-POLÍMERO: ADHESIÓN CELULAR A UN SOPORTE SÓLIDO Y FORMACIÓN DE BIOFILM 27

Modelo de adhesión 28

Factores adicionales involucrados en la adhesión 30

Fenotipos de suspensión, adherencia y biofilm 32

CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LOS MICROORGANISMOS A INMOVILIZAR 33

Escherichia coli 33

Nucleósido fosforilasas 34

Lactococcus lactis 35

Metabolismo de la lactosa en L. lactis 37

Fermentación homoláctica y heterofermentación 39

Metabolismo aeróbico en L. lactis 40

Actividad proteolítica en L. lactis 42

Requerimientos nutricionales 43

BACTERIOCINAS 43

Clasificación de bacteriocinas 44

Nisina 46

Biosíntesis y regulación transcripcional 48

Control de la producción de nisina por quórum sensing 49

Inmunidad 52

Mecanismo de la actividad biocida 53

Resistencia 55

Aplicaciones de la nisina 55

Aplicaciones en alimentos 56

Aspectos regulatorios 57

Potenciales aplicaciones de nisina en terapéutica 58

REFERENCIAS 60

CAPÍTULO 2. MODIFICACIÓN DE SOPORTES POLIMÉRICOS

INTRODUCCIÓN 69

Características del polietileno (PE) 70

Características de la fibra de algodón 71

Estructura de la fibra de celulosa 72

Modificación de polímeros por injerto 73

Modificación química de la fibra de algodón 75

MATERIALES Y MÉTODOS 77

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 79

Cationización por injerto 79

Modificación de HDPE 79

Análisis por Espectroscopia Infrarroja (ATR FT-IR) 80

Grado de modificación 81

Cuantificación de grupos epóxido 81

Funcionalización del HDPE modificado con EDA 82

Solventes de lavado 83

Modificación de fibras de celulosa 84

Análisis de la modificación por injerto 84

Cationización química 87

Evaluación cualitativa de la cationización 87

Cuantificación de aminos cuaternarios 88

Comparación de los materiales modificados 89

CONCLUSIONES PARCIALES 91

REFERENCIAS 93

CAPÍTULO 3. ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN BACTERIANA EN POLÍMEROS FUNCIONALIZADOS

INTRODUCCIÓN 95

Análisis de la inmovilización por determinación de actividad biológica. 97

MATERIALES Y MÉTODOS 99

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 101

Inmovilización de E. coli en HDPE-EDA 101

Análisis por Microscopia del material inmovilizado 101

Análisis por Espectroscopía Infrarroja 103

Evaluación de la inmovilización por actividad biológica 104

Efectividad de la inmovilización de E. coli en HDPE-EDA 105

Determinación del tiempo óptimo de inmovilización 106

Optimización de la carga microbiana 107

Ensayo de reusabilidad del biocatalizador 111

Ensayo de lavado del soporte 111

Ensayos de inmovilización en Fibras de Celulosa 114

Comparación del biocatalizador inmovilizado 114

Determinación de la carga celular en la suspensión para inmovilización. 115

Determinación del tiempo óptimo de inmovilización 115

Comparación entre inmovilización por adsorción y por atrapamiento 116

Ensayos de inmovilización de L. lactis 118

Inmovilización de L. lactis en soportes sintéticos y naturales 118

Determinación de la concentración de células para la inmovilización 120

Aumento de la carga bacteriana por reinmovilización 120

CONCLUSIONES PARCIALES 122

REFERENCIAS 125

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS Y TRATAMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN 127

Desarrollo de métodos analíticos 127

Cuantificación de lactosa y ácido láctico 127

Cuantificación de bacteriocinas 129

Componentes de un medio de cultivo industrial 131

Suero de leche 131

Aditivos 134

MATERIALES Y MÉTODOS 136

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 138

Desarrollo de métodos analíticos 138

Cuantificación de lactosa 138

Cuantificación de ácido láctico 139

Modificación del protocolo para disminuir interferencias 140

Cuantificación de nisina 141

Selección de la cepa sensible para el bioensayo de nisina 142

Determinación de la curva de recuento celular 143

Bioensayo 144

Preparación de componentes de un medio de fermentación 145

Tratamiento del suero de leche 145

Preparación del hidrolizado de harina de soja 147

Optimización del tratamiento de harina de soja 148

CONCLUSIONES PARCIALES 151

REFERENCIAS 152

CAPÍTULO 5. ESTUDIOS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCIÓN 155

Fermentación de L. lactis y producción de nisina 155

Requerimientos nutricionales de L. lactis 156

Aditivos y condiciones de cultivo 159

Utilización de hierro hemo en el medio de cultivo 160

Uso de suero de leche para producción de bacteriocinas 161

MATERIALES Y MÉTODOS 162

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 164

Estudios del crecimiento bacteriano en frascos 164

Cinética de crecimiento de L. lactis en presencia de lactosa 164

Crecimiento en suero de ricota 166

Crecimiento en suero de ricota e hidrolizado de soja 167

Efecto de la hemina en la sobrevida de L. lactis 168

Fuentes alternativas de hierro hemo 169

Suplementación del medio basado en suero de ricota e hidrolizado de soja 170

Ensayo de adaptación en medios complejos 172

Crecimiento y producción en suero de ricota con distinto tratamiento 173

Experimento de acostumbramiento a lactosa 174

Adaptación a medios basados en suero de ricota 175

Fermentaciones en batch 176

Efecto del tratamiento del suero sobre la fermentación 179

Efecto de la proporción de suero 181

Efecto del tratamiento del hidrolizado de soja 181

Efecto del tipo de suero 183

Análisis general de los cultivos batch 185

CONCLUSIONES PARCIALES 189

REFERENCIAS 191

CAPÍTULO 6. RECUPERACIÓN DEL PRODUCTO Y CULTIVO CONTÍNUO

INTRODUCCIÓN 195

Recuperación de nisina.. 196

Recuperación de compuestos por fraccionamiento en espuma 197

Cultivo continuo con células inmovilizadas 199

MATERIALES Y MÉTODOS 202

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 203

Recuperación de nisina in situ en cultivos batch 203

Fermentación continua de L. lactis 205

Selección del soporte de inmovilización 205

Reactor tubular..... 206

Inmovilización de L. lactis en el reactor tubular 207

Módulo de extracción del producto 208

Esquema del proceso 208

Perfil de la fermentación 209

CONCLUSIONES PARCIALES 215

REFERENCIAS 217

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES..... 219

ANEXO I. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE LABORATORIO..... i

ANEXO II. COMPOSICIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE POTENCIAL USO INDUSTRIAL..... iii

ANEXO III. COMPARACIÓN DE LAS COMPOSICIONES DE LOS MEDIOS BASADOS EN SUERO DE RICOTA E HIDROLIZADO DE HARINA DE SOJA..... vii

ANEXO IV. PERFILES DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN..... xi

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Métodos básicos de inmovilización celular……	10
Figura 1.2	Estrategias de funcionalización de polímeros para inmovilización de células……	15
Figura 1.3	Métodos de modificación de superficies poliméricas……	16
Figura 1.4	Reacción de polimerización por injerto simultáneo ……	22
Figura 1.5	Esquema de energía libre de las interacciones según la teoría DLVO para un sistema célula-soporte con igual carga……	29
Figura 1.6	Micrografía de E. coli……	33
Figura 1.7	Micrografía de *L. lactis*……	36
Figura 1.8	Transporte y metabolismo inicial de carbohidratos en *L. lactis*. ……	37
Figura 1.9	Metabolismo homo- y heterofermentativo en *L. lactis*……	38
Figura 1.10	Secuencia de aminoácidos y formación de anillosde la nisina A ……	47
Figura 1.11	Esquema del operón nisA……	49
Figura 1.12	Representación esquemática de la biosíntesis y regulación de nisina en *L. lactis*…...	51
Figura 1.13	Mecanismo de formación de poro de la nisina……	54
Figura 2.1	Microfotografía electrónica de barrido del HDPE macroporoso……	71
Figura 2.2	Estructura química de la β-celobiosa……	71
Figura 2.3	Estructura de la fibra de algodón……	72
Figura 2.4	Estructura química del GMA……	73
Figura 2.5	Esquema de funcionalización de polímeros por injerto simultáneo……	74
Figura 2.6	Estructura del GTMA……	75
Figura 2.7	Reacción del GTMA con los oxhidrilos de la celulosa……	75
Figura 2.8	Microfotografías SEM en dos diferentes magnificaciones del HDPE macroporoso original (A) y modificado con poliGMA (B)……	79
Figura 2.9	Espectros de ATR FT-IR en rango de 1900 a 850 cm-1 (1) y 3800 a 2700 cm-1(2) a) HDPE sin modificar, b) HDPE- pGMA, c) HDPE-pGMA-EDA……	80
Figura 2.10	Gráfico del grado de injerto en función de la concentración inicial de monómero……	81
Figura 2.11	Estructura química del IDA……	82
Figura 2.12	Estructura química del EDA……	82
Figura 2.13	Microestructuras propuestas para las cadenas de pGMA obtenidas con diferentes solventes de reacción ……	86

Figura 2.14	Adsorción de colorantes a la fibra de algodón……	88
Figura 2.15	Estructura del Alizarin Red S……..	88
Figura 3.1	Reacción de hidrólisis de uridina por acción de la nucleósido fosforilasa de *E. coli.*…	97
Figura 3.2	Reacción de hidrólisis de timidina por acción de la pirimidín nucleósido fosforilasa de *L. lactis* ……..……..	97
Figura 3.3	Microfotografias SEM de la superficie del biocatalizador inmovilizado..……	101
Figura 3.4	Microfotografías TEM del biocatalizador con la identificación de las diferentes regiones del material ……..……	102
Figura 3.5	Comparación del efecto del tipo de interacción de soporte sobre la célula inmovilizada ……..……	103
Figura 3.6	Espectros de ATR FT-IR. (1) 1900 a 850 cm-1 y (2) 3800 a 2700 cm-1. a) HDPE-EDA, b)HDPE-EDA inmovilizado ……..….	104
Figura 3.7	Comparación de la actividad de células libres e inmovilizadas en HDPE-EDA..……	105
Figura 3.8	Efecto del tiempo de incubación sobre la inmovilización para la reacción de fosforólisis a tiempos iniciales ……..……..…	106
Figura 3.9	Efecto del número de pasos de re-inmovilización sobre el rendimiento de la reacción ……	108
Figura 3.10	Comparación de cinéticas de reacción. I-1: 1 evento de inmovilización (control), I-4: 4 eventos de re-inmovilización, 9: 1x109 células libres ……..….	109
Figura 3.11	Efecto de las incubaciones en condiciones de crecimiento sobre el rendimiento de la reacción …….....	109
Figura 3.12	Comparación de cinéticas de reacción. LI-1: 1 incubación en LB, I-2: 2 incubaciones con LB, L-0: sin incubación en LB (control) ……...	110
Figura 3.13	Reusabilidad del biocatalizador ……..….	111
Figura 3.14	Actividad relativa del biocatalizador reinmovilizado después de cada ciclo de lavado según el Protocolo A (NaOH) y B (NaClO)……..…….....	112
Figura 3.15	Actividad relativa del biocatalizador reinmovilizado después de cada ciclo de lavado según el Protocolo C (Tween80®) y D (detergente enzimático) …….....	112
Figura 3.16	Cinética de reacción a tiempos iniciales de los biocatalizadores obtenidos por inmovilización en fibras de celulosa. 8: $1x10^8$ células, 9: $1x10^9$ células libres …….	114
Figura 3.17	Rendimiento de la reacción de fosforólisis de uridina. 8: $1x10^8$, 9: $1x10^9$ células ……	114
Figura 3.18	Efecto de la cantidad inicial de células sobre la inmovilización. 8: $1x10^8$ células, 9: $1x10^9$ células, 10: $1x10^{10}$ células …….	115

Figura 3.19	Efecto del tiempo de inmovilización en el rendimiento de la reacción…….……..	115
Figura 3.20	Comparación entre inmovilización por adsorción y por atrapamiento ……...	116
Figura 3.21	Inmovilización de *L. lactis* en diferentes soportes. Cinética de reacción y valores de velocidad inicial y rendimientos obtenidos. 9: $1x10^9$ células en suspensión …….……	119
Figura 3.22	Rendimiento de la reacción para la inmovilización de *L. lactis* con diferente cantidad de células. 8: $1x10^8$ células, 9: $1x10^9$ células, 10: $1x10^{10}$ célula……..….	120
Figura 3.23	Rendimiento de la reacción para la re- inmovilización de *L. lactis*. A: HDPE modificado por injerto, B: Cel-EDA y Cel-TMA ……..……..…	120
Figura 3.24	Estrategia de optimización de biocatalizadores ……	123
Figura 4.1	Estructura química de la lactosa ……...	128
Figura 4.2	Estructura química del ácido láctico ……	128
Figura 4.3	Efecto de la dilución de lactasa comercial en la determinación de lactosa ……..….	138
Figura 4.4	Curva calibración lactosa ……...	139
Figura 4.5	Curva calibración de acido láctico por el método químico ……...	140
Figura 4.6	Perfil de HPLC del ácido láctico ……	141
Figura 4.7	Cinéticas de crecimiento de cepas sensibles a nisina. A: *M. luteus*, B: *L. lactis* sub. *cremoris* ……..……..	142
Figura 4.8	Curva UFC vs Absorbancia para *L. lactis* sub. *cremoris* ……..….	143
Figura 4.9	A: placa con halos de inhibición del crecimiento de *L. lactis* sub. *cremoris*.B: curva de calibración para cuantificación de nisina ……..…….	145
Figura 4.10	Harinas de soja utilizadas……..……	147
Figura 5.1	Cinéticas de crecimiento (A), evolución del pH (B) y producción de nisina (C) con diferentes concentraciones de lactosa …….	165
Figura 5.2	Crecimiento de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454 con digerido de harina y peptona de soja …...……	167
Figura 5.3	Efecto del agregado de hemina en el crecimiento de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454……..	168
Figura 5.4	Placas de agar de cultivos de medio con hemina y agitación (superior) y condición estándar (inferior) para igual tiempo de incubación y dilución …….	169
Figura 5.5	Comparación de crecimiento de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454 con diferentes fuentes de hierro hemo ……..….	170
Figura 5.6	Efecto del agregado de micronutrientes sobre el crecimiento de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454: (A) evolución de la biomasa, (B) producción de nisina, (C)	

	productividad…….……....	171
Figura 5.7	Fermentador New Brunswick Bioflo III de 5 L de capacidad…….……	176
Figura 5.8	Efecto del tratamiento del suero sobre el crecimiento y producción de *L. lactis* sub. *lactis* ATCC 11454 ……..	179
Figura 5.9	Efecto de la proporción de suero en el medio de fermentación de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454 …….	180
Figura 5.10	Efecto del tratamiento de los componentes del medio de fermentación de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454…..……..	182
Figura 5.11	Efecto del tratamiento de los componentes del medio. A: tratamientos completos, B: tratamientos optimizados ……..	183
Figura 5.12	Efecto del tipo de suero en el medio de fermentación de *L. lactis* sub. lactis ATCC 11454 ……...	184
Figura 5.13	Perfiles de fermentación de *L. lactis: A* medio M17; B LSH:HHS 2:1……..……....	185
Figura 6.1	Estructura de la espuma e interacción de proteínas……..	200
Figura 6.2	Detalles del sistema de recuperación de nisina por espuma. A: esquema del sistema, B: detalles del sistema en el reactor ……..…	205
Figura 6.3	Cinética de crecimiento y producción de *L. lactis* A: con extracción de nisina, B: sin extracción ……..……..	206
Figura 6.4	Esquema del reactor tubular……..……...	209
Figura 6.5	Esquema del dispositivo para la extracción de espuma en continuo ……..…	210
Figura 6.6	Esquema del reactor y proceso para operación en continuo……..……..	211
Figura 6.7	Perfil de la fermentación continua con células inmovilizadas…..…….	213
Figura 6.8	A. Vista del material inmovilizado posterior a la fermentación. B. Microfotografía SEM del material inmovilizado ……..……	215

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.1	Aplicaciones de procesos con células inmovilizadas……	7
Tabla 1.2	Ejemplos de bacteriocinas……	44
Tabla 2.1	Propiedades del PE……	70
Tabla 2.2	Propiedades del HDPE……	70
Tabla 2.3	Composición promedio de la fibra de algodón ……	71
Tabla 2.4	Adsorción de colorantes a la fibra de algodón……	87
Tabla 2.5	Comparación de las modificaciones de HDPE y fibras de algodón……	89
Tabla 3.1	Velocidades iniciales (Vi en mM uracilo/h) para la reacción de fosforólisis de uridina con células libres e inmovilizadas ……	105
Tabla 3.2	Efecto sobre la cinética de reacción de las re-inmovilizaciones ……	108
Tabla 3.3	Efecto sobre la cinética de reacción de las incubaciones en medio de crecimiento….	110
Tabla 3.4	Superficie y aminos disponibles de los soportes utilizados ……	117
Tabla 4.1	Componentes de los sueros ……	133
Tabla 4.2	Cuantificación de muestras complejas de lactosa y láctico ……	141
Tabla 4.3	Efecto de la digestión enzimática sobre el tipo de harina de soja ……	148
Tabla 4.4	Comparación de los tratamientos de hidrólisis de harina de soja ……	149
Tabla 5.1	Efecto del suero de leche sobre el crecimiento de *L. lactis* ……	166
Tabla 5.2	Crecimiento y producción de *L. lactis* en medios complejos ……	172
Tabla 5.3	Crecimiento y producción de *L. lactis* en diferentes sueros de ricota ……	174
Tabla 5.4	Acostumbramiento al crecimiento y producción en lactosa ……	174
Tabla 5.5	Acostumbramiento al crecimiento y producción en suero de ricota ……	175
Tabla 5.6	Condiciones de cultivo ensayados en fermentador……	177
Tabla 5.7	Resultados generales de las condiciones de fermentación ensayadas……..	178
Tabla 5.8	Resultados de las principales composiciones de medios ensayadas ……	185
Tabla 6.1	Parámetros de la producción de nisina en cultivo continuo ……	216

Abreviaturas

ATR: Reflectancia Total Atenuada
AFM: Microscopía de Fuerza Atómica
BAL: bacterias ácido lácticas
BP: buffer fosfato
Cel-pGMA: celulosa modificada por injerto de pGMA
Cel-EDA: celulosa modificada por injerto de pGMA funcionalizado con EDA
Cel-TMA: celulosa cationizada con GTMA
DEA: dietilenamina
DLVO : teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMSO: dimetilsulfóxido
dH_2O: agua destilada
EA: etilenamina
EDA: etilendiamina
EPS: sustancias poliméricas extracelulares
FTIR: Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier
GMA: glicidilmetacrilato
GTMA: glicidiltrimetilamina
HPLC: cromatografía líquida de alta performance
HDPE: polietileno de alta densidad
HDPE-pGMA: HDPE modificada por injerto de pGMA
HDPE-EDA: HDPE injertado con pGMA funcionalizado con EDA
IDA: ácido iminodiacético
kDa: kilodalton
kGy: kilo Grey; unidad de dosis de irradiación
LPS: lipopolisacárido
NP: nucleósido fosforilasa
PCL: policaprolactona
PET: polietilentereftalato
PE: polietileno
PEG: Polietilenglicol
PEI: polietilenimina
PES: polietersulfona
pGMA: polímero de GMA
PM: peso molecular
PP: polipropileno
Psf: polisulfona
PTFE: politetrafluoroetileno
PS: poliestireno
PMMA: polimetilmetacrilato
PNP: purín nucleósido fosforilasa
PyNP: pirimidín nucleósido fosforilasa
SOD: superóxido dismutasa
SEM: Microscopía Electrónica de Barrido
Td: timidina
TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión
TFE: tetrafluoroetileno
Tm: timina
TMA: trimetilamonio
UP: uridin fosforilasa
Ura: uracilo
Uri: uridina
XPS: Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X

Objetivos del presente trabajo

El objetivo del presente trabajo de tesis es el desarrollo y estudio de soportes macroporosos para la inmovilización de microorganismos y su potencial aplicación a procesos biocatalíticos y fermentativos.

Para ello se obtuvieron materiales con modificaciones superficiales a partir de dos polímeros disponibles comercialmente, polietileno de alta densidad (HDPE) y fibras de celulosa. Las modificaciones superficiales se consiguieron por técnicas de injerto inducido por radiación y por cationización química. La selección del material más apropiado para inmovilización de células se realizó a partir de la caracterización de los materiales obtenidos como soporte así como el comportamiento funcional del sistema soporte-microorganismo.

El material seleccionado como soporte se estudió en un sistema de fermentación de *L. lactis* para la producción de nisina como sistema modelo. Para ello, en primer lugar se estudiaron las condiciones de producción de *L. lactis* en cultivos *batch* y se diseñó un medio de cultivo basado en componentes de uso industrial de bajo valor agregado. Adicionalmente, se diseñó un método de recuperación del producto desde el medio de fermentación.

Por último, se comparó la fermentación de *L. lactis* en *batch* y en un sistema con células inmovilizadas en un soporte polimérico modificado para la producción de nisina.

Estructura del trabajo

En el presente trabajo de tesis se describen los antecedentes teóricos y el desarrollo experimental realizado para abordar los objetivos generales y específicos propuestos. En el Capítulo 1 se realiza una introducción teórica general sobre los procesos con células inmovilizadas, la obtención de materiales soportes para inmovilización, el proceso de adhesión microbiana a un sólido y las características fisiológicas y metabólicas del microorganismo utilizado y del producto seleccionado para ensayar la obtención de compuestos de interés industrial.

En el Capítulo 2 se presentan los resultados de la obtención de diferentes soportes macroporosos mediante la modificación superficial de materiales disponibles comercialmente. A continuación, en el Capítulo 3 se describen los ensayos de inmovilización celular sobre estos materiales soportes utilizando un microorganismo y una reacción biocatalítica modelo. En esta misma sección se analizan condiciones de optimización de inmovilización y reutilización del biocatalizador inmovilizado y de los soportes, en reacciones a pequeña escala. Por último se analiza el proceso de inmovilización de *L. lactis* sobre los diferentes materiales obtenidos.

Para estudiar las condiciones de producción de nisina por *L. lactis* se diseñó un medio de fermentación basado en suero de ricota y harina de soja que se utilizó para realizar cultivos *batch*, como se describe en el Capítulo 5. El tratamiento de los componentes del medio de cultivo, así como el diseño de

las técnicas de cuantificación de fuente de carbono y energía y de nisina necesarias para el desarrollo de las fermentaciones se detalla en el Capítulo 4.

En el Capítulo 6 se describe una metodología de recuperación de la nisina presente en el medio de fermentación de *L. lactis* por extracción en espuma y un proceso en continuo de producción de nisina utilizando células inmovilizadas en uno de los materiales modificados a tal fin. Por último en el Capítulo 7 se sintetizan las conclusiones generales del trabajo.

INTRODUCCIÓN

A través de la historia del hombre, los microorganismos han tenido una enorme importancia social y económica. Sin conocer aún de su existencia, muy temprano en la historia los hemos utilizado para la producción de alimentos y bebidas. Los sumerios y babilonios practicaban la fabricación de cerveza antes del 6000 AC, la producción de vinagre data de los 2000 AC y aun en *La Iliada* de Homero se menciona el uso de estómago de cabras para la manufactura de quesos (Buchholz *et al* 2005; Liese *et al* 2006).

Sin embargo, la producción de químicos como alcohol o ácidos orgánicos a través de fermentaciones es relativamente nueva y los primeros reportes de literatura recién aparecen en el siglo XIX con el desarrollo de las ciencias naturales modernas. A pesar de que los principios básicos que gobiernan esta biotransformación fueron explicados más de cien años después, en 1823 se utilizaron células de *Acetobacter* adsorbidas en astillas de madera para la producción de ácido acético desde etanol. Posteriormente, en 1833, Payen y Persoz investigaron la acción de extractos de cebada para obtener dextrinas y azúcar a partir de almidón, y formularon algunos principios básicos de la acción enzimática (Buchholz *et al* 2005).

En el siglo XX, luego del descubrimiento de la penicilina, el interés por el desarrollo de procesos biotecnológicos fue estimulado por la necesidad de producir productos químicos a granel, tales como azúcares y aminoácidos, y por el interés en la explotación de microorganismos para producción de compuestos farmacéuticos.

Sin embargo, hace sólo 20 o 30 años que los microorganismos y enzimas han sido reconocidos como soluciones reales para la química sintética en términos de sus capacidades de catalizar reacciones de un solo paso análogas a las reacciones orgánicas estándar. Esta reciente apreciación de las biotransformaciones se deba quizás a tres consideraciones principales. Primero, la necesidad de síntesis de enantió-

meros puros de drogas quirales que ha adquirido importancia en la última parte del siglo XX. Segundo, la presión sobre el sector industrial para la implementación de métodos de síntesis ambientalmente amigables, en consonancia con los doce principios de la química verde. En tercer lugar, que las técnicas de manipulación genética e ingeniería de proteínas se han convertido en técnicas estándar en cualquier laboratorio, pudiendo mejorar sensiblemente las capacidades sintéticas de las enzimas o conseguir nuevas especificidades catalíticas (Grogan 2009).

PROCESOS CON CÉLULAS INMOVILIZADAS

Las biotransformaciones pueden conseguirse utilizando enzimas aisladas, extractos proteicos semipurificados o células enteras. La selección de células enteras se realiza cuando la enzima de interés es inestable en estado aislado, la purificación es compleja, o en los casos donde la generación del producto deseado necesita la acción concertada de varias enzimas o rutas metabólicas y/o requiere la regeneración de cofactores.

Adicionalmente, para que un proceso biotecnológico sea aplicable y competitivo, es necesario obtener altas productividades y para ello es necesario maximizar la cantidad de catalizador presente por unidad de producción. En el caso de procesos utilizando células enteras, existen dos métodos comúnmente usados para incrementar la concentración de biomasa en un reactor, primero el uso de reactores con membranas permeables, y segundo el uso de técnicas de inmovilización (Morikawa *et al* 2006).

Los sistemas con microorganismos inmovilizados pueden utilizarse con células en reposo (*resting cells*) pero capaces de regenerar cofactores, o pueden determinarse condiciones de operación donde es posible el crecimiento. Las células inmovilizadas en crecimiento se aplican cuando el producto de interés es un metabolito de las rutas centrales o cuando la formación o regeneración de las enzimas involucradas es de-

pendiente del crecimiento. Así, la síntesis de compuestos que requieren de secuencias de reacciones complejas, por ejemplo producción de etanol desde azúcar, puede llevarse a cabo únicamente por microorganismos viables capaces de sintetizar las enzimas y regenerar los cofactores necesarios (Buschhloz *et al* 2005).

Tabla 1.1
Aplicaciones de procesos con células inmovilizadas (adaptado de Junter 2004)

Biosíntesis, Bioconversiones	
Enzimas	α-amilasas, celulasa y otras enzimas celulíticas, ciclodextrinas, glucosiltransferasa, L-glutaminasa, inulasa, lipasa, penicilin V acilasa, peroxidasas, proteasas, ribonucleasa, xilanasa
Antibióticos	ampicilina, cefalosporina C, ácido clavulánico, ciclosporina A, divercina, nisina Z, penicilina G, rifamicina B
Esteroides	androstenediona, hidrocortisona, prednisolona, progesterona
Aminoácidos	alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, fenilalanina, serina, triptofano
Ácidos orgánicos	ácidos acético, cítrico, fumárico, glucónico, láctico, málico, propiónico
Alcoholes	butanol, etanol, sorbitol, xilitol
Polisacáridos	alginato, dextrano, levano, pululano, exopolisacáridos sulfatados
Otros	pigmentos, vitaminas, sabores y aromas
Medio Ambiente	
Tratamiento de aguas	remoción de: carbono, nitrógeno, metales pesados (Au, Cd, Cu, Ni, Pb, Sr, U); biodegradación de polutantes (compuestos fenólicos, aromáticos policíclicos, heterocíclicos, compuestos de cianuro, surfactantes, hidrocarburos y derivados del petróleo)
Biofertilización	inoculación de suelos con microorganismos promotores del crecimiento de plantas (*Azospirillum brasilense, Glomus deserticola*)
Biorremediación	degradación de polutantes en suelos contaminados (fenoles clorados), hábitat acuíferos y marinos (hidrocarburos) por inóculos microbianos
Combustibles alternativos	producción de hidrógeno y metano, etanol y biocombustibles
Procesamiento de Alimentos	
Bebidas alcohólicas	producción de cerveza, vinos y sidras, generación *in situ* de saborizantes
Productos lácteos	inoculación continua de leche, hidrólisis de lactosa en suero de leche
Biosensores	
Electroquímica	detección de ácido acético, aminoácidos, BOD, cianuro, colesterol, compuestos alifáticos clorados, etanol, naftaleno, compuestos fenólicos nitrados, fosfato, piruvato, azúcares, ácido sulfúrico, ácido úrico, herbicidas, pesticidas, vitaminas, ensayos de toxicidad
Óptica	detección de herbicidas, metales, compuestos poliaromáticos y testeo de toxicidad

En 1983 Gestrelius reportó la primer bioconversión utilizando células enteras no viables inmovilizadas como catalizador (Gestrellius 1983). Desde ese momento, los procesos con células inmovilizadas se constituyeron en un área en continua expansión.

Actualmente, estos sistemas se aplican para la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos, desde metabolitos primarios a biomoléculas de alto valor agregado en las más variadas industrias, desde la farmacéutica y alimentaria hasta el desarrollo de biosensores para monitoreo ambiental (Tabla 1.1).

Los procesos con células inmovilizadas equivalen a un bioreactor multienzimático y poseen numerosas ventajas comparados con los procesos tradicionales con células en suspensión: alta densidad celular y productividad volumétrica, alta estabilidad física y biológica en procesos de larga duración, baja incidencia de pérdida de plásmido, aumento en la resistencia a contaminaciones y posibilidad de desacoplar la producción de biomasa y metabolitos, entre otras.

Ventajas de los procesos con células inmovilizadas

Mayores densidades celulares por unidad de volumen de reactor. Las células inmovilizadas pueden retener la capacidad de multiplicarse mientras permanecen confinadas y, en presencia de los nutrientes necesarios, colonizar la superficie disponible del soporte. Una mayor densidad celular tiene como consecuencia mayores velocidades de reacción, mayor productividad volumétrica y menores tiempos de proceso (Junter *et al* 2004). Para procesos con células inmovilizadas en condiciones de no crecimiento se pueden obtener altas densidades celulares maximizando la carga microbiana durante el proceso de inmovilización.

Mejor rendimiento en operaciones en continuo. El uso de células inmovilizadas asegura una eficiente retención de biomasa durante procesos operados en continuo, minimizando el lavado (*wash out*) a altas velocidades de dilución (Nicolella *et al* 2000). Por otro lado, la inmovilización también aumenta la estabilidad de plásmidos durante procesos operados en continuo (Doleyres *et al* 2004).

Simplificación del proceso. La posibilidad de separar fácilmente la biomasa del medio de reacción, simplifica los pasos de recuperación del producto (Junyan *et al*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2006). En consecuencia, se logra una reducción en el tiempo de proceso, costos de equipamiento y demanda energética.

Posibilidad de reutilización. El biocatalizador con células inmovilizadas puede utilizarse en múltiples procesos sucesivos y aun con períodos intermedios de almacenamiento. Esto reduce los costos del proceso. La reutilización, además de involucrar la estabilidad operacional del inmovilizado, depende de la resistencia química y mecánica del soporte utilizado.

Mayor estabilidad operacional y de almacenamiento. Esta característica es una de las principales ventajas, dado que un aumento en la estabilidad permite poseer biocatalizadores con mayor vida útil. Los soportes para la inmovilización podrían actuar como protectivos ante efectos adversos provocados por pH, temperatura, solventes o metales pesados. La inmovilización confiere además una tolerancia superior a altas concentraciones de sustrato y una menor sensibilidad a la inhibición por producto final. Para explicar este aumento en la estabilidad biológica se propusieron varias hipótesis (Dervakos *et al* 1991). Trabajos sobre el comportamiento de *K. marxianus* proponen que el *stress* osmótico causado por el procedimiento de inmovilización conduce a la producción de compuestos reguladores de la presión, como polioles, que descienden la actividad del agua y desarrollan una mayor tolerancia a compuestos tóxicos (Norton *et al* 1994). Adicionalmente, levaduras y bacterias del género *Bacillus* muestran mayor viabilidad y estabilidad térmica a condiciones de congelamiento y congelamiento-secado cuando se encuentran inmovilizadas (Lodato *et al* 1999).

Métodos de inmovilización de células

La inmovilización se define como *el proceso por el cual se restringe, total o parcialmente, los grados de movimiento de enzimas y células por asociación a un soporte* (Taylor 1991). Los sistemas con células inmovilizadas pueden clasificarse en dos grandes grupos: naturales y artificiales.

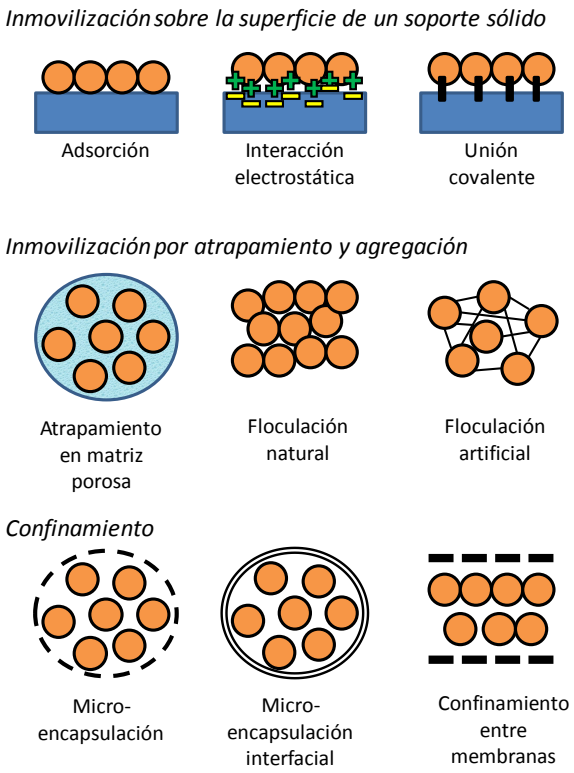


Figura 1.1
Métodos básicos de inmovilización celular (adaptado de Kourkoutas et al 2004)

La adsorción espontánea de células a diferentes tipos de materiales constituyen los *sistemas naturales*, en los cuales las células se unen por interacciones no específicas débiles. En condiciones ambientales apropiadas, este primer paso de asociación puede conducir a la colonización del soporte y la formación de un *biofilm*. Las células permanecen confinadas en una matriz de polímeros extracelulares que ellas mismas excretan, siendo esta asociación más firme que la esperada por adsorción simple.

Para células con pobres características adhesivas o de floculación existen numerosas técnicas de inmovilización *artificiales*. En base a los mecanismos físicos involucrados, pueden dividirse en cuatro grandes categorías: unión o adsorción a una superficie, atrapamiento en una matriz porosa, autoagregación y confinamiento por barreras (Pilkington *et al* 1998) (Fig. 1.1).

Inmovilización superficial sobre soportes sólidos. La inmovilización sobre una superficie se puede conseguir por adsorción o por unión covalente.

La adsorción de células o enzimas puede conseguirse por diferentes tipos de interacciones, que dependerán de los grupos funcionales de la superficie bacteriana (o de los residuos expuestos de la enzima) y de los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte. De acuerdo a esto, las interacciones se pueden clasificar en no-específicas (fuerzas de *van der Waals*, enlaces de hidrógeno), electrostáticas (o interacciones iónicas), de afinidad (por ejemplo unión a metales o colorantes), bioespecíficas e hidrofóbicas (Cao 2005). La asociación a través de interacciones no específicas parece depender de numerosas propiedades fisicoquímicas del soporte y la célula, tales como carga e hidrofobicidad, y del medio de suspensión, como la fuerza iónica (Hermansson 1999). El método presenta ciertas ventajas importantes para la inmovilización de células como la simplicidad de la técnica, y que se realiza en condiciones muy suaves de reacción, minimizando alteraciones en su fisiología y/o actividad catalítica (Pramod *et al* 2008).

La fuerza de la interacción así como el espesor del *biofilm* varía con cada sistema célula-soporte. Se reportaron *biofilms* bacterianos de más de 1 mm de espesor (Kourkoutas *et al* 2004). Debido a que no existen barreras entre la célula y la solución, y que las fuerzas que median la interacción son débiles, es posible el establecimiento de un equilibrio entre células libres e inmovilizadas en determinadas condiciones de operación.

Una amplia variedad de soportes, como madera, vidrio, cerámica y materiales plásticos, pueden utilizarse para inmovilizar por adsorción diferentes tipos celulares, aunque algunos de ellos pueden requerir modificaciones químicas para aumentar su capacidad de adsorción (Norton *et al* 1994).

La inmovilización por *unión covalente* se basa en la reacción química entre un grupo funcional de superficie de la célula o enzima y un grupo funcional reactivo presente sobre la superficie del soporte (Blanco 2004). De acuerdo a las identidades químicas de los dos grupos reaccionantes, los tipos de unión más importantes se pueden clasificar en: diazotización, formación de enlaces peptídicos, alquilación/arilación,

formación de bases de Schiff, amidinación, reacción de intercambio tiol-disulfuro, y oxidación (Cao 2005). La inmovilización por unión covalente se utiliza ampliamente para enzimas y otras biomoléculas. En el caso de inmovilización de células por esta técnica, en general no se obtienen buenos rendimientos, posiblemente debido a la desestabilización de la pared y/o membrana celular.

Atrapamiento en una matriz porosa. Por definición el atrapamiento se refiere al proceso por el cual las enzimas y/o células se incluyen en una matriz formada por un proceso químico o físico, como entrecruzamiento o gelificación respectivamente. En general el atrapamiento se realiza durante el proceso de inmovilización, por lo que la fracción biocatalítica a inmovilizar debe ser compatible químicamente con los precursores utilizados para formar la matriz.

En el atrapamiento por procesos físicos las enzimas o células se mezclan de manera homogénea con la solución del polímero y la formación del gel se consigue por cambios en la temperatura (como en el caso de agar o agarosa) o por gelificación ionotrópica (por ejemplo alginatos en presencia de iones Ca^{+2} o Ba^{+2}) (Park *et al* 2000).

Por otro lado, en el atrapamiento por polimerización la matriz se produce por unión química entre monómeros. En este caso, las células o enzimas se mezclan con una solución de monómeros y el atrapamiento se logra por la adición de un iniciador de polimerización. Un ejemplo de este tipo de inmovilización es la formación de geles de poliacrilatos (Betigeri *et al* 2002).

Debido a que las condiciones de formación de las matrices son usualmente suaves, el atrapamiento es una técnica muy utilizada para la inmovilización, en particular de células enteras.

En esta clase de inmovilizaciones es posible aumentar la carga microbiana por incubación en medios ricos. El crecimiento celular dentro de la matriz depende princi-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

palmente de limitaciones difusionales impuestas por la porosidad del material y en última instancia de la biomasa acumulada (Kourkoutas *et al* 2004).

La presencia de un gradiente de difusión de sustrato a través de la matriz produce un patrón heterogéneo de población microbiana (Huang *et al* 1998). Las células ubicadas sobre la superficie externa de la matriz disponen de sustratos y nutrientes presentes en el medio de reacción sin barreras difusionales y pueden multiplicarse y liberarse al medio líquido constituyendo un sistema de células en equilibrio libre-inmovilizado (Tanaka *et al* 1989).

Entre las matrices utilizadas se encuentran agar, alginato, carragenano, celulosa y sus derivados, colágeno, gelatina, resinas epoxi, resinas fotoentrecruzantes, poliacrilamida, poliéster, poliestireno, poliuretano y polivinilalcohol (Park *et al* 2000).

Agregación. La floculación se define como la agregación de células para formar una unidad de mayor tamaño. La habilidad de formar agregados se observa principalmente en hongos, mohos y células vegetales. Para los cultivos que no floculan naturalmente, se utilizan agentes químicos de entrecruzamiento como el glutaraldehído y la bis-diazobifenilamina (Junyan *et al* 2006). Esta técnica se utiliza en general con células no viables y se pueden elaborar biocatalizadores en forma de polvo, bolillas o espumas altamente porosas (Marolia *et al* 1993).

Contención mecánica por barrera. El confinamiento por barreras se puede realizar mediante tres estrategias: uso de membranas microporosas, atrapamiento en microcápsulas o interacción de superficie entre dos líquidos inmiscibles. Este tipo de inmovilización suele utilizarse cuando se requiere baja transferencia de masa y productos libres de células (Park *et al* 2000).

Características deseables de un soporte para inmovilización

Uno de los obstáculos más importantes para la implementación de cultivos con células inmovilizadas a escala industrial consiste en las limitaciones de transferencia de masa dentro del biocatalizador. La dificultad en el transporte pasivo de sustratos y

productos puede generar microambientes no controlados contraproducentes para la célula. Estos efectos pueden causar bajas velocidades de crecimiento y/o conversiones menores respecto a las de células libres. Por lo tanto, la selección del soporte a utilizar y la metodología de inmovilización son aspectos cruciales en el desarrollo de biocatalizadores con células inmovilizadas.

Un soporte adecuado para la inmovilización de células debe poseer algunas características distintivas que se describen a continuación (Freeman 1984, Martin 1991, Junyan *et al* 2006):

(i) *Gran superficie, con grupos funcionales accesibles para interaccionar con las células.* Debe tener una aceptable relación área superficial/volumen para inmovilizar mayor densidad celular en el menor espacio. Esto permitiría operar con reactores de menor tamaño y reducir costos de equipamiento y consumo de energía. Adicionalmente, la presencia de grupos funcionales que le aporten cargas y/o grupos específicos capaces de interaccionar con la superficie celular mejorarían el rendimiento de la adhesión y estabilizarían la biomasa en condiciones de operación.

(ii) *Debe poseer la geometría y tamaño apropiado para poder separarlo fácilmente del medio de reacción.* Asimismo, es deseable que sea posible su regeneración para disminuir los costos de producción.

(iii) *Estable mecánica, química, térmica y biológicamente*. El soporte debe ser inerte, atóxico para la célula a inmovilizar y resistente a las condiciones de operación, lavado y/o sanitización. Para asegurar su uso por períodos prolongados, no debe ser sustrato de la célula inmovilizada.

(iv) *Porosidad uniforme*. La porosidad del material utilizado como soporte para inmovilización debe permitir la contención de la célula y a su vez, el transporte pasivo de compuestos de bajo peso molecular. La uniformidad en la geometría del material permite un diseño racional del biocatalizador, la predicción de la carga bacteriana y en consecuencia una mejora en los rendimientos del proceso.

(v) *Económico, accesible y fácil de escalar.* El costo del soporte en muchos casos limita el rango de aplicación de biocatalizadores con células inmovilizadas. Además, el soporte elegido debe estar disponible en calidad y cantidad ade-

cuada para su aplicación a escala productiva. Por otro lado, las características físicas y la geometría del soporte deben permitir un escalado sencillo.

(vi) *Inerte e inocuo.* Además de no afectar la actividad de las células inmovilizadas, no deben liberar o generar compuestos que se constituyan en contaminantes del producto final de la reacción. Por último, para aplicaciones en alimentos debe poseer características de grado alimentario.

POLÍMEROS FUNCIONALIZADOS PARA INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS

Los polímeros, ya sean naturales o artificiales, son los materiales preferidos como soportes para inmovilización, dado que se encuentran presentes comercialmente en cantidad y calidad, y presentan ciertas propiedades deseables para la aplicación, como ser elasticidad, resistencia química y mecánica, conductividad y degradabilidad. Como se mencionó anteriormente, numerosos polímeros son inertes y pueden requerir modificaciones químicas superficiales para utilizarlos como soportes para inmovilización. El tipo de modificación necesaria depende principalmente del material a utilizar como soporte y del tipo de interacción soporte-célula que se desee.

La funcionalización más simple consiste en la introducción de grupos reactivos sobre la superficie del material soporte capaces de interaccionar directamente con la célula.

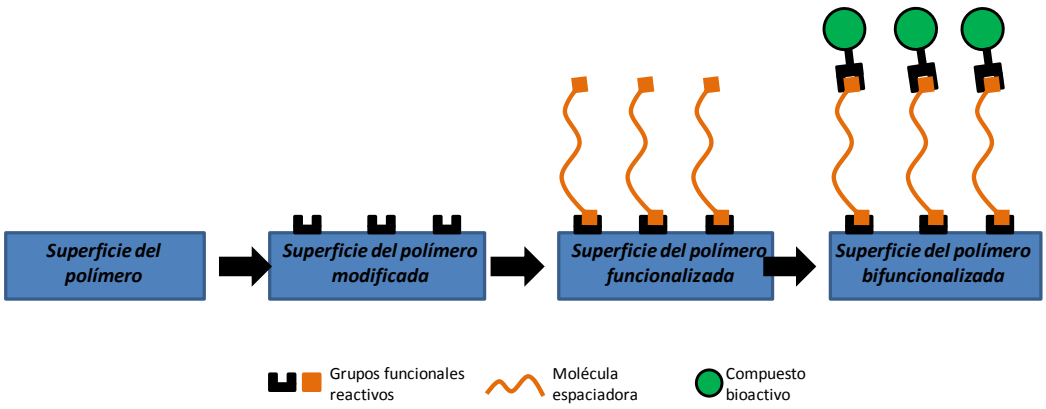


Figura 1.2
Estrategias de funcionalización de polímeros para inmovilización de células (adaptado de Goddard et al 2007)

En los casos en que la funcionalización no genere suficientes grupos de anclaje, o el biocatalizador pierda actividad por adsorción a una superficie hidrofóbica, puede ser necesario incorporar un compuesto intermediario o molécula espaciadora (Goddard *et al* 2007). Por ejemplo, el ácido acrílico puede polimerizar sobre superficies de polímeros inertes para generar un polímero aniónico, al que pueden unirse PEI o quitosano, incrementando la funcionalidad de la superficie polimérica por incorporación de aminas primarias (Cheng *et al* 2004, Wang *et al* 2001). La utilización de moléculas hidrofílicas como espaciador, por ejemplo polietilenglicol (PEG), puede evitar la desnaturalización del biocatalizador e inclusive mejorar su actividad (Moskovitz *et al* 2005, Okamura *et al* 2005).

Adicionalmente, se puede introducir un compuesto bioactivo a la molécula espaciadora, para lograr la unión específica a componentes de la superficie celular. Un esquema básico de estos tipos de modificaciones se muestra en la Fig. 1.2.

Técnicas de modificación de superficies poliméricas

Existen numerosas técnicas de modificación y funcionalización de superficies, derivadas de diferentes industrias como biomédicas, textiles, microelectrónica y de embalajes para alimentos. Se pueden clasificar en tres grupos principales: modificación química húmeda, química de silanos y modificación por radiaciones ionizantes. Esta última clase se clasifica a su vez en radiaciones de alta y baja energía, de acuerdo a la especie ionizante involucrada (Fig. 1.3).

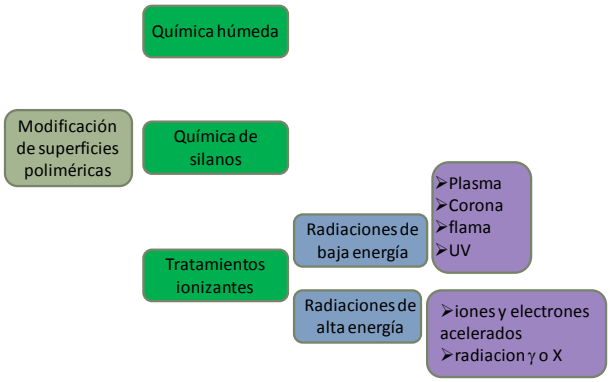


Figura 1.3
Métodos de modificación de superficies poliméricas

Modificación química "húmeda". En la modificación química húmeda, el material se trata con reactivos químicos líquidos para generar un grupo funcional reactivo sobre la superficie. Es un método simple

y posee buena capacidad de penetración en materiales macroporosos. Por ejemplo, se pueden incorporar grupos con oxígeno reactivo a polietileno (PE) y polipropileno (PP) por tratamiento con ácido crómico y permanganato de potasio en ácido sulfúrico (Tao *et al* 2001, Sheng *et al* 1995). Sin embargo esta metodología presenta ciertas desventajas. Como se trata de un método no-específico, produce una variedad de compuestos oxigenados. El grado de funcionalización no es reproducible con polímeros de diferente peso molecular o cristalinidad. Adicionalmente, este método requiere tratamientos extendidos en soluciones corrosivas concentradas y genera desechos químicos peligrosos, por lo que existe una tendencia a dejar de utilizarlo para escala industrial.

Química de silanos. La inmovilización de organosilanos a superficies se utiliza para acoplar un polímero orgánico a un sustrato inorgánico, por ejemplo para promover la adhesión entre vidrio y polímeros en el desarrollo de polímeros reforzados (*fiberglass*). Los silanos con vinilos y bromuros terminales se modifican posteriormente por reacciones químicas húmedas para generar grupos funcionales ácidos, aminas e hidroxilos. Debido a su organización casi cristalina, ofrecen el potencial de una funcionalización superficial más homogénea que las obtenidas por modificación química húmeda. Sin embargo, la unión del siloxano puede hidrolizarse a altas temperaturas o por pH alcalino. A pesar de que esta técnica se aplica principalmente para la inmovilización de sustratos inorgánicos, es un campo emergente para la modificación superficial de polímeros para biocatálisis (Goddard *et al* 2007).

Tratamientos ionizantes. Las radiaciones ionizantes son capaces de modificar la estructura de los materiales y en particular de los polímeros, generando deficiencias electrónicas (excitaciones e ionizaciones). Las fuentes de radiación ionizante pueden ser de naturaleza corpuscular (a, β, protones, electrones, neutrones o iones acelerados) o de naturaleza electromagnética (rayos γ o X).

(i) *Plasma.* Se denomina plasma al estado de alta energía de la materia, en la cual un gas se ioniza parcialmente en partículas cargadas, electrones y

moléculas neutras. El plasma puede generar modificaciones en la superficie de un polímero en el orden de los nanómetros sin utilizar solventes (Dinklage *et al* 2005). El tipo de funcionalización puede variar con la elección del gas a utilizar (Ar, N_2, O_2, H_2O, CO_2, NH_3) y de los parámetros de operación. El plasma de oxígeno se utiliza para generar grupos funcionales oxigenados en superficies poliméricas tales como policaprolactona (PCL), PE y polietilentereftalato (PET), y el plasma de dióxido de carbono para introducir grupos carboxílicos en PP, PE y poliestireno (PS). Adicionalmente los plasmas de nitrógeno y amonio permiten la incorporación de grupos amino a politetrafluoroetileno (PTFE) y PS respectivamente (Roosjen *et al* 2004).

(ii) *Descarga corona.* La descarga corona consiste en un proceso continuo simple y de bajo costo en el cual se bombardea una superficie polimérica con una corriente de aire ionizado. Este método se utiliza comercialmente para mejorar el estampado y adhesión a polímeros inertes por introducción de oxígeno en la superficie (Desai *et al* 2004). Como los materiales se modifican con un patrón heterogéneo de compuestos oxidados, en general no se utiliza para incorporar funcionalidades específicas.

(iii) *Tratamiento de flama.* Como la técnica anterior, se trata de un método de funcionalización no-específica. Consiste en el bombardeo de la superficie con aire ionizado, para generar un amplio espectro de productos de oxidación. En este caso, el oxígeno reactivo se produce por combustión de una mezcla gaseosa rica en oxígeno. Se utiliza para incorporar grupos funcionales hidroxilos, aldehídos y ácidos en PE para mejorar la adhesión, estampado y humectación de hilados (Briggs *et al* 2003).

(iv) *Radiación ultravioleta.* La exposición de una superficie polimérica a radiación UV provoca la generación de sitios reactivos que pueden transformarse en grupos funcionales por exposición a un gas o por polimerización por injerto. Esta técnica difiere de los tratamientos con gases ionizantes en que

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

es posible regular la profundidad de la reactividad superficial variando la longitud de onda (Chan *et al* 1996). Se utiliza para introducir grupos carboxílicos en polimetilmetacrilato (PMMA) (Situma *et al* 2005), activación de PS para inmovilización de enzimas (Nahar *et al* 2004) y en ingeniería de tejidos (Welle *et al* 2005).

(v) *Radiaciones electromagnéticas de alta energía.* El uso de radiaciones ionizantes para generar nuevos materiales se basa en la habilidad única de estas radiaciones para iniciar radicales libres sin el agregado de un catalizador o calor (Lee *et al* 1996, Terada *et al* 2004). Las radiaciones ionizantes más utilizadas son los rayos γ (Grasselli *et al* 1999), los electrones acelerados (Kim *et al* 2000, Chmielewski 2004) y los iones pesados acelerados (Mazzei *et al* 2006). El flujo de partículas energéticas produce la ionización y excitación del material irradiado con la consecuente formación de iones, electrones, radicales y/o estados excitados. Se pueden conseguir modificaciones químicas por exposición del material activado por radiación a una solución de monómeros. Como resultado, el monómero forma un injerto de polímero sobre la superficie del material.

Modificación de polímeros por injerto inducido por radiación γ

La tecnología de injerto inducido por radiación puede generar radicales altamente reactivos e iniciar subsecuentemente la polimerización y extensión de largas cadenas de injerto sobre materiales poliméricos inertes como el PE. Considerando que se dispone comercialmente de una vasta gama de polímeros en composición, geometría y tamaños, es posible obtener nuevos polímeros a partir de un proceso simple, sin agregado de aditivos y a temperatura ambiente. Adicionalmente, la radiación ofrece la potencialidad de esterilizar el material en simultáneo al proceso de modificación (Hoffman 1982).

Fundamento de la modificación. La radiación γ está constituida por fotones de alta energía, con mayor poder de penetración pero menor poder de ionización que

las partículas a y β. El átomo de ^{60}Co se descompone radioactivamente a un átomo estable de ^{60}Ni liberando en el proceso de decaimiento dos rayos γ, uno de 1,33 MeV y otro de 1,17 MeV de energía. A los fines prácticos, se considera que la energía de la radiación es el promedio de ambos (1,25 MeV), con un tiempo medio de decaimiento de 5,3 años. La máxima velocidad de dosis que se puede alcanzar con rayos γ, en cualquier distribución de fuentes no superará los 20 kGy/hora (Carbajal 2008).

La forma de interacción predominante de la irradiación γ con materiales orgánicos es la dispersión de Compton. En este caso la radiación electromagnética interacciona elásticamente con un electrón. Parte de la energía del fotón se transfiere generando la expulsión del electrón del átomo blanco y la energía remanente se libera como un nuevo fotón, de menor energía y con dirección distinta de la radiación incidente.

Tanto el electrón como el fotón producidos, interactúan con el material polimérico dando lugar a dos procesos, uno de ionización y otro de excitación. En el caso de la ionización, el electrón Compton transfiere energía suficiente a un electrón orbital de otro átomo como para ser expulsado, dejando un catión. Si la energía transferida es insuficiente para provocar la expulsión de un electrón, el átomo queda en un estado excitado de energía. Los iones y moléculas excitadas son muy reactivos y pueden reaccionar con otros materiales presentes en el sistema o descomponerse en radicales libres, átomos o moléculas neutras.

Métodos de injerto por radiaciones. Existen varios métodos de modificación química de polimerización por injerto. Estos se pueden agrupar en método por preirradiación en aire o vacío y directo.

(i) *Pre irradiación en vacío.* En ausencia de aire, los radicales formados por irradiación en vacío o en un gas inerte quedan atrapados en el sistema pudiendo permanecer "activos" por un tiempo considerable a bajas temperaturas, para luego actuar como iniciadores de poli-

merización. El monómero, en una incubación posterior, difunde en el polímero e interactúa con los radicales atrapados. Esta técnica en dos etapas requiere elevadas dosis de energía, en el orden de los 200 KGy, y se aplica principalmente a polímeros con alto grado de cristalinidad, donde los radicales libres tienen una mayor vida media.

(ii) *Pre- irradiación en aire*. Al preirradiar el polímero en presencia de oxígeno o aire, se generan grupos peróxidos e hidroperóxidos que posteriormente pueden funcionar como iniciadores de polimerización. Los peróxidos se descomponen térmicamente liberando radicales libres en presencia del monómero y ausencia de aire. Por lo tanto, este método es aplicable a polímeros termoestables.

(iii) *Método Directo o Simultáneo.* El método consiste en la irradiación de un polímero en presencia de un monómero y en ausencia de aire. El copolímero por injerto se inicia por radicales libres generados sobre el polímero. Pueden sintetizarse varias clases de copolímeros, ya sea por el agregado de un solo tipo de monómero o por una mezcla de ellos (Fig. 1.4). Este método presenta dos ventajas importantes: requiere bajas dosis de energía (2-20 kGy) y consiste en un proceso de una etapa. La técnica en simultáneo requiere radiación durante todo el proceso de injerto, y aunque las dosis de energía son menores con respecto a los métodos indirectos, los rendimientos en injerto son mayores debido a que no se pierden radicales libres a través de reacciones de descomposición (Dargaville *et al* 2003).

Como la radiación ionizante no es selectiva, es necesario considerar su efecto sobre todos los componentes del sistema: polímero, monómero, y solvente. La dosis y velocidad de dosis de radiación son importantes para cualquier sistema de injerto. La densidad y longitud de las cadenas injertadas se pueden controlar por medio de dos

parámetros: el tiempo de exposición del material a la radiación ionizante y la duración del tratamiento del material irradiado con el monómero (Kawai *et al* 2003).

La polaridad del solvente puede favorecer el contacto entre el polímero y el monómero, incrementando la velocidad de iniciación debido a la transferencia de energía o a reacciones de radicales libres del solvente.

La temperatura posee un efecto complejo, debido a que afecta a la velocidad de difusión del monómero, y la solubilidad y movilidad de los radicales, influyendo en las cinéticas de transferencia y terminación de las cadenas en propagación.

Características de los injertos sintetizados por radiación. Se pueden incorporar una

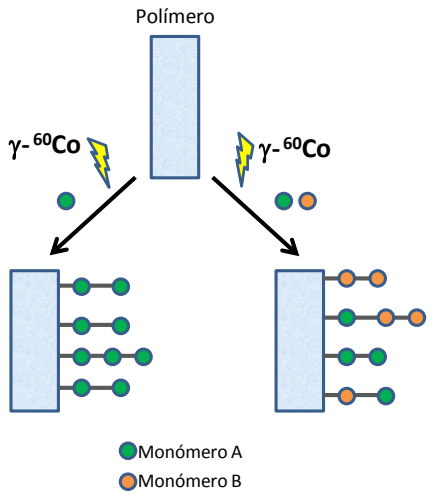


Figura 1.4
Reacción de polimerización por injerto simultáneo (Adaptado de Carbajal 2008)

amplia variedad de especies activas biológicamente en o sobre materiales poliméricos procesados por radiación. Tales especies están usualmente presentes en soluciones acuosas, por lo tanto, los monómeros y polímeros involucrados en la inmovilización deben tener un carácter predominantemente hidrofílico (Hoffman 1982).

Los geles poliméricos hidrofílicos, o hidrogeles, se reportaron por primera vez como materiales biocompatibles en 1960. Estos geles pueden absorber grandes cantidades de agua, desde un 30 a 95%, y por lo tanto poseen baja resistencia mecánica. Por ello, la polimerización por injerto de monómeros hidrofílicos sobre soportes sólidos

hidrofóbicos busca combinar las características biocompatibles del hidrogel con la resistencia mecánica del polímero.

Se pueden preparar hidrogeles neutros, aniónicos o catiónicos, con diferente contenido de agua, por selección del tipo y concentración de monómero. Los monómeros se clasifican en cinco tipos generales: hidrofílicos, aniónicos, catiónicos, hidrofóbicos y entrecruzantes. Mezclas entre ellos permiten obtener injertos con diferentes características de hidrofilicidad, acidez y contenido en agua.

Los hidrogeles pueden ser modificados químicamente en un paso de reacción posterior al injerto en el polímero soporte. Esta funcionalización permite mejorar las propiedades de adhesión bacteriana (Terada *et al* 2005, Trelles *et al* 2008). La funcionalización con grupos cargados positivamente como el dietilamina (DEA) o etilenamina (EA) hacen posible la inmovilización de bacterias (Lee *et al* 1996), mostrando que la inmovilización de células en hidrogeles se produce principalmente por interacciones electrostáticas (Walker *et al* 2005).

Estudio y caracterización de soportes para inmovilización

No sólo es importante determinar la actividad y cantidad del biocatalizador inmovilizado, sino que es necesario evaluar la modificación introducida sobre los soportes a ensayar. Las herramientas utilizadas para la caracterización de los soportes modificados para inmovilizar células dependen de la naturaleza de la modificación y la especificidad requerida. Se pueden clasificar en dos grandes grupos, espectroscópicos y no-espectroscópicos.

A. Métodos no espectroscópicos

Método gravimétrico. Este método es una manera simple y rápida de medir la extensión de la modificación. Simplemente consiste en la diferencia porcentual del peso pre y postratamiento.

Determinación de grupos epóxido. El ácido iminodiacético (IDA) es un grupo quelante tridentado que forma complejos ternarios con iones metálicos de la primera serie de transición. La adición de IDA en el copolímero injertado permite el análisis cualitativo y cuantitativo de la cantidad de epóxidos disponibles por reacción de complejación del IDA con Cu (II) (Camperi *et al* 1998, Carbajal *et al* 2003).

Ángulo de contacto. Este método consiste en la estimación del grado en el que una gota de agua se extiende sobre una superficie. El grado de extensión de la gota se relaciona con la hidrofilicidad de la superficie analizada; a menor ángulo de contacto mayor hidrofilicidad del material (Extrand 2004). A pesar de que es un método simple, deben ajustarse parámetros operativos para asegurar medidas reproducibles, como pH y dureza del agua, temperatura y humedad ambiente. Por ello, es conveniente utilizar este tipo de ensayos sólo para una evaluación cualitativa.

Adsorción de colorantes. Existe una variedad de compuestos que forman complejos con grupos funcionales en razones estequiométricas definidas. Por ejemplo, los ácidos carboxílicos pueden cuantificarse por unión a Toluidine Blue O, Rodamina o Verde de Bromocresol; mientras que las aminas primarias pueden detectarse por reacción con ácido pícrico, fluorescamina o ninhidrina (Goddard *et al* 2007).

La cuantificación de los colorantes adsorbidos presenta varios inconvenientes, tales como dificultad en el control del pH en los pasos de adsorción y desorción. Además, en estos ensayos no siempre es posible diferenciar si el colorante asociado al soporte se encuentra interaccionando específicamente con el grupo funcional incorporado o en la doble capa iónica. Por ello, estos ensayos se utilizan para análisis cualitativos.

Adsorción de proteínas. Es posible la cuantificación de proteínas adsorbidas a una superficie por determinación indirecta usando métodos corrientes, tales como Bradford, Lowry o Ácido Bicinconínico (BCA) (Sapan *et al* 1999). La proteína asociada se estima por el descenso en la concentración de proteínas en la solución de adsor-

ción. Para elegir el método de cuantificación deben tenerse en cuenta la presencia de sustancias interferentes de cada método, como aminoácidos, quelantes y sales, entre otras.

Actividad Biológica. Es posible estimar la capacidad de asociación de un soporte por el ensayo de una actividad biológica estándar, utilizando propiedades conocidas del agente biológico inmovilizado. La actividad del biocatalizador ensayado a menudo es diferente a la desarrollada en suspensión, por lo que los ensayos deben realizarse en estado libre e inmovilizado.

Potencial Z. Cuando una superficie cargada está en contacto con una fase líquida, se desarrolla un potencial eléctrico en la interfase. En consecuencia, se forma una doble capa con grupos ionizables unidos a la superficie y una capa de contraiones en fase líquida débilmente unidos. Esta primer capa, o capa fija, interacciona débilmente con la segunda capa móvil, de carga opuesta y en contacto con la masa líquida. El potencial Z consiste en la diferencia de potencial a través de esta doble capa (Harvey 2000). A pesar de que existen comercialmente dispositivos para medir el potencial Z, sólo es posible realizarlo sobre partículas en suspensión o en membranas y no en materiales poliméricos de mayor espesor.

B. Análisis espectroscópicos y microscópicos

Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). La incidencia de la radiación infrarroja (IR) produce vibraciones, extensiones y contracciones de los enlaces químicos en longitudes de onda definidas, que pueden identificarse por comparación contra patrones de grupos funcionales (Hsu 1997). Es una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para analizar modificaciones de polímeros. El análisis de los espectros resultantes en diferentes pasos de la modificación permite detectar y en muchos casos identificar la incorporación de grupos funcionales en los soportes.

Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Por medio de esta técnica se determina la composición atómica de la capa externa, del orden de los nanóme-

tros, de un sólido. La exposición de una superficie a rayos X produce la emisión de fotoelectrones cuyas energías dependen de la identidad química del elemento de origen y su estado de oxidación. Por lo tanto, por esta técnica puede obtenerse la composición atómica porcentual y la razón estequiométrica (Sabbatini *et al* 1993). Adicionalmente, es posible identificar la presencia de grupos funcionales por el uso de agentes derivatizantes (Chilkoti *et al* 1999). Las muestras a analizar deben tener conductividad eléctrica, por lo que no es una técnica aplicable para el estudio de polímeros.

Espectrometría de masa ToF-SIMS. La técnica ToF-SIMS utiliza la espectrometría de masas para determinar el tipo y cantidad de grupos químicos ionizables en una superficie. Cuando un haz de electrones incide sobre una superficie se produce la liberación de iones secundarios, los que se separan luego según su razón masa/carga en un espectrómetro de masas. El espectro resultante puede indicar la abundancia de las especies químicas presentes. También puede proveer un mapa químico bidimensional para establecer la homogeneidad de la superficie (Sibilia 1988). A pesar de no ser una técnica cuantitativa, puede ser útil para identificar especies químicas, por lo que es complementaria a otras metodologías de análisis.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El bombardeo de una superficie con un haz de electrones de baja energía produce la emisión de electrones secundarios y rayos X. La intensidad de los electrones secundarios emitidos se utiliza para generar una imagen tridimensional de la superficie. Los rayos X generados pueden utilizarse para un análisis elemental complementario (ESCA). Esta técnica se utiliza para examinar la adhesión celular y la topografía de las superficies (Chu *et al* 2009, Terada *et al* 2005, Trelles *et al* 2008).

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). En la AFM es posible determinar la morfología de la superficie en escala atómica. Esto se consigue por la medición de la incidencia de un haz de láser sobre un cantiléver que está en contacto con la mues-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

tra. Se utiliza para construir mapas de la topología del material y determinar parámetros de rugosidad en el orden nanométrico (Alessandrini *et al* 2005).

INTERACCIÓN CÉLULA-POLÍMERO: ADHESIÓN CELULAR A UN SOPORTE SÓLIDO Y FORMACIÓN DE BIOFILM

La adhesión bacteriana a una superficie puede describirse como un proceso en dos etapas: una inicial de interacción física, instantánea y reversible, seguida por una fase a nivel molecular, irreversible y dependiente del tiempo.

Interacciones fisicoquímicas entre bacterias y superficies: primera fase. La adhesión bacteriana a una superficie consiste en la atracción inicial de las células a la superficie seguida por adsorción y fijación (Rijnaarts *et al* 1995). Las bacterias se mueven o son transportadas hacia el soporte a través o por el efecto de fuerzas físicas, tales como movimientos brownianos, fuerzas atractivas de *van der Waals*, fuerzas gravitatorias, carga electrostática e interacciones hidrofóbicas (Gottenbos *et al* 2002).

Las interacciones físicas se clasifican en de *corto y largo alcance*. Las *interacciones de largo alcance* entre células y superficies se describen por fuerzas que son función de la distancia y de la energía libre. Las interacciones de *van der Waals* son apolares mientras que las ácido-base de Lewis son polares y comprenden todas las interacciones electrón-aceptor y electrón-donor (Gottenbos *et al* 2002). Las interacciones de corto alcance se vuelven efectivas cuando la célula y la superficie se encuentran casi en contacto directo (distancias menores a 5 nm) y pueden clasificarse en enlaces químicos (como enlaces de hidrogeno), interacciones iónicas, dipolos e hidrofóbicas (Hayashi *et al* 2001). Las bacterias se acercan a la superficie debido a las interacciones de largo alcance y una vez que toman contacto, las interacciones de corto alcance se vuelven más importantes (Katsikogianni *et al* 2004).

Interacciones moleculares entre bacterias y superficies: segunda fase. En la segunda fase de adhesión, se vuelven predominantes las reacciones moleculares es-

pecíficas entre la célula y la superficie. Esto implica la adhesión irreversible de la bacteria a la superficie por estructuras poliméricas especificas de la superficie bacteriana, como cápsulas, fimbrias o *pili*. Estas estructuras celulares poseen menos radio y por lo tanto menor repulsión, y podrían superar la barrera de energía máxima que separa a la célula y el soporte (Hori *et al* 2010).

Los microorganismos pueden adherirse de dos maneras, ya sea por fuerzas fisicoquímicas genéricas o por medio de estructuras específicas de superficie celulares. La adhesión con estructuras específicas de superficie se basa usualmente en el reconocimiento molecular y tiene lugar sólo en contacto directo. Un organismo primero estará expuesto a fuerzas fisicoquímicas genéricas, descriptas en la primera fase, antes de que las interacciones específicas sean posibles. En situaciones donde no se esperan que medien procesos específicos, las interacciones de largo alcance son las responsables de la adhesión (van Loosdrecht *et al* 1989).

Modelo de adhesión. La interacción entre una célula y una superficie puede describirse mediante la teoría extendida de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Hermansson 1999). La teoría describe la energía de adhesión como un balance entre las fuerzas involucradas:

$$\Delta G_{adh} = \Delta G_{vdW} - \Delta G_{dl} - \Delta G_{AB}$$

Donde ΔG_{vdW} y ΔG_{dl} son las energías libres asociadas a las interacciones de *van der Waals* y electrostáticas respectivamente, y ΔG_{AB} relaciona las energías libres de la interacciones ácido-base. El último término incluye además las interacciones atractivas hidrofóbicas y los efectos repulsivos de hidratación, que son 10-100 veces más fuertes que las interacciones de *van der Waals* entre dos superficies en contacto directo. La teoría DLVO formula que el ΔG_{adh} es una función de la distancia, dada principalmente por las interacciones de *van der Waals* y de doble capa eléctrica, debido a que la energía de interacción ácido-base desciende exponencialmente a medida que se aleja del punto de contacto.

Adhesión reversible e irreversible. La teoría DLVO predice dos distancias de separación en las cuales hay una atracción neta entre una superficie y una bacteria (Fig. 1.5). En primer lugar, hay un mínimo secundario, que es la mayor separación en la cual la bacteria se encuentra débilmente unida a la superficie. Cuando una célula se aproxima a una superficie a distancias entre 5 y 20 nm, la interacción está gobernada por fuerzas atractivas débiles de *van der Waals*. A distancias menores, entre 1 y 5 nm, comienza a haber fuerzas repulsivas significativas debido al solapamiento de las dobles capas eléctricas del soporte y la célula. En este punto, la célula está adherida

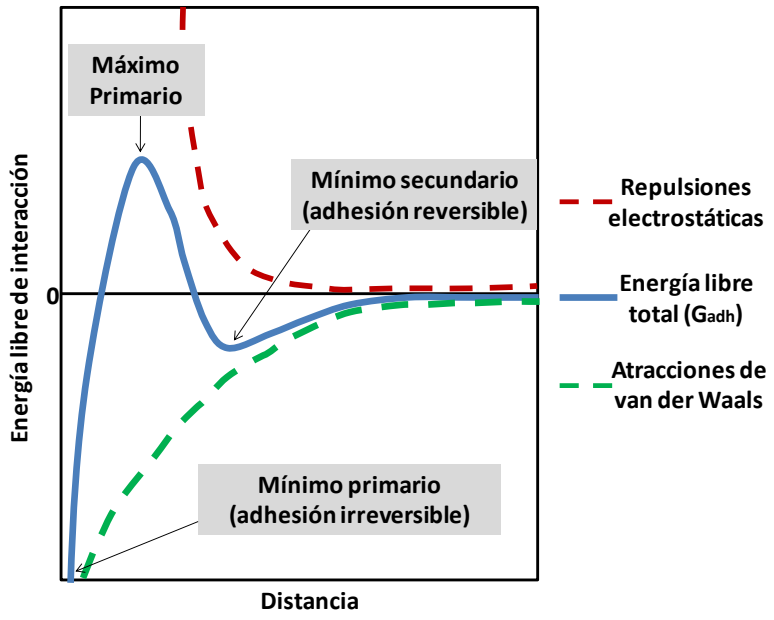


Figura 1.5
Esquema de energía libre de las interacciones según la teoría DLVO para un sistema célula-soporte con igual carga

reversiblemente a la superficie del soporte, y puede ser removida fácilmente por fuerzas de corte. Sin embargo, si la célula es capaz de penetrar la barrera repulsiva, y alcanza distancias cercanas a 1 nm, registra el mínimo primario, y la adhesión está sujeta a fuertes interacciones atractivas de *van der Waals* resultando en una adhesión irreversible. Esto es más probable cuando: (1) la superficie estuviera positivamente cargada, por lo que la interacción electrostática es atractiva; 2) tanto la bacteria como la superficie fueran hidrofóbicas (dando fuertes interacciones de *van der Waals*); 3) existiera una alta fuerza iónica; 4) mediaran apéndices de superficie en la bacteria que

puedan cubrir la distancia entre la célula y la superficie o, 5) la adhesión se mediara por polímeros adherentes que cubren la distancia de separación entre la célula y la superficie (van Loosdrecht *et al* 1989).

Factores adicionales involucrados en la adhesión. La complejidad de la superficie bacteriana, y los cambios que presenta ante diferentes condiciones ambientales, pueden explicar mucha de la variabilidad en las observaciones experimentales (Katsikogianni *et al* 2004).

Superficie microbiana y condiciones de crecimiento. La hidrofobicidad bacteriana es dependiente de la estructura de la pared bacteriana. Generalmente, las bacterias Gram-negativas contienen lipopolisacárido (LPS) en su envoltura celular que atrae una capa de agua, resultando en un alto grado de hidrofilicidad. Contrariamente, las bacterias Gram-positivas no contienen LPS resultando en un alto grado de hidrofobicidad (Li *et al* 2004). La hidrofobicidad en la superficie celular podría minimizar las fuerzas repulsivas presentes durante la interacción con el soporte, favoreciendo la adhesión (Liu *et al* 2004).

Debido a que la membrana externa de Gram negativas posee alto contenido en lípidos y bajo en peptidoglicano, sus propiedades de superficie cambian fácilmente por cambios en el medio circundante. Por otro lado, las bacterias Gram positivas poseen alto contenido en peptidoglicano que las hace resistentes al medioambiente y por lo tanto su superficie es termodinámicamente más estable frente a variaciones del medio (Strevett *et al* 2003).

Estudios sobre la adhesión de células de *E. coli* en diferentes fases del crecimiento indicaron que las células en fase estacionaria son notablemente más adhesivas que en fase exponencial media, dado que las células en pleno crecimiento poseen una distribución de carga más uniforme en la membrana externa resultando en una mayor repulsión electrostática y por consiguiente, menor adhesión (Walker *et al* 2005).

Las macromoléculas responsables de estos fenómenos serían las proteínas unidas a membrana y los grupos funcionales asociados a lipopolisacáridos (Abu-Lail *et al* 2003).

Diferentes condiciones de carbono y nitrógeno rinden diferentes velocidades de crecimiento celular y diferentes propiedades de superficie bacteriana. Por ejemplo, *E. coli* tiene una superficie mas hidrofílica cuando crece limitada en nitrógeno, y menos hidrofílica cuando está limitado en fuente de carbono con respecto a la célula creciendo sin limitación (Strevett *et al* 2003).

Interacciones poliméricas. Las sustancias poliméricas extracelulares, o EPS, son secretadas por los microorganismos durante el crecimiento y consisten en una variedad de sustancias orgánicas como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las EPS juegan un rol significativo en la formación de agregados celulares y en la adhesión, ya que alteran las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular (Rijnaarts *et al* 1993). Ensayos de adhesión a soportes utilizando mutantes de *X. campestris* para la síntesis de xantano, muestran que las EPS podrían tener una función en el proceso de adsorción (Yang *et al* 1998). Un análisis realizado sobre 27 cepas bacterianas utilizadas en tratamientos de aguas residuales muestran una correlación entre contenido de EPS y adhesión, proponiendo un tipo de interacción denominada polimérica que mejora el contacto inicial célula-soporte (Tsuneda *et al* 2003).

pH y fuerza iónica. La concentración de electrolitos como KCl o NaCl y el pH influyen en la adhesión bacteriana por cambios en las características superficiales tanto de la bacteria como de la superficie y afectando, por lo tanto la primer fase de adhesión. El pH y la fuerza iónica del buffer de suspensión influyen en la hidrofobicidad de la superficie celular, siendo significativamente menor a pH altos (7,4) y baja fuerza iónica (0,5M), mientras que es alta a pH ácidos (2,2) y alta fuerza iónica. Se encontraron mayores tasas de adhesión a superficies hidrofóbicas para esta última condición. La estabilización de la adhesión a altas fuerzas iónicas se sugirió que se debe a la supresión de la barrera de solvatación y a la reducción de las interacciones electrostáticas repulsivas (Katsikogianni *et al* 2004).

Condiciones de operación. Las condiciones de flujo se consideran dominantes para el número de células adheridas. Se considera en general que altas fuerzas de corte resultan en un descenso en el número de células adheridas. Existe una fuerza de corte óptima para adhesión de la bacteria reflejando un balance entre la desorción y la fuerza actuante en la adhesión. Existen evidencias que indican que las bacterias en suspensión responden a las fuerzas de corte modificando su velocidad de crecimiento, morfología, tamaño o densidad celular y metabolismo. La reducción en el rendimiento de biomasa junto con un aumento en la actividad catabólica sugiere que podría ocurrir una disociación de catabolismo y anabolismo a altas fuerzas de corte (Liu *et al* 2002).

En general las fuerzas de corte necesarias para la fase de adhesión difieren en un orden de magnitud de la necesaria para desorber la célula de la superficie. La fuerza de corte necesaria para la separación de la célula adherida incrementa con el tiempo de incubación hasta un valor máximo, sugiriendo que se forman interacciones adicionales progresivamente luego de la adhesión inicial (Ming *et al* 1998).

Rugosidad de superficie. La teoría DLVO asume que la superficie del soporte es perfectamente lisa. Se ha encontrado que las irregularidades en la superficie del soporte promueve la adhesión bacteriana, mientras que superficies lisas no favorecen la adhesión. Una superficie rugosa posee mayor área y las depresiones proveen ambientes más favorables para la colonización, dado que incrementa el área de contacto y protegen a la célula de las fuerzas de corte (Katsikogianni *et al* 2004).

Fenotipos de suspensión, adherencia y biofilm. Una hipótesis para explicar las diferencias entre el comportamiento de una célula en suspensión y una inmovilizada se basa en la existencia de fenotipos de adherencia y biofilm. Las células en estos "estadíos" presentan patrones de expresión génica alterada con respecto al microorganismo en suspensión (Loo *et al* 2000, Whiteley *et al* 2001, Schembri *et al* 2003). Estudios de proteómica sobre células libres e inmovilizadas por adsorción y atrapamiento, mostraron que la metodología de inmovilización también produce expresiones diferenciales y

refuerza la suposición de que el microorganismo despliega un comportamiento fisiológico específico en estado inmovilizado (Vilain *et al* 2004).

Se identificaron tres clases de proteínas detectadas diferencialmente en células inmovilizadas. La primer clase involucra proteínas de membrana, que parecen influir en la unión y desarrollo temprano del *biofilm* (Schembri *et al* 2001, Coquet *et al* 2002, Otto *et al* 2002) y están involucradas en la resistencia a ciertos antibióticos (Aires *et al* 1999, Köler *et al* 1999). El segundo grupo de proteínas está asociado a la síntesis de aminoácidos y cofactores, mientras que las restantes tendrían funciones en la adaptación y protección y podrían explicar algunas características de resistencia a condiciones desfavorables de operación.

CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LOS MICROORGANISMOS A INMOVILIZAR

En este trabajo se utilizaron dos tipos de microorganismos: *Escherichia coli* para estudios del sistema soporte-microorganismo y *Lactococcus lactis* como organismo modelo para un proceso con células inmovilizadas. Este último se ensayó en condiciones de fermentación para la producción de nisina, una bacteriocina de amplio uso en industria alimentaria.

Escherichia coli

Escherichia coli (Fig. 1.6) es un organismo perteneciente a la familia de las enterobacterias. Su nombre de género deriva del físico alemán Theodor Escherich quien en 1885 reportó por primera vez esta bacteria. Es el procariota más extensamente estudiado a nivel de su genética y fisiología y la secuencia completa de su genoma se conoce desde 1997.

Figura 1.6
Micrografía de E. coli (www.sciencieenwsden.com)

Fisiológicamente, *E. coli* es un microorganismo versátil. Bajo condiciones aeróbicas crece por fermentación produciendo ácidos y CO_2 como productos finales. Alternativamente, puede crecer por medio de respiración anaeróbica, dado que es capaz de utilizar NO_3^-, NO_2^- o fumarato como aceptores finales de electrones. Debido a que es capaz de crecer en medios de cultivo con glucosa como único constituyente orgánico y que posee un tiempo de duplicación considerablemente corto (30 minutos), es un microorganismo capaz de dar altos rendimientos en biomasa y/o producto por lo que se utiliza rutinariamente para cultivos de alta densidad (Gellissen 2005).

Esta bacteria Gram negativa es un organismo modelo para investigación a escala laboratorio y es uno de los procariotas más utilizado a nivel industrial como huésped para la expresión de proteínas recombinantes y como fuente de variadas enzimas para biotransformaciones (Huang *et al* 2007, Choi *et al* 2008). Es más, fue el primer huésped para la producción de insulina humana recombinante utilizado por Eli Lilly en 1982 (Tao *et al* 2009).

A escala laboratorio las variantes de *E. coli* más utilizada son la BL21, deficiente en proteasas, y K12, que posee mayor capacidad de formación de enlaces disulfuro (Tao *et al* 2009).

Nucleósidos fosforilasas. Los nucleótidos son compuestos esenciales en todos los organismos. Son sustratos para la síntesis de DNA y RNA y también son los principales dadores de energía para procesos celulares. Algunos nucleótidos son constituyentes de coenzimas mientras otros se usan para la activación de precursores en la síntesis de polisacáridos y lípidos. Además cumplen un importante rol en la regulación metabólica de numerosos procesos celulares a nivel de expresión génica. Algunas bacterias son capaces de producir nucleótidos *de novo* mientras que otras requieren la adición de purinas y/o pirimidinas al medio de crecimiento. Sin embargo, éstas últimas requieren desfosforilar estos nucleótidos por nucleosidasas antes de entrar a la célula. Inclusive las bacterias capaces de realizar síntesis *de novo* poseen elaborados sistemas de salvataje para la captura y utilización de bases y nucleótidos. En estas bacterias, la sínte-

sis *de novo* esta usualmente silenciada bajo condiciones de exceso de fuentes de purinas o pirimidinas, por medio de una combinación de regulación por inhibición y génica (Kilstrup *et al* 2005).

Las nucleósido fosforilasas (NP) son las proteínas involucradas en las rutas de salvataje que proveen de purinas y pirimidinas para la biosíntesis de nucleótidos, asegurando una alternativa energéticamente menos costosa a la biosíntesis *de novo* (Burling *et al* 2003). La clase NP está constituída por dos tipos de enzimas que difieren en el tipo de base nucleotídica para la cual son específicas.

Las pirimidín nucleósido fosforilasas (PyNP) catalizan la reacción general:

Pirimidín-nucleósido + fosfato inorgánico → ribosa-1-P + base pirimidínica

Mientras que las purín nucleósido fosforilasas (PNP) están funcionalmente relacionadas y catalizan la reacción análoga:

Purin-nucleósido + fosfato inorgánico → ribosa-1-P + base purínica

Existe amplia experiencia sobre utilización de este tipo de enzimas de *E. coli* para la obtención de nucleósidos modificados (Trelles *et al* 2004, 2005, 2008). Dado que es posible detectar la actividad de estas enzimas en condiciones de no crecimiento son reacciones muy útiles para el estudio de células en estado inmovilizado. Las reacciones que se utilizan en este trabajo se describen en el Capítulo 3.

Lactococcus lactis

El género *Lactococcus* forma parte del grupo de las Bacterias del Ácido Láctico (BAL). Por definición son cocos Gram positivos no móviles, que crecen a temperatura entre 10 y 40°C (Fig. 1.7). Estos microorganismos fermentan glucosa por la ruta de las hexosas difosfato con la formación de ácido L (+) láctico. Son células ovoides (de 1,2 a 1,5 µm de diámetro) con tendencia a formar cadenas cortas unidireccionales (Salminen *et al* 2004). Desde el punto de vista metabólico, los lactococos son anaerobios facultativos, catalasa negativo y no forman endosporas (Carr *et al* 2002).

L. lactis es la especie más extensamente estudiada del grupo BAL con respecto a su fisiología, rutas metabólicas y mecanismos de regulación, y su genoma está completamente secuenciado (Bolotin *et al* 2001).

Es un microorganismo mesófilo con una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C, es microaerófilo fermentador (Duwat *et al* 2000), posee un genoma relativamente pequeño (2.5 Mbp) (Bolotin *et al* 2001), una fórmula mínima correspondiente a $CH_{1.95}\ O_{0.63}\ N_{0.22}\ P_{0.02}\ S_{0.01}$ (Oliveira *et al* 2005) y un peso relativo de 27.7 g/C-mol (Novak *et al* 2000).

Figura 1.7
Micrografía de L. lactis (www.jpkc.njau.edu.cn)

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, y se utiliza principalmente en la industria láctea como *starter* para la producción de alimentos fermentados. El uso de herramientas de ingeniería genética permitió la construcción de cepas modificadas que exhiben mejor control en ciertas características fisiológicas, como crecimiento y producción de ácidos orgánicos, resistencia a bacteriófagos y propiedades proteolíticas (de Voss 1999). Adicionalmente, se utilizan cepas recombinantes de *L. lactis* para producir proteínas heterólogas de gran interés biotecnológico y médico, tales como enzimas y antígenos, y se estudian como vehículos de antígenos recombinantes en vacunas vivas (Langella *et al* 1999).

L. lactis es capaz de adquirir elementos de DNA plasmídicos que codifican funciones críticas para el crecimiento y la competencia, como capacidad de metabolizar lactosa, actividad proteolítica, producción de bacteriocinas, producción de exopolisacáridos y resistencia a bacteriófagos (Klaenhammer *et al* 2005).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Con respecto a su metabolismo, este microorganismo es capaz de metabolizar una variedad de azúcares y otras fuentes de carbono para obtener energía, potencial redox y precursores metabólicos para biosíntesis de macromoléculas (de Vos 1996, Roissart *et al* 1994). Las fuentes de carbono fermentables incluyen fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, sacarosa y trehalosa. La Figura 1.8 presenta un esquema general de la incorporación de carbohidratos en *L. lactis*.

Metabolismo de la lactosa en L. lactis. La lactosa puede ser incorporada por dos vías: por una lactosa-PTS (lactosa-fosfotransferasa) que produce lactosa-6-fosfato o por una permeasa (de Vos 1994). El producto de la lactosa-PTS, lactosa-6-fosfato, es hidrolizada por una fosfo-β-galactosidasa, produciendo galactosa 6-fosfato y glucosa.

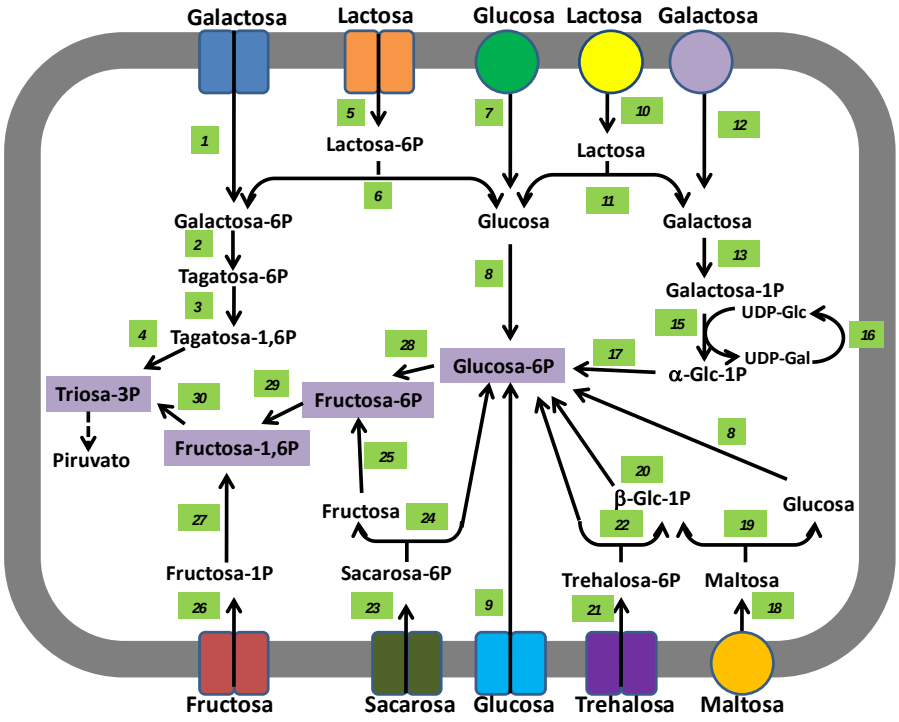


Figura 1.8

Transporte y metabolismo inicial de carbohidratos en L. lactis. Las enzimas involucradas en cada reacción se indican con números: 1) galactosa fosfotransferasa, 2) galactosa 6P isomerasa, 3) tagatosa 6P quinasa, 4) tagatosa 1,6 BiP aldolasa, 5)lactosa fosfotransferasa, 6) fosfo-β-galactosidasa, 7) glucosa permeasa, 8) glucoquinasa, 9) manosa/glucosa fosfotransferasa, 10) lactosa permeasa, 11) β-galactosidasa, 12) galactosa permeasa, 13) galactosa mutarotasa, 14) galactoquinasa, 15) galactosa-1-P uridiltransferasa, 16) UDP-galactosa 4-epimerasa, 17) α-fosfoglucomutasa, 18) maltosa permeasa y proteína de unión a maltosa, 19)maltosa fosforilasa, 20)β-fosfoglucomutasa, 21) trehalosa fosfotransferasa, 22) trehalosa 6P fosforilasa, 23) sacarosa fosfotransferasa, 24) sacarosa 6P hidrolasa, 25) 6-fructoquinasa, 26) fructosa fosfotransferasa, 27) 1-fosfofructo-6-quinasa, 28) fosfoglucosa isomerasa, 29) 6-fosfofructo-1-quinasa, 30) fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (Adaptado de Neves et al 2005)

Luego de la fosforilación por la glucoquinasa, la glucosa puede entrar en la glicólisis, mientras que la galactosa-6-fosfato es metabolizada hasta los intermediarios glicolíti-

cos dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehido-3-fosfato (G3P) por tres enzimas de la ruta de la tagatosa-6-fosfato. Los componentes del sistema lactosa-PTS, junto con las enzimas de la ruta de la tagatosa-6-fosfato se encuentran codificadas en plásmidos en la mayoría de las cepas de *L. lactis* (Thompson 1979, Crow *et al* 1983).

El primer mecanismo de transporte de azúcares ligado a iones descripto en *L. lactis* fue el sistema de transporte secundario mediado por una permeasa para la incorporación de lactosa (Kashket *et al* 1973). La lactosa incorporada a través de la permeasa es hidrolizada por la β-galactosidasa, rindiendo glucosa y galactosa; esta

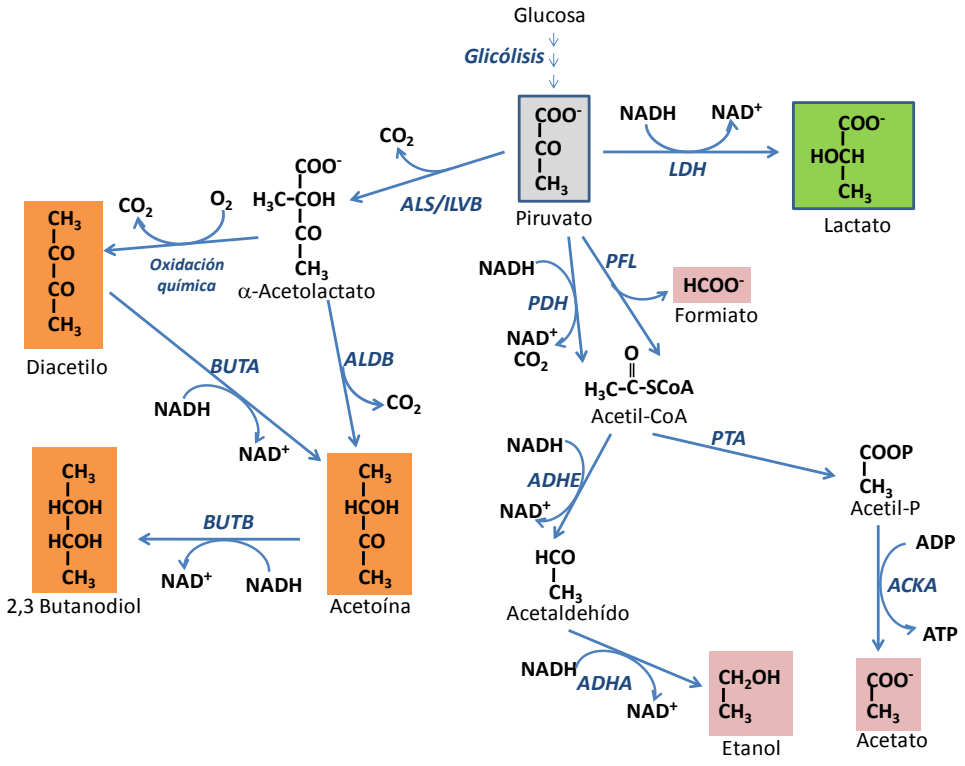


Figura 1.9

Metabolismo homo- y heterofermentativo en L. lactis. Enzimas involucradas: LDH) lactato deshidrogenasa,PDH) complejo piruvato deshidrogenasa, PFL) piruvato formiato liasa, ADHE) acetaldehído deshidrogenasa, ADHA) alcohol deshidrogenasa, PTA) fosfotransacetilasa, ACKA) acetato quinasa, ALS/ILV B) acetolactato sintasa catabólica y anabólica, ALDB) acetolactato descarboxilasa, BUTA) diacetil reductasa, BUTB) acetoín reductasa (Adaptado de Oliveira et al 2005)

última es metabolizada a glucosa-1-fosfato por tres enzimas de la ruta de Leloir, codificadas por genes *gal*. La glucosa-1-fosfato puede entrar en la ruta glicolítica, luego de la isomerización a glucosa-6-fosfato por la α-fosfoglucomutasa (Grossiord *et al* 2003).

Fermentación homoláctica y heterofermentación. *L. lactis* fermenta glucosa por la ruta de hexosas difosfato con la formación de ácido L(+)láctico. La glucosa se convierte en piruvato a través de la ruta glicolítica, con producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato y equivalentes de reducción (NADH) a nivel de la glucosa-3-fosfato deshidrogenasa. La reducción de piruvato a lactato vía lactato deshidrogenasa (LDH) mantiene el balance redox por regeneración de NAD^+ (Neves *et al* 2005) (Fig. 1.9).

La fermentación mixta, o ácido mixta, es una variante de la homoláctica. Ante ciertas condiciones ambientales, por ejemplo en cultivos en aerobiosis, algunas especies de BAL son capaces de bascular su metabolismo homoláctico en un metabolismo mixto, en el cual se pueden generar numerosos productos como diacetilo, acetoína, 2,3-butanodiol, ácido acético, formiato, etanol y/o CO_2 más lactato (Cocaign-Bousquet *et al* 2002, Neves *et al* 2005). Todos estos metabolitos se generan a partir del piruvato. El piruvato se puede convertir en acetil-CoA y formiato por la piruvato formiato liasa (PFL) o en acetil-CoA y CO_2 por la piruvato deshidrogenasa (PDH), para posteriormente generar etanol o acetato por acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) o del sistema fosfotransacetilasa/acetato quinasa (PTA/ACKA), respectivamente. Por otro lado, el piruvato puede metabolizarse hasta diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Fig. 1.8). A pesar de la diversificación de posibles productos, durante la fermentación ácido mixta la mayor parte del piruvato se transforma en lactato por la LDH (Jamet 2001, Oliveira *et al* 2005).

Aún no están determinados completamente los factores que conducen al cambio de fermentación homoláctica hacia ácido-mixta. Se propusieron al menos dos mecanismos alostéricos involucrados que pueden o no operar simultáneamente: la proporción de compuestos fosforilados ($FBP/P_i/ADP/ATP$) y el balance redox ($NADH/NAD^+$). Por ejemplo, la LDH se encuentra co-regulada por el balance de los dos tipos de moléculas en la mayoría de las cepas de *L. lactis*, mientras que en algunos casos uno de los mecanismos de regulación es predominante (van Niel *et al* 2004).

La relación NADH/NAD^+ parece actuar como modulador de la actividad de GADPH y LDH, determinando que a relaciones mayores a 0,05 el metabolismo homoláctico es preponderante como consecuencia de la represión de GAPDH. Por otro lado, en el metabolismo ácido mixto observado para galactosa y lactosa, el azúcar se toma desde el medio a menor velocidad que la glucosa, dando como consecuencia relaciones más bajas de NADH/NAD^+ intracelulares que libera la inhibición de GAPDH y limita la actividad de LDH (Garrigues *et al* 1997).

L. lactis creciendo en maltosa presenta altos niveles de ADH, lo que explica la desviación hacia productos de la fermentación ácido mixta. El hecho de que el conjunto ATP-ADP inhibe completamente su actividad enfatiza el rol de ADH en la regulación del cambio a fermentación ácido mixta, ya que altos niveles de nucleótidos de adenina están asociados con la homofermentación (Palmfeldt *et al* 2004).

Adicionalmente, ensayos de fermentación de *L. lactis sub. lactis* con diferentes azúcares y concentraciones variables mostraron que el tipo de fermentación preponderante es homoláctica, independientemente del azúcar utilizado y de las velocidades de crecimiento y consumo de azúcar (Even 2001). Esta observación se interpretó por los autores como una consecuencia de bajas concentraciones de piruvato formiato liasa (PFL) y alcohol deshidrogenasa (ADH). La concentración de PFL durante el crecimiento de la subespecie MG1363 en galactosa es cerca de 3 veces mayor comparada con la fermentación utilizando glucosa (Melchiorsen *et al* 2002), sugiriendo que el nivel de PFL, más que su regulación alostérica, controla el cambio a fermentación ácido mixta.

Metabolismo aeróbico en L. lactis. El procesamiento industrial expone a *L. lactis* a múltiples condiciones de *stress*, tales como altas y bajas temperaturas, bajos pH, alta presión osmótica, deprivación de nutrientes y medio oxidante (Miyoshi *et al* 2003).

El *stress* bacteriano puede definirse como una perturbación fisiológica, causada por modificaciones ambientales (físicas, químicas y/o nutricionales) que pueden

tener muchas consecuencias para la bacteria, como retardo en el crecimiento y muerte celular (Farr *et al* 1991, Duwat *et al* 1999). El stress oxidativo puede causar varios tipos de daño a la célula, incluyendo disrupciones de rutas metabólicas, mutaciones espontáneas y efectos bacteriostáticos/bactericidas (Berlett *et al* 1997).

El oxígeno, además de ser esencial para el proceso de respiración y por lo tanto para la vida de muchos organismos, también es una fuente de toxicidad que puede conducir a daño en el DNA, proteínas y membranas (Storz *et al* 1999). El oxígeno en sí mismo es incapaz de causar daño a la célula, sin embargo durante el metabolismo aeróbico se producen especies reactivas, como el radical anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El radical superóxido incrementa la disponibilidad de hierro libre, que participa en la formación de radicales hidroxilos y otras especies de oxígeno reactivo (Henle *et al* 1997). El hierro cataliza la reducción del H_2O_2 para producir radicales hidroxilos, en la denominada reacción de Fenton. Estos intermediarios tienen un gran potencial oxidante y atacan directamente los componentes celulares (Fridovich 1998). En estas condiciones las células muestran severos daños en proteínas y DNA, mayores frecuencias de mutación espontánea y alta mortalidad (Rezaiki *et al* 2004).

L. lactis es una bacteria anaerobia facultativa. Algunas cepas son capaces de crecer en presencia de oxígeno y ajustar su metabolismo, mientras que otras son fuertemente inhibidas bajo condiciones aeróbicas. Como este microorganismo carece de una cadena respiratoria funcional, la habilidad para crecer y sobrevivir en presencia de oxígeno ha sido relacionada con la presencia de NADH-oxidasas dependientes de flavina, NADH peroxidasas y superóxido dismutasas (Smart *et al* 1987, Sanders *et al* 1995).

L. lactis expresa una sola superóxido dismutasa (SOD) y no posee catalasa. Sin embargo, la adición de catalasa exógena aumenta la sobrevida de cultivos expuestos a oxígeno (Duwat *et al* 1995).

Estudios genómicos sobre este microorganismo mostraron que posee algunos de los genes necesarios para la respiración como *cydA*, que codifica para la citocromo d oxidasa (Bolotin *et al* 1999). Durante la respiración, CydA participa directamente en la cadena de transferencia de electrones, donde el oxígeno es el aceptor final, generando ATP. A diferencia de *B. subtilis* y *E. coli*, que poseen todas las enzimas de la ruta biosintéticas de la porfirina (grupo prostético de los citocromos), *L. lactis* posee solo algunas de las enzimas de esta ruta, resultando incapaz de sintetizar estos compuestos (Gaudu *et al* 2002, Salminen *et al* 2004). Sin embargo, se observó la formación completa del citocromo en cultivos aeróbicos con agregado de una fuente exógena de hierro complejado con el grupo hemo (Bolotin *et al* 2001).

Cuando *L. lactis* crece en presencia de oxígeno y con adición de una fuente de grupos hemo, se produce un incremento en la actividad NADH oxidasa que regenera el NAD^+, reemplazando el rol de la LDH y cambiando su metabolismo hacia la heterofermentación.

La respiración parece el modo preferido para *L. lactis*, debido a que se obtienen mayores rendimientos en biomasa y supervivencia de cultivos en almacenamiento. La presencia de hemo y oxígeno promueven la respiración de *L. lactis* (Duwat *et al* 2001); los productos de fermentación (principalmente ácido láctico) no se acumulan y el pH final del cultivo es mayor. De hecho, el ácido láctico se produce en los estadíos iniciales del cultivo, y posteriormente disminuye (Duwat *et al* 2001, Nagayasu *et al* 2007). Adicionalmente, análisis de proteómica indican que *L. lactis* en condiciones de respiración posee un patrón de expresión diferencial, relacionado con un incremento en la expresión de peptidasas, activación de rutas de biosíntesis de aminoácidos y factores redox (Gaudu *et al* 2002).

Actividad proteolítica en L. lactis. Los sistemas proteolíticos de *L. lactis* involucran una proteasa de unión a pared celular, varios transportadores peptídicos, y peptidasas citoplasmáticas (Kunji *et al* 1996, Guédon *et al* 2001). La hidrólisis de caseína y la fermentación de azúcares son características importantes desde el punto de vista

tecnológico, dado que contribuyen al aroma y textura de productos lácteos (Titgemeyer *et al* 2002).

Requerimientos nutricionales. La principal función del metabolismo de azúcares en *L. lactis* es generar la energía necesaria para un rápido crecimiento y para la mantención del pH intracelular durante la acidificación del medio (Hugenholtz *et al* 1999).

L. lactis posee una capacidad sintética limitada y en consecuencia, requiere de una gran variedad de nutrientes para crecer. La mayoría de los precursores anabólicos se importan desde el medio de crecimiento, mientras solo una fracción menor se sintetiza *de novo* desde la fuente de carbono. La mayor parte del carbono de los carbohidratos se convierte en productos finales durante la fermentación. Por ejemplo, durante el crecimiento en glucosa, solo el 5% del azúcar metabolizado se convierte en biomasa (Novak *et al* 2000). Por lo tanto, para conseguir altas tasas de crecimiento se necesita utilizar medios complejos suplementados con azúcares fermentables, numerosas vitaminas y aminoácidos, fosfatos, potasio y magnesio (van Niel *et al* 1999). En medio sintético, *L. lactis* requiere al menos seis aminoácidos y tres vitaminas. Como producen ácidos durante el crecimiento, los medios deben poseer capacidad *buffer* para evitar que el crecimiento se detenga por descenso del pH a valores inhibitorios (Terzaghi *et al* 1975).

BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas comprenden aquellas sustancias producidas por bacterias que inhiben el crecimiento de otras bacterias. En eubacterias y arqueobacterias esta función la cumplen antibióticos de bajo peso molecular, agentes líticos, toxinas, enzimas bacteriolíticas y subproductos metabólicos, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y diacetilo. Las bacteriocinas se diferencian de la mayoría de los an-

tibióticos terapéuticos en que son proteináceos y su rango de acción generalmente está acotado a cepas de la misma o cercana relación de especie (Chen *et al* 2003).

La demostración del antagonismo de una bacteria contra otra data de más de tres siglos. En 1676, Antonie van Leeuwenhoek documentó la antibiosis, en la cual el producto de un microorganismo inhibe el crecimiento de otro. Luego, en 1877, Pasteur y Joubert reportaron el efecto inhibitorio de una bacteria común de la urea sobre *Bacillus anthracis* (Joerger *et al* 2000).

La habilidad para sintetizar una o más sustancias inhibidoras es una ventaja desde el punto de vista evolutivo. Se puede esperar una clara oportunidad de supervivencia y proliferación de un organismo que pudiese eliminar un competente de su nicho ecológico, y disponer de mayor cantidad de nutrientes. En este sentido las bacteriocinas cumplen un rol fundamental en la dinámica de las poblaciones bacterianas. Sin embargo, el grado de interacciones entre bacteriocinas es tan compleja a nivel ecológico y evolutivo en poblaciones mixtas (tales como en *biofilms* naturales) que muchos detalles permanecen aún sin dilucidar (Dykes 1995).

Tabla 1.2
Ejemplos de bacteriocinas
(Adaptado de Chen 2003)

Bacteriocina	Bacteria productora
Lantibióticos clase I-A	
Nisina	*Lactococcus lactis*
Lactocina S	*Lactobacillus sake*
Epidermina	*Staphylococcus epidermidis*
Gallidermina	*Staphylococcus gallinarum*
Lacticina 481	*Lactococcus lactis*
Lantibióticos clase I-B	
Mersacidina	*Bacillus subtilis*
Cinnamicina	*Streptomyces cinnamoneus*
Ancovenina	*Streptomycces sp.*
Duramicina	*Streptomyces cinnamoneus*
Actagardina	*Actinoplanes sp.*
Clase II-A	
Pediocina PA-1/AcH	*Pediococcus acidilactici*
Sakacina A/P	*Lactobacillus sake*
Leucocina A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum*
Mesentericina Y 105	*Leuconostoc mesenteroides*
Enterocina A	*Enterococcus faecium*
Divercina V 41	*Carnobacterium divergens*
Lactococina MMFII	*Lactococcus lactis*
Clase II-B	
Lactococina G/M	*Lactococcus lactis*
Lactacina F	*Lactobacillus johnsonii*
Plantaricina A/S/EF/JK	*Lactobacillus plantarum*
Clase II-C	
Acidocina B	*Lactobacillus acidophilus*
Carnobacteriocina A	*Carnobacterium piscícola*
Divergicina A	*Carnobacterium divergens*
Enterocina P/B	*Enterococcus faecium*
Clase III	
Helveticina J/ V-1829	*Lactobacillus helveticus*

Clasificación de las bacteriocinas. El término bacteriocina se incorporó en 1953 para denominar a las proteínas antibacterianas altamente específicas, caracterizadas por biosíntesis letal, un estrecho rango de actividad, y con capacidad de adsorción a re-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ceptores específicos de la envoltura celular. Más tarde, se agregó a esta descripción la asociación entre biosíntesis de bacteriocinas y plásmidos, y ciertas propiedades específicas de aquellas producidas por bacterias Gram positivas. A pesar de que existen excepciones, las bacteriocinas de bacterias Gram positivas comúnmente no poseen un receptor específico para la adsorción. En general se trata de compuestos de bajo peso molecular, que poseen una secuencia líder que se cliva durante la maduración y difieren entre sí en los mecanismos de liberación y transporte celular (Chen *et al* 2003).

La mayoría de las bacteriocinas de BAL son catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas y están compuestas por 20 a 60 aminoácidos (Nes *et al* 2000). Estas bacteriocinas son clasificadas en tres grupos que también incluyen bacteriocinas de otras bacterias Gram positivas (Klaenhammer *et al* 1993, Nes *et al* 1996). Ejemplos de bacteriocinas se muestran en la tabla 1.2.

(i) *Bacteriocinas Clase I- Lantibióticos.* Los lantibióticos son péptidos pequeños (< 5 kDa) que contienen aminoácidos inusuales: lantionina (Lan), α-metillantonina (MeLan), dehidroalanina y dehidrobutirina. La clase I se subdivide en tipo A y B de acuerdo a sus estructuras químicas y actividades antimicrobianas (Guder 2000). Los lantibióticos tipo A están conformados por péptidos lineales con una carga neta positiva y ejercen su actividad a través de la formación de poros en la membrana bacteriana. Los lantibióticos tipo B son péptidos globulares pequeños y con carga neta negativa o neutra, y su actividad antimicrobiana está relacionada con la inhibición de enzimas específicas (Chen *et al* 2003).

(ii) Bacteriocinas Clase II. La clase II la compone un grupo de péptidos pequeños (< 10 kDa) que no contienen lantionina y son estables a altas temperaturas. A su vez, esta clase se subdivide en tres grupos. La clase IIA incluye péptidos tipo pediocina, que poseen una secuencia consenso –Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys y poseen actividad anti-listeria (Ennahar 2000). La clase IIB incluye bacteriocinas que requieren dos péptidos pa-

ra su actividad, y la clase IIC contiene los péptidos no incluídos en IIA y IIB, como las bacteriocinas de secreción sec-dependientes (Chen *et al* 2003).

(iii) Bacteriocinas Clase III. Este grupo comprende proteínas de peso molecular mayor a 30 kDa sensibles al calor.

Adicionalmente, un grupo de bacteriocinas complejas que requieren carbohidratos o lípidos para la actividad se proponen como una cuarta clase (Klaenhammer *et al* 1993).

Nisina

En 1928, al mismo tiempo que Fleming descubría la penicilina, Rogers y Whittier publicaron por primera vez sus observaciones sobre la inhibición del crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* por efecto de *Streptococcus lactis* (ahora *L. lactis* sub. *lactis*). Whitehead y Riddet, luego en 1933, describieron un "estreptococo inhibitorio" en leche. Mattick y Hircsh en 1947 propusieron el nombre nisina derivado de "N inhibitory substance".

La nisina es un lantibiótico de clase IA. Su estructura, elucidada primero por Gross y Morell en 1971, consiste en un péptido de 34 aminoácidos. Contiene aminoácidos inusuales modificados postraduccionalmente: lantionina (Ala-S-Ala) y 3-metillantionina (Abu-S-Ala), 2,3-didehidroalanina (Dha) y 2,3-didehidrobutirina (Dhb) (van Kraaij *et al* 1998) (Fig. 1.10).

Existen tres variantes naturales de la nisina, denominadas A, Z y Q. La nisina Z difiere de la variante A en un aminoácido; en la posición 27 un residuo de His cambia por una Asn (Mulders *et al* 1991). El espectro de actividad de ambas variantes es similar y difieren en que la nisina Z exhibe una mayor velocidad de difusión, pero es menos soluble a pH ácido. La nisina Q difiere de la nisina A en mayor extensión; en la posición 17 posee una Met en vez de Gln, en la posición 21 cambia una Met por Leu, en la posición 30 cambia una Ile por Val y, como en la nisina Z, posee una Asn en la posición

27. El espectro antibacterial de la nisina Q es similar, pero no idéntica a las variantes A y Z (Morency *et al* 2001).

Los residuos de aminoácidos inusuales, como lantionina y 3-metillantionina, podrían producir conformaciones más estables. Otras, como la didehidroalanina, y didehidrobutirina, junto con Cys, podrían proveer agrupamientos reactivos que incrementen la actividad biológica. Los residuos didehidro podrían tener un rol importante en la interacción de la nisina con los grupos sulfhidrilos en esporas germinales (Morris *et*

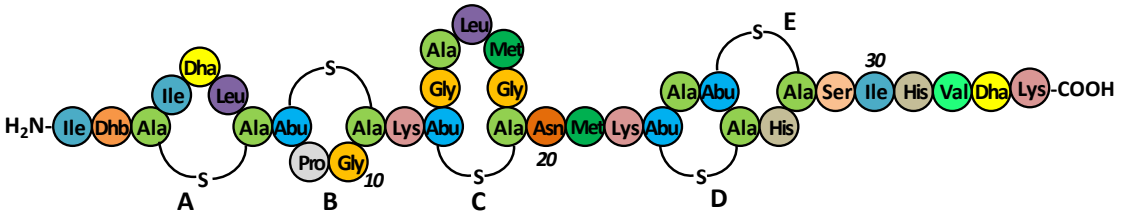


Figura 1.10
Secuencia de aminoácidos y formación de anillos de la nisina A

al 1984). Estos residuos insaturados o deshidratados forman centros electrofílicos que pueden reaccionar con grupos nucleofílicos cercanos (McAuliffe *et al* 2001). Consecuentemente, los lantibióticos conforman estructuras policíclicas que son importantes en las propiedades de inserción en la membrana de las bacterias. Estas estructuras de anillo aportan rigidez al péptido (Kuipers *et al* 1996) y lo protege de la acción de enzimas proteolíticas y desnaturalización térmica (Hurst 1981).

La molécula de nisina no posee una estructura terciaria definida. Se puede describir como una molécula con dos dominios anfipáticos, que contienen a su vez numerosas estructuras secundarias y un dominio flexible que los conecta. El dominio amino terminal está compuesto por los anillos de lantionina A, B y C; y contiene los aminoácidos hidrofóbicos. El carboxi-terminal contiene los anillos D y E (Fig. 1.10) y los residuos cargados e hidrofílicos (Reunanen 2007).

En solución acuosa, la nisina forma una estructura flexible, mientras que en solventes más lipofílicos, como TFE o DMSO, posee zonas rígidas. Los aminoácidos de la

posición 3 a 19 (donde se forman los primeros tres anillos tioéter) y 23 a 28 (formando los dos anillos terminales) se arreglan conformacionalmente como hélices anfifílicas en las cuales los residuos hidrofóbicos están expuestos a una cara y los aminoácidos cargados se exponen a la cara opuesta. Los aminoácidos en posiciones 1 y 2, en el N-terminal, 29 a 34, en el C-terminal, y la región comprendida entre las zonas helicoidales son más flexibles. Esta última región es esencial para la acción bactericida (Wiedermann *et al* 2001).

Características fisicoquímicas. La nisina posee un peso molecular de 3488 Da. Es un péptido con alta solubilidad (57 mg/ml) y estabilidad térmica a pH ácidos. El tratamiento de esterilización a 121 °C de una solución de nisina a pH 2 no produce reducción detectable en su actividad. Sin embargo, a pH neutro pierde un 90% de actividad a temperatura ambiente y a pH alcalino es biológicamente inactiva, probablemente debido a modificaciones químicas (Liu 1990). Es sensible a α-quimiotripsina, y resistente a tripsina, elastasa, carboxipeptidasa A, pepsina y erepsina (Delves-Broughton *et al* 1996).

Biosíntesis y regulación transcripcional. La nisina se sintetiza como un prepéptido inactivo. Luego de modificaciones postraduccionales, que incluyen deshidratación, formación del anillo de lantionina, secreción y clivaje de la secuencia líder; la nisina se vuelve biológicamente activa. La producción de nisina activa requiere un total de 14 kb de DNA que se encuentran en un transposón conjugativo nisina-sacarosa de 70 kb compuesto por 11 genes, *nis*(A/Z)/QBTCIPRKFEG (McAuliffe *et al* 2001) (Fig 1.11).

El gen estructural *nis* codifica un prepéptido de 57 aminoácidos conteniendo una señal líder N-terminal de 23 residuos involucrado en el direccionamiento de las modificaciones postraduccionales (Zendo *et al* 2003, Cheigh *et al* 2005). El operón nisina incluye los genes responsables de las modificaciones postraduccionales intracelulares (*nis*BC) en las cuales los aminoácidos son deshidratados y se forma el anillo de lantionina (Koponen *et al* 2002). En primer lugar, los residuos de Ser y Thr son deshidratados

para dar Dha y Dhb. Subsecuentemente, cinco de los residuos deshidratados se acoplan por medio de enlaces tioéter a residuos de Cys *upstream* generando los anillos característicos de (β-metil)lantioninas (Siergers *et al* 1996).

*nis*T codifica una proteína transportadora putativa de la familia ABC y está involucrada en la translocación del precursor completamente modificado a través de la membrana citoplasmática. *nis*P codifica una proteasa tipo-subtilisina involucrada en la activación proteolítica extracelular. Durante la translocación del precursor, el péptido

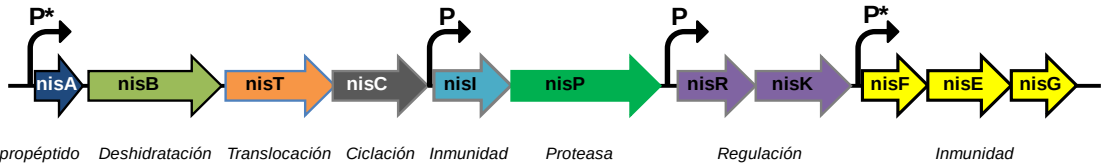


Figura 1.11
Esquema del operón nisA. P son promotores inducibles por nisina, mientras que P son constitutivos (Basado en Li et al 2006 y Cheigh et al 2005)*

líder es removido por la proteasa NisP para formar el péptido de nisina maduro (van der Meer *et al* 1993, Qiao *et al* 1996). *nis*I y *nis*FEG codifican para los sistemas involucrados en la inmunidad de la célula productora a la nisina. *nis*I codifica una lipoproteína involucrada en la auto protección de la bacteria productora (Qiao *et al* 1995), mientras que *nis*FEG codifica un exportador putativo tipo ABC involucrado en la exclusión de la nisina (Dodd *et al* 1996). *nis*R y *nis*K codifican un regulador de respuesta y un sensor kinasa de la familia de las histidin kinasas que forman parte de un sistema de dos componentes que regula la biosíntesis de nisina (Kuipers *et al* 1995, Kleerebezem *et al* 1999).

Control de la producción de nisina por quórum sensing. Numerosos tipos celulares sufren cambios fisiológicos dependientes de la densidad celular y las fases del crecimiento. Este fenómeno de expresión génica dependiente de la densidad celular se denomina *quórum sensing*. Ejemplos de este mecanismo en bacterias Gram positivas incluyen la formación de biofilms y virulencia en *Pseudomonas aeuroginosa*, for-

mación de nódulos en raíz en *Rhizobium leguminosarum y movilidad en Serratia liquefaciens* (Kleerebezem *et al* 2001).

En estos sistemas de *quórum sensing* la bacteria produce moléculas señalizadoras extracelulares que son las responsables de la comunicación entre células bacterianas. Los péptidos son las moléculas señalizadoras más comunes en Gram positivas y se los denomina péptidos autoinductores o feromonas peptídicas.

Regulación de la transcripción de los genes nis. Estudios sobre la biosíntesis de nisina y su regulación muestran que, como otros lantibióticos, se producen de manera dependiente del crecimiento, o de la densidad celular, bajo el control de sistemas regulatorios de dos componentes compuestos por un sensor histidin kinasa y un regulador de respuesta (NisR y NisK) (McAuliffe 2001). En general, los sistemas de regulación de dos componentes juegan un rol clave en muchas de las modulaciones de la fisiología celular resultado de cambios en el ambiente, donde la fosforilación se utiliza como forma de transferir información (Kleerebezem *et al* 2001).

La producción dependiente de la densidad celular observada para nisina está regulada a nivel transcripcional. El gen estructural *nisA* se transcribe a un alto nivel como un mRNA monocistrónico, y en menor grado como parte del mRNA policistrónico comprendiendo *nisABTCIP* (van dee Meer *et al* 1993). La expresión diferencial de estas unidades transcripcionales probablemente sea resultado de la presencia de una secuencia terminadora *downstream* al gen *nisA*. Las otras unidades transcripcionales, *nisRK* y *nisFEG* dependen de promotores individuales, P_{nisR} y P_{nisF} respectivamente (Fig. 1.11).

En respuesta a la señal externa de nisina madura, el sensor quinasa NisK se autofosforila en un residuo de His del dominio C-terminal ubicado en el lado citoplasmático de la membrana celular. El grupo fosfato se transfiere posteriormente a un residuo de Asp de la NisR, la cual actúa como activador transcripcional de los promotores *nis*A y *nis*F (McAufiffe *et al* 2001).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La transcripción de *nisA* y *nisF* parece activarse por nisina, *nisRK* funciona de manera dependiente de señal de transducción, mientras que *nisR* es independiente de nisina. La actividad promotora de los promotores de *nisA* y *nisF* es directamente dependiente de la concentración de nisina agregada, indicando una relación lineal entre la concentración de nisina y el nivel transcripcional resultante. El nivel de producción de los dos transcriptos derivados del promotor *nis*A (*nisA* y *nisABTCIP*) proba-

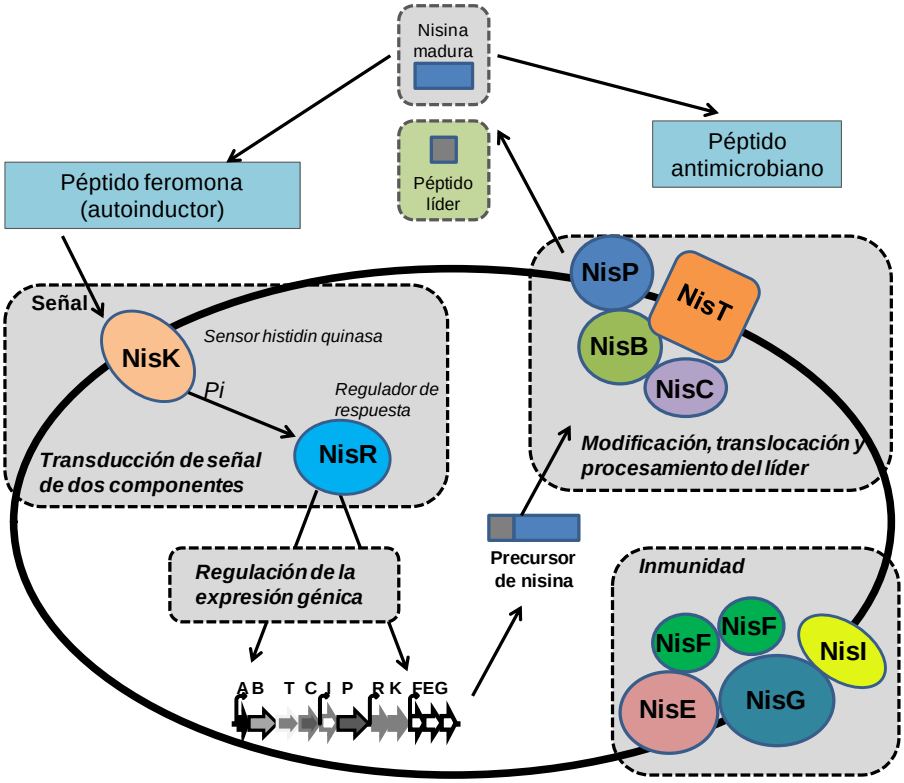


Figura 1.12

Representación esquemática de la biosíntesis y regulación de nisina en L. lactis. El precursor de nisina (codificado por nisA) se sintetiza a nivel ribosoma, se modifica por acción de NisB y NisC y se transloca (NisT). El procesamiento del péptido lider por NisP da como resultado la nisina madura. La nisina madura actúa extracelularmente como péptido antimicrobiano y las células productoras se encuentran protegidas por el sistema de inmunidad compuesto por NisI y NisFEG. Además, la nisina madura actúa como péptido feromona en la activación de su propia biosíntesis a través de un sistema de transducción de señal de dos componentes conformado por NisK y NisR (Adaptado de Cheigh et al 2005)

blemente sirva para generar una producción balanceada entre el precursor de la nisina y su maquinaria de modificación, transporte, procesamiento y el componente de inmunidad (*nisB, C, T, P e I*). La expresión constitutiva de *nisRK* probablemente posibilita una respuesta rápida de la célula ante la presencia de nisina, incluyendo una rápida construcción de inmunidad (Kleerebezem *et al* 2004). La Fig. 1.12 muestra un esquema general de la biosíntesis y regulación de nisina.

Existe otro mecanismo de inducción de *nis*A. Estudios sobre la transcripción de fusiones del promotor de *nis*A y el gen *reporter lac*Z muestran que el promotor de *nis*A puede inducirse por galactosa y/o lactosa aun en ausencia de la señal de transducción mediada por NisRK y de nisina madura. La inducción mediada por galactosa del promotor *nis*A ocurre por medio de la unión de un regulador a la región de repeticiones directas TCT posicionadas a -107 bp desde el punto de inicio de la transcripción, el mismo sitio al que se une el activador transcripcional generado por la presencia de nisina (Li 2006). Ensayos de producción de nisina Z por *L. lactis* en presencia de diferentes fuentes de carbono muestran que las células que crecen en sacarosa o glucosa generan mayor masa celular que aquellas que crecen en lactosa, pero rinden menor actividad en bacteriocina. Estos datos indican que la lactosa es una fuente de carbono más apropiada para la producción de nisina Z, debido a que inducen la transcripción de *nis*Z (Cheigh *et al* 2005).

Inmunidad. Las membranas celulares de las cepas productoras de nisina son sensibles a nisina, y para protegerla, estos microorganismos poseen un complejo mecanismo de resistencia. El mecanismo de autoprotección, o inmunidad, involucra la expresión de cuatro genes del operón nisina. Tres de las proteínas de inmunidad, *NisF*, *NisE* y *NisG*, forman un complejo transportador tipo ABC (Siegers 1995). *NisF* es una proteína citoplasmática de unión a ATP. *NisE* y *NisG* son proteínas hidrofóbicas integrales de membrana. La función del complejo NisFEG está asociada al transporte de nisina al medio ambiente externo (Stein *et al* 2003).

La cuarta proteína de inmunidad *NisI*, codificada por el gen *nisI*, es una lipoproteína que se une al lado extracelular de la membrana (Kuipers *et al* 1993, Qiao *et al* 1995). La NisI madura es una proteína hidrofílica negativamente cargada que puede formar complejos con la nisina. NisI purificada no posee la capacidad de formar complejos con subtilisina, una bacteriocina estrechamente relacionada, demostrando que actúa como una proteína secuestrante de nisina altamente específica (Li *et al* 2006).

De esta manera, NisI parece tener como función disminuir las moléculas de nisina libres (Stein *et al* 2003).

Numerosos estudios indican que el máximo nivel de inmunidad contra nisina ocurre cuando están presentes NisI y NisFEG. Aunque por separado proveen inmunidad parcial, NisI juega un rol predominante en la inmunidad (Ra *et al* 1999).

Cuando el transposón nisina entra en una célula no productora por conjugación, los genes *nis*RK se expresan inicialmente a través de su promotor constitutivo, iniciando el sistema de inducción de dos componentes. El promotor *nis*A no se expresa sin inducción, por lo tanto es necesaria la exposición a nisina externa o a un mecanismo alternativo de inducción, como en el caso del metabolismo de galactosa (Chandrapati *et al* 2002). La existencia de un promotor *nis*I puede explicar como la célula puede protegerse cuando se encuentra por primera vez con nisina, y podría ser resultado de una respuesta adaptativa para incrementar la movilidad horizontal hacia otras especies. La existencia de promotores internos en *clusters* génicos permitiría la expresión de genes distantes a la zona promotora en diferentes condiciones fisiológicas (Li *et al* 2006).

Mecanismo de la actividad biocida. La nisina puede actuar como bactericida por medio de tres formas de acción: (i) formación de poros en la membrana celular dependientes del voltaje, (ii) prevención de la síntesis de peptidoglicano e (iii) inducción de autolisis de células susceptibles (Takala 2005).

Un elevado número de lantibióticos se unen a una molécula tipo lipídica llamada lípido II que juega un rol esencial en la síntesis de la pared bacteriana. Esta molécula provee los sustratos para la maquinaria de síntesis celular transportando los bloques de construcción básicos del peptidoglicano a través de la membrana plasmática y es un blanco de acción ideal para antibióticos.

Los lantibióticos tipo A, como la nisina, se unen al undecaprenil–pirofosforil–MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc, o lípido II, y despliegan dos modos de acción: in-

hiben la síntesis del peptidoglicano y usan el lípido II como un sitio de unión de alta afinidad para formar poros en la membrana (Beukink *et al* 2006). Para la formación del poro e inhibición de la síntesis de la pared celular, la nisina se une, en concentraciones del orden nanomolar, al lípido II por el extremo N-terminal con una estequiometría 1:1, seguida por la interacción del extremo C-terminal con la membrana y su inserción posterior (Hsu *et al* 2002). El lípido II permanece unido a la nisina como uno de los componentes del poro formado (Breukink *et al* 2003) (Fig. 1.13).

Ocho moléculas de nisina y 4 de lípido II forman un poro complejo de 2 nm de diámetro. Inicialmente se unen una molécula de nisina con una de lipido II y posteriormente se incorpora una segunda molécula de nisina. La formación del poro por la nisina es posible gracias a la región flexible de la molécula, que facilita la transferencia del C-terminal a través de la membrana para adoptar una orientación transmembrana. El mecanismo parece ser un proceso concertado en el que varias moléculas de nisina forman el complejo seguido por la inserción cooperativa y la translocación del C-terminal para obtener la orientación transmembrana final (Hasper *et al* 2004, Hsu *et al* 2004). La interacción de la nisina con el lípido II podría explicar la baja

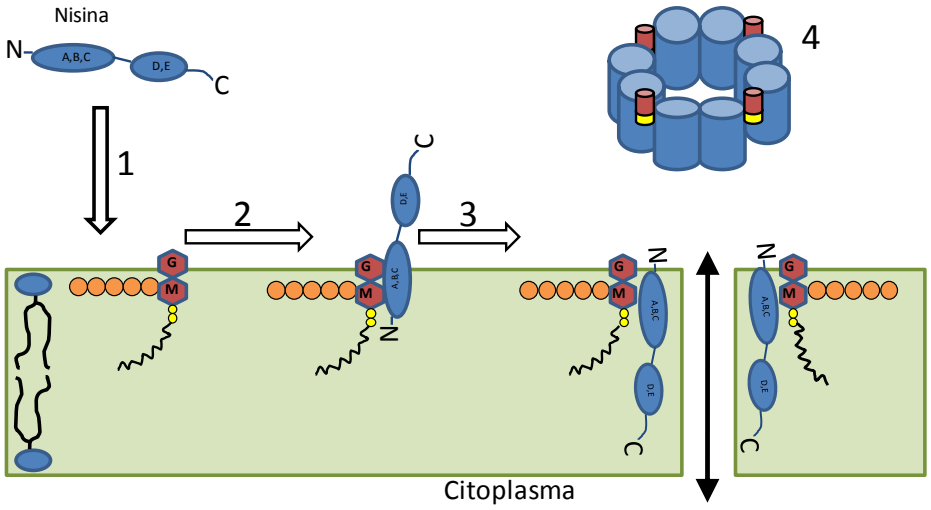


Figura 1.13
Mecanismo de formación de poro de la nisina. La nisina registra la membrana plasmática bacteriana (1), donde se une al lípido II a través de sus anillos N-terminales (2). Posteriormente, la molécula de nisina toma una orientación transmembrana que permite la formación del poro (3). Este poro, de 2 nm de diámetro, consiste en un complejo nisina-lípido II de estequiometría 8:4 (Adaptado de Breukink et al 2006)

actividad contra organismos que no contienen esta molécula blanco en su superficie, como levaduras y hongos, e inclusive el bajo nivel de toxicidad observado en animales (Wiedemann *et al* 2001).

A nivel micromolar, la nisina puede formar poros en ausencia de lípido II. Los poros formados de esta manera son esencialmente selectivos para aniones (Wiedermann *et al* 2001). La formación del poro se inicia por atracción electrostática de la molécula de bacteriocina a los fosfolípidos presentes en la superficie bacteriana. Luego de la inserción en la membrana la nisina atraviesa la bicapa lipídica y fuerza la apertura de un poro transciente, impulsada por el potencial de membrana (Brötz *et al* 2000).

La formación de poros por nisina produce un rápido eflujo de moléculas pequeñas y metabolitos, como iones, nucleótidos y aminoácidos, y disipa la fuerza protomotriz, cesando todos los procesos biosintéticos y conduciendo a la muerte celular (Reunanen 2007).

Otro mecanismo bactericida mediado por nisina es la inducción de autolisis. La nisina actúa inactivando grupos sulfhídricos de la membrana citoplasmática, causando la pérdida del contenido celular y la liberación de dos enzimas que hidrolizan la pared celular, la N-acetilmuramoil-L-alanin amidasa y N-acetilglucosaminidasa. La nisina es capaz de inducir la autolisis en *Staphylococcus simulans* (Bierbaum *et al* 1991), un efecto que resulta de la naturaleza fuertemente catiónica de la bacteriocina.

Resistencia. La resistencia a nisina no es dependiente del nivel de lípido II en membrana. Sin embargo, cambios en la arquitectura de la pared por incrementos en la producción de sus componentes, ya sean polisacáridos, ácidos lipoicos u otros, aumentan la resistencia a nisina (Montovani *et al* 2001). Esto indica que la resistencia a nisina podría estar asociada a la composición de la pared.

Aplicaciones de la nisina. Desde hace más de medio siglo que se exploran aplicaciones prácticas para la nisina, como tratamiento para la mastitis y preservación

de alimentos. En 1957 Aplin y Barret reportaron la formulación de las primeras preparaciones comerciales (Delves-Broughton *et al* 1996).

Aplicaciones en alimentos. En las últimas décadas, los consumidores han comenzado a interesarse en los posibles efectos adversos sobre la salud de los aditivos químicos presentes en los alimentos industrializados. Como resultado, la creciente demanda por alimentos mínimamente procesados con vida útil extendida, estimuló la búsqueda de preservativos naturales y efectivos. La biopreservación se refiere al uso de microorganismos antagonistas o sus productos metabólicos para inhibir o destruir microorganismos indeseables en alimentos para aumentar la seguridad de los alimentos y extender su vida útil.La nisina puede considerarse como un biopreservativo que cumple con estos requerimientos, debido principalmente a que, además de ser un producto natural, se inactiva fácilmente por proteasas intestinales (Cotter *et al* 2005).

Se pueden utilizar tres estrategias de aplicación de bacteriocinas para la biopreservación de alimentos (Schillinger 1996):

(i) Inoculación del alimento con la bacteria productora de la bacteriocina, para que ésta crezca en el producto y genere el biopreservante.

(ii) Adición de bacteriocina purificada o semi-purificada al alimento.

(iii) Utilización de un producto previamente fermentado con una cepa productora de bacteriocina como ingrediente en el procesamiento del alimento.

La nisina puede asegurar vida útil a quesos procesados pasteurizados, enlatados de frutas y vegetales, leches no-fermentadas, productos lácteos, carnes, pescados, y cervezas. También se utiliza para prevenir la fermentación maloláctica espontánea en vinos luego de terminada la fermentación alcohólica.

La nisina ejerce su acción antibacteriana sobre bacterias Gram positivas, incluyendo otras BAL, patógenos vegetativos como *Listeria*, *Staphilococcus* y *Micobacterium*, y bacterias formadoras de esporas como *Bacillus* y *Clostridium*. Las esporas de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

éstos microorganimos son más sensibles a nisina que sus células vegetativas; sin embargo su efecto es esporostático, por lo que para ser efectiva requiere de su presencia contínua (Nissen *et al* 2001, Thomas *et al* 2002). El daño por calentamiento incrementa la sensibilidad a nisina, de forma que la nisina es efectiva contra esporas en alimentos procesados por calor. Este efecto esporostático parece ser el resultado de la unión de la nisina a grupos sulfhidrilos de las proteínas (Morris *et al* 1984).

La limitación principal para la aplicación de bacteriocinas en alimentos es su espectro relativamente acotado de acción. Por ello existen diferentes estrategias buscando efectos sinérgicos entre la nisina y otros compuestos que mejoren la acción de la bacteriocina, como el uso de formulaciones de lisozima/nisina (Monticello 1989), EDTA/nisina o lactoferrina/nisina (Branen *et al* 2004).

La nisina usualmente no tiene efecto sobre bacterias Gram negativas, levaduras y mohos. A pesar de ello, las bacterias Gram negativas pueden sensibilizarse a nisina por permeabilización de la membrana externa por calentamiento subletal, congelamiento o agentes quelantes (Delves-Broughton *et al* 1996).

La nisina, y otros lantibióticos, pueden utilizarse también como aditivos en alimentos para animales, debido a su actividad contra bacterias del rumen para inhibir la formación de metano, descender la proporción de acetato a propionato y prevenir la deaminación de aminoácidos (Callaway *et al* 1997).

Aspectos regulatorios. La nisina se utiliza como preservativo en alimentos desde 1950, y su uso está aprobado en más de 50 países. La aceptación internacional data de 1969 por el Comité experto en aditivos alimentarios de la FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*). En 1989 la nisina se calificó con el estatus de GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA, permitiendo su uso en quesos pasteurizados para prevenir el crecimiento de *Clostridium botulinum* y en frutas, vegetales o carnes (Hurst *et al* 1993).

La nisina está permitida en quesos procesados en Australia, Francia y Gran Bretaña sin límite máximo. En Estados Unidos, el límite máximo es de 10000 UI/g; en Rusia 8000 UI/g, mientras que en Argentina, Italia y Méjico el límite es de 500 UI/g para quesos procesados y otros productos (Chikindas *et al* 2002). Evaluaciones toxicológicas con nisina purificada muestran muy baja toxicidad en modelos animales (Frazer *et al* 1962).

Ejemplos de alimentos en países que está aprobado el uso de nisina como aditivo son sopas enlatadas (Australia), hielo para almacenamiento de peces frescos (Bulgaria), alimentos para niños, mayonesa (República Checa), y batidos (España) (Hurst *et al* 1993). La mayoría de los productos aprobados son productos lácteos, especialmente quesos, y productos enlatados.

La nisina es la bacteriocina más importante comercialmente. No obstante, otras bacteriocinas se encuentran caracterizadas y propuestas como alternativa. En la actualidad, el producto comercial más conocido es el Nisaplin™, con nisina A 2.5% como agente activo en 77.5% de NaCl.

Potenciales aplicaciones de nisina en terapéutica. El creciente interés en el uso de bacteriocinas en terapéutica se debe al notable incremento en el desarrollo de resistencia a antibióticos por sobreprescripción, y a la incapacidad de la industria farmacéutica para proveer antibióticos nuevos suficientemente rápido (Cotter *et al* 2005). Una de las estrategias posibles es la implantación de microflora indígena productora de bacteriocinas de baja virulencia que sea capaz de interferir en la colonización e infección de especies patógenas (Jack *et al* 1995).

La nisina posee un gran potencial para el tratamiento de enfermedades sistémicas causada por estreptococos resistentes a antibióticos. Exhibe una alta actividad contra aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae*, incluyendo cepas resistentes a penicilina (Goldstein *et al* 1998). También muestra ser activa contra patógenos Gram positivos resistentes a multidrogas, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* (Severina *et al* 1998). Actualmente, se encuentra próxima

a entrar en el mercado una preparación tópica para combatir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* basado en esta bacteriocina como componente principal (Lopez *et al* 2008).

La nisina también juega un rol en la prevención de enfermedades periodentales, una de las mayores causas de la pérdida de dientes en adultos. Se ha analizado su efectividad contra el desarrollo de placa dental y gingivitis (Howell *et al* 1993) y se utiliza como aditivo en cremas dentales.

La nisina puede aplicarse para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. La actividad de la nisina contra bacterias Gram negativas, como *Helicobacter pylori*, puede mejorarse por la presencia de quelantes. Las ventajas del uso de nisina como tratamiento potencial para úlceras pépticas incluyen su estabilidad a pH ácidos y su resistencia a la proteasa estomacal pepsina (Blackburn *et al* 1989). Como es degradada en el intestino, reduce los efectos negativos sobre la microflora intestinal (Joerger *et al* 2000). Adicionalmente, es inhibitoria del crecimiento de *Clostridium difficile*, microorganismo asociado a enterocolitis inducida por antibióticos (Kerr *et al* 1997).

La nisina posee gran efectividad para inhibir un amplio rango de patógenos causantes de mastitis (Broadbent *et al* 1989). Dos productos comerciales usados en la prevención de esta patología, Consept® y Wipe-Out®, poseen nisina como componente activo.

Finalmente, pero no menos interesante, la nisina posee actividad anticonceptiva y protectora vaginal en estudios con modelos animales (Reddy *et al* 2004).

REFERENCIAS

Abu-Lail N., Camesano T. Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *E. coli* JM109. Environ. Sci. Technol. (2003) 37:2173-2183.

Aires J., Kfhler T., Nikaido H., Ple´siat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *P. aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother (1999) 43:2624– 8.

Alessandrini A., Facci P. AFM: a versatile tool in biophysics. Meas. Sci. Technol. (2005) 16:R65–92.

Beard B., Sheldon B., Foegeding P. Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverages supplemented with nisin. J. Food Prot. (1999) 62:5; 484-491.

Berlett B., Stadman E. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. J. Biol. Chem. (1997) 272: 20313-20316.

Betigeri S, Neau S. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogels beads. Biomaterials (2002) 23: 3627-3636.

Beukink E. A lesson in efficient killing from two-component lantibiotics. Molecular Microbiology (2006) 61:2 271-273.

Bhattacharya A. Radiation and industrial polymers. Progress in Polymer Science (2000) 25: 371-401.

Bierbaum G., Giesecke U., Wandrey C. Analysis of nucleotide pools during protease production with Bacillus licheniformis. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1991) 35:725-730.

Blackburn P., Polak J., Gusik S., Rubino S. Nisin composition for use as enhanced, broad range bacteriocins. International Patent Application No. PCT/US89/02625 (1989).

Blanco R., Terreros P., Fernandez Perez M., Otero C., Diaz Gonzalez G. Fictionalization of mesoporous sílica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalysts. J. Mol. Catal. B Enzymatic (2004) 30: 83-93.

Bolotin A., Mauger S., Malarme K., Ehrlich S., Sorokin A. Low-redundancy sequencing of the entire *L. lactis* IL1403 genome. Antonie van Leeuwenhoek (1999) 76: 27-76.

Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S., Sorokin A. The complete genome sequence of lactic acid bacterium *L. lactis* ssp. lactis IL1403. Genome Res. (2001) 11: 731-753.

Bos R., van der Mei H., Busscher H. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiol. Rev. (1999) 23: 179:230.

Branen J., Davidson M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. Int. J. Food Microbiol. (2004) 90: 63-74.

Breukink E., van Heusden H., Vollmerhaus P., Swiezewska E., Brunner L., Walker S., Heck A., de Kruijff B. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced, by nisin in bacterial membranes. J. Biol. Chem. (2003) 278: 19898-19903.

Briggs D., Brewis D., Dahm R., Fletcher I. Analysis of the surface chemistry of oxidized polyethylene: comparison of XPS and ToF-SIMS. Surf. Interface Anal. (2003) 35: 156–67.

Broadbent J., Chou Y., Gillies K., Kondo K. Nisin inhibits several Gram-positive, mastitis-causing pathogens. Journal of Dairy Science (1989) 72:12; 3342-3345.

Brötz H., Sahl H. New insights into the mecanism of action of lantibiotics- diverse biological effects by binding to the same molecular target. J. Antimicrobial Chemotherapy (2000) 46: 1-6.

Buchholz K., Kashe V., Bornscheuer U. Biocatalysts and Enzyme Technology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2005).

Burling F., Kniewel R., Buglino J., Chadha T., Beckwith A., Lima C. Structure of *Escherichia coli* uridine phosphorylase at 2.0A. Acta Cryst. (2003). D59: 73-76.

Callaway T., Carneiro De Melo A., Russell J. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations *in vitro*. Curr. Microbiol. (1997) 35:90-96

Camperi M., Navarro del Cañizo A., Smolko E., Grasselli M., Cascone O. Chromatographic characterization of immobilized metal ion hollow-fiber affinity membranes obtained by direct grafting. Journal of Liquid Chromatography (1998) 21: 1283-1294.

Cao L. Carried-bound immobilized enzymes. Principles, applications and design. Wiley-VCH (2005).

Carbajal M. L. Bioreconocimiento sobre superficies poliméricas: aplicaciones en biotecnología. Tesis Doctoral (2008) Universidad Nacional de Quilmes.

Carbajal M. L., Smolko E., Grasselli M. Oriented immobilization of protein on grafted polymers. Nuc. Instr. Meth. Phys. Res. B (2003) 208: 416-423.

Carr F., Chill D., Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical Reviews in Microbiology. (2002) 28:4; 281-370

Chan C., Ko T., Hiraoka H. Polymer surface modification by plasmas and photons. Surf. Sci. Rep. (1996) 24:3–54.

Chandrapati S., O´Sullivan D. Characterization of the promoter regions involved in galactose- and nisin-mediated induction of the nisA gene in *L. lactis* ATCC 11454. Mol. Microbiol. (2002) 46: 467-477.

Cheigh C., Park H., Choi H., Pyun Y. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *L. lactis* subsp. *lactis* A164. Biotechnology Letters 27: 155-160 (2005).

Cheigh C., Pyun Y. Nisin biosynthesis and its properties. Biotechnology Letters (2005) 27: 1641-1648.

Chen H., Hoover D. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (2003) 2: 82-100.

Cheng J., Wei C., Hsu K., Young T. Direct-write laser micromachining and universal surface modification of PMMA for device development. Sens Actuators B (2004) 99:186–96.

Chikindas M., Montville T. Perspectives for applications of bacteriocins as food preservatives. In: Juneja V., Sofos J. editors. Control of foodborne microorganisms. New York: Marcel Dekker, Inc. (2002) 303-321.

Chilkoti A., Ratner B., Briggs D. Plasma-deposited polymeric films prepared from carbonyl-containing volatile precursors—Xps chemical derivatization and static sims surface characterization. Chem. Mater. (1999) 3:51–61.

Chmielewski A. Radiation technologies: past, present and future. Radiation Physics and Chemistry (2004) 71: 16–20.

Choi J. H., Keum K. C., Lee S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *E. coli*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2008) 14:48–58.

Chu Y., Hsu C., Soma P., Lo Y. Immobilization of bioluminiscent *E. coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethylenimine. Bioresource Technology (2009) 100: 3167-3174.

Cocaign-Bousquet M., Even S., Lindley N., Loubiere P. Anaerobic sugar catabolism in *L. lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2002) 60: 24-32.

Coquet L., Cosette P., Quillet L., Petit F., Junter G., Jouenne T. Occurrence and phenotypic characterization of *Y. ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. Appl. Environ. Microbiol. (2002) 68:470– 5.

Cotter P., Hill C., Ross R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nature Reviews of Microbiology (2005) 3: 777-788.

Crow V., Davey G., Pearce L., Thomas T. Plasmid linkage of the D-tagatose 6-phosphate pathway in *S. lactis*: effect on lactose and galactose metabolism. J. Bacteriol. (1983) 153: 76-83.

Dargaville G., Hill D., Whittaker A. High energy radiation grafting of fluoropolymers. Progress in Polymer Science (2003) 28: 1355–1376.

de Vos W. Gene expression systems for lactic acid bacteria. Curr. Op. Microbiol. (1999) 2: 289-295.

de Vos W. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek (1996) 79: 223-242.

de Vos W., Vaughan E. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. (1994) 15: 217-237.

Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R. J., Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek (1996) 69: 193-202.

Dervakos G., Webb C. On the merits of viable-cell immobilisation. Biotechnol. Adv. (1991) 9:559 –612.

Desai S., Singh R. Surface modification of polyethylene. In: Albertsson AC, editor. Long-term properties of polyolefins. New York: Springer (2004) 231–93.

Dinklage A., Klinger T., Marx G., Schweikhard L. Plasma physics. New York: Springer (2005).

Dodd H., Horn N., Chan W., Giiffard C., Bycroft B., Roberts G., Gasson M. Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. Microbiology (1996) 142:2385-2392.

Doleyres Y., Lacroix C. Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol. (2004).

Duwat P., Cesselin B., Sourice S., Gruss A. *L. lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. Int. J. Food Microbiol. (2000) 55: 83-86.

Duwat P., Ehrlich S., Gruss A. The recA gene of *L. lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. Mol. Microbiol. (1995) 17: 1121-1131.

Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubiere P., Gruss A. Respiration capacity of the fermenting bacterium *L. lactis* and its positive effects on growth and survival. J. Bacteriol. (2001) 183: 4509-4516.

Duwat P., Sourice S., Gruss A. Process for preparing starter cultures of lactic acid bacteria (1999) WO 00/05342.

Dykes G. Bacterioncins: ecological and evolutionary significance. Trends Ecol. Evol. (1995) 10:5; 186-189.

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A.Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews (2000) 24: 85-106.

Even S., Lindley N., Cocaign-Bousquet M. Molecular physiology of sugar catabolism in *L. lactis* IL1403. J. Bacteriol. (2001) 183: 3817-3824.

Extrand C. Contact angles and their hysteresis as a measure of liquid–solid adhesion. Langmuir (2004) 20: 4017–21.

Farr S., Kogoma T. Oxidative stress responses in *E. coli* and *S. typhimurium*. Microbiol. Rev. (1991) 55: 561-585.

Frazer A., Sharratt M., Hickman J. The biological effects of food additives. I. Nisin. J. Sci. Food Agric. (1962) 13: 32-42.

Freeman A. Gel entrapment of whole cells and enzymes in cross-linked, prepolymerized polyacrylamide hydrazide. Ann. N. Y. Acad. Sci. (1984) 434: 418–426.

Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. (1998) 201: 1203-1209.

Garrigues C., Loubiere P., Lindley N., Cocaign-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *L. lactis*: predominant role of the NADH/NAD^+ ratio. J. Bacteriol. (1997) 179: 5282-5287.

Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J., Rezaiki L., Lamberret G., Sourice S., Duwat P., Gruss A. Respiration capacity and consequences in *L. lactis*. Antonie Van Leeuwenhoek (2002) 82: 263-269.

Gellissen G. Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim (2005).

Gestrelius S. Immobilized nonviable cells for use of a single or a few enzyme steps. In: Mattiasson B, editor. Immobilized Cells and Organelles, vol. 2. Boca Raton (FL)7 CRC Press (1983) 1 –22.

Goddard J., Hotchkiss J. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. Prog. Polym. Sci. (2007) 32: 698-725.

Goldstein B., Wei J., Greenberg K., Novick R. Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1998) 42:2; 277-278.

Gottenbos B., Busscher H., van der Mei H., Nieuwehuis P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centeredinfections. J. Mat. Sci.: Mat. In Med. (2002) 13:717-722.

Gottenbos B., Grijpma D.,van der Mei H., Feijnen J., Busscher H. Antimicrobial effects of positively charged surface on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. J. Antimicrob. Chemother. (2001) 48: 7-13.

Grasselli M., Camperi A., Wolman F., Smolko E., Cascone O. Immobilized metal ion affinity hollow-fibre membranes obtained by the direct grafting technique. Radiation Physics and Chemistry (1999) 55:2; 203-208.

Grogan G. Practical Biotransformations. A beginner´s Guide. Wiley Ed (2009).

Grossiord B., Luesink E., Vaughan E., Arnaud A., de Vos W. Characterization, expression, and mutation of the *L. lactis* galPMKTE genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. J. Bacteriol. (2003) 185: 870-878.

Guder A., Wiedemann I., Sahl H. Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics. Biopolymers (2000) 55: 62-73.

Guédon E., Renault P., Ehrlich S., Delorme C. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *L. lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. J. Bacteriol. (2001) 183: 3614-3622.

Harvey D. Modern analytical chemistry. New York: McGraw-Hill (2000).

Hayashi H., Tsuneda S., Hirata A., Sasaki H. Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesión behaviors in terms of DLVO theory. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2001) 222: 149-157.

Hasper H., de Kruijff B., Breukink E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. Biochemistry (2004) 43: 11567-11575.

Henle E., Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. (1997) 272: 19095-19098.

Hermansson M. The DVLO theory in microbial adhesion. Colloids and surfaces B: Biointerfaces (1999) 14: 105-119.

Hibiya K., Tsuneda S., Hirata A. Formation and characteristics of nitrifying biofilm on a membrane modified with positively-charged polymer chains. Colloids Surf. B Biointerfaces (2000) 18: 105- 112.

Hirsch A., Grinsted E., Chapman H., Mattick A. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. J. Diary Res. (1951) 18: 205-206.

Hoffman A. Use of radiation technology in preparing materials for bioengineering and medical science. Ind. Appl. Radiat. Technol. Proc. Int. Conf. (1982).

Hori K., Matsumoto S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. Biochemical Engineering Journal (2010) 48: 424-434.

Howell T., Fiorellini J., Blackburn P., Projan S., de la Harpe J., Williams R. he effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. Journal of Clinical Periodontology (1993) 20:5; 335-339.

Hsu C. Chapter 15: infrared spectroscopy. In: Settle F, editor. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, Inc. (1997) 247–83.

Hsu S., Breukink E., de Kruijff B., Kaptein R., Bonvin A., van Nuland N. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. Biochemistry (2002) 41: 7670-7878.

Hsu S., Breukink E., Tischenko E., Lutters M., de Kruijff B., Kaptein R. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. Nat. Struct. Mol. Biol. (2004) 11: 963-967.

Huang Y., Yang S. Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. Biotechnol. Bioeng. (1998) 60: 498-507.

Huang J., Yamaji H., Fukuda H. Immobilization of *E. coli* cells using porous support particles coated with cationic polymers. J. Biosci. and Bioeng. (2007) 104:2; 98–103.

Hugenholtz J., Kleerebezem M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentation. Curr. Opin. Biotechnol. (1999) 10: 492-497.

Hurst A. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. (1981) 27: 85-123.

Hurst A., Hoover D. Nisin. In: Davidson P. Branen A., editors. Antimicrobials in foods. New York: Marcel Dekker, Inc. (1993) 369-407.

Immonen T., Saris P. Characterization of the nisFEG operon of the nisin Z producing *L. lactis* subsp. lactis N8 strain. DNA Seq. (1998) 9, 263-274.

Jack R., Tagg J., Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. (1995) 59: 171-200.

Jamet E. Etude de l'expression et de la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme carboné chez *L. lactis*. Institut National Agronomique de Paris-Grignon (2001).

Joerger R., Hoover D., Barefoot S., Harmon K., Grinstead D., Nettles-Cutter C. Bacteriocins. In: Lederberg, editor. Encyclopedia of microbiology, vol. 1, 2º ed. San Diego: Academic Press (2000) 383-397.

Junter G., Jouenne T. Immobilized viable microbial cells : from the process to the proteome... or the cart before the horse. Biotechnology Advances (2004) 22: 633-658.

Junyan L., Guangfei Q., Ping N. Cell immobilization technology and application. GMSARN International Conference on Sustainable Development: Issues and Prospects for GMS (2006).

Kashket E., Wilson T. Proton-coupled accumulation of galactoside in *Streptococcus lactis* 7962. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1973) 70: 2866-2869.

Katsikogianni M., Missirlis Y. Concise review of mechanisms of bacterial adhesión to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. European Cells and Materials (2004) 8: 37-57.

Kawai T., Sugita K., Saito K., Sugo T. Extension and shrinkage of polymer brush grafted onto porous membrane induced by protein binding. Macomolecules (2000) 33: 1306-1309.

Kerr K., Copley R., Wilcoy M. Activity of nisin against *Clostridium difficile*. Lancet (1997) 349:1026-1027.

Kilstrup M., Hammer K., Ruhdal Jensen P., Martinussen J. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews (2005) 29:555-590.

Kim Y., Kang I., Huh M., Yoon S. Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/ or heparin using plasma glow discharge. Biomaterials (2000) 21:121–30.

Klaenhammer T. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. (1993) 12: 39-86.

Klaenhammer T., Barrangou R., Buck B., Azcarate-Peril M, Altermann E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiolgy Reviews (2005) 29: 393-409.

Kleerebezem M., de Vos W., Kuipers O. The lantibiotics nisin and subtilisin act as extracellular regulators of their own biosynthesis. In: Dunny G, Winans S. eds. Cell-cell signaling in bacteria. ASM Press: Washington DC (1999) 159-174.

Kleerebezem M., Hols P., Hugenholtz J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *L. lactis* by metabolic engineering. Enzyme Microb. Technol. (2000) 26: 840-848.

Kleerebezem M., Quadri L. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. Peptides (2001) 22: 1579-1596.

Köhler T., Michea-Hamzehpour M., Epp S., Pechere J. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. Antimicrob. Agents Chemother (1999) 43:424– 7.

Koponen O., Tolonen M., Qiao M., Wahlström G., Helin J., Saris P. Nis B is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. Microbiology (2002) 148: 3561-3568.

Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I., Marchant R., Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiology (2004) 21: 377–397.

Kuipers O. Bierbaum G., Ottenwalder B., Dodd H., Horn N., Metzger J., Kupke T., Gnau V., Bongers R., van der Bogaard P., Kosters H., Rollema H., de Vos W., Siezen R., Jung G., Götz F., Sahl H., Gasson M. Protein engineering of lantibiotics. Antonie van Leeuwenhoek (1996) 69: 161-170.

Kuipers O., Beerthuyzen M., De Ruyter G., Luesink E., De Vos W. Autorregulation of nisin biosynthesis in L. lactis by signal transduction. J. Biol. Chem. (1995) 270: 27299-27304.

Kuipers O., Beerthuyzen M., Siezen R., de Vos W. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *L. lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. Eur. J. Biochem. (1993) 216:281-291.

Kunji E. Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek (1996) 70: 187-221.

Langella P., Le Loir Y. Heterologous protein secretion in *L. lactis*: a novel antigen delivery system. Braz. J. Med. Biol. Res. (1999) 32: 191-198.

Lee W., Furusaki S., Saito K., Sugo T., Makuuchi K. Adsorption kinetics of microbial cells onto a novel brush-type polymeric material prepared by radiation-induced grafo polymerization. Biotechnology Progress (1996) 12: 178-183.

Li B., Logan B. Bacterial adhesión to glass and metaloxide surfaces. Colloids Surf B Biointerface (2004) 36: 81-90

Li H., O´Sullivan D. Identification of a nisA promotor within the nisABCTIP operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. Journal of Bacteriology (2006) 188: 24 8496-8503.

Liese A., Seelbach K., Wandrey C. Industrial Biotransformations, 2º Ed. Wiley-VCH (2006).

Liu W., Hansen J. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibioic produced by *L. lactis*. Appl. Environ. Microbiol. (1990) 56: 2551-2558.

Liu Y., Tay J. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. Water Res. (2002) 36: 1653-1665.

Liu Y., Yang S., Li Y., Xu H., Qin L., Tay J. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. Journal of Biotechnology (2004) 110: 251-256.

Lodato P., Segovia De Huergo M., Buera M. Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freezedried in different sugar and polymer matrices. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 215–220.

Loo C., Corliss D., Ganeshkumar N. *S. gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J. Bacteriol. (2000) 182:1374 –82.

Lopez J., Ochoa A., Santoyo G., Anaya J., Medina E., Martinez M., Loeza P. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (2008) 39:3; 49-57.

Marolia K., D´Souza S. A simple technique for the immobilization of lysozyme by cross-linking of hen egg white foam. J. Biochem. Biophys. Methods (1993) 26:2-3; 143-147.

Martin A. Bioconversion of waste materials to industrial products. Elsevier Applied Science, London, New York (1991) 63–116.

Mazzei G., Chappa V., del Grosso M., Fernández A. Grafting on nuclear tracks using the actives sites than remain after the etching process. NIMBS (2006) 251: 99-103.

McAuliffe O., Ross R., Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiology Reviews (2001) 25: 285-308.

Melchiorsen C., Jokumsen K., Villadsen J., Israelsen H., Arnau J. The level of pyruvate-formate lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation in *L. lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2002) 58: 338-344.

Ming F., Whish W., Hubble J., Eisenthal R. Estimation of parameters for cell-surface interactions: maximum binding force and detachment constant. Enzyme Microbiol. Technol. (1998) 22: 94-99.

Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J., Le Loir Y., Oliveira S., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *L. lactis*. Gen. Mol. Res. (2003) 2:4; 348-359.

Monticello D. Control of microbial growth with nisin/lysozyme formulations. European Patent EP0374823 (1989).

Montovani H., Rusell J. Nisin resistance of *S. bovis*. Applied and Environmental Microbiology (2001) 67:2; 808-813.

Morency H., Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C., Lavoie M. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. Canadian Journal of Microbiology (2001) 47: 322–331.

Morikawa M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering (2006) 101:1; 1-8.

Morris S., Walsh R., Hansen J. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydril groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. J. Biol. Chem. (1984) 201: 581-584.

Moskovitz Y., Srebnik S. Mean-field model of immobilized enzymes embedded in a grafted polymer layer. Biophys. J. (2005) 89:22–31.

Mulders J., Boerrigter I., Rollema H., Siezen R., de Vos W. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a structural nisin variant. Eur. J. Biochem. (1991) 201: 581-584.

Nagayasu M.,Krisna Wardani A., Nagahisa K., Shimizu H., Shioya S. Analysis of hemin effect on lactate reduction in *L. lactis*. Journal of Bioscience and Bioengineering (2007) 103: 6; 529-534.

Nahar P., Naqvi A., Basir S. Sunlight-mediated activation of an inert polymer surface for covalent immobilization of a protein. Anal. Biochem. (2004) 327:162–4.

Nes I., Diep D., Havarstein L., Brurberg M., Eijsink V., Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek (1996) 70: 113-128.

Nes I., Holo H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers (2000) 55: 50-61.

Neves A, Pool W., Kok J., Kuipers O., Santos H. Overview on sugar metabolism and its control in *L. lactis* - The input from in vivo NMR. FEMS Microbiology Reviews (2005) 29: 531-554.

Nicolella C., van Loosdrecht M., Heijnen S. Particle-based biofilm reactor technology. Trends Biotechnol. (2000) 18:312– 20.

Nissen H., Holo H., Axelsson L., Blom H. Characterization and growth of Bacillus spp. in heat-treated cream with and without nisin. Journal of Applied Microbiology (2001) 90:4; 530–534.

Norton S., D'Amore T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. Enzyme Microb. Technol. (1994) 16:365– 75.

Novak L., Loubiere P. The metabolic network of *L. lactis*: distribution of (14)C-labeled substrates between catabolic and anabolic pathways. J. Bacteriol. (2000) 182: 1136-1143.

Okamura Y., Maekawa I., Teramura Y., Maruyama H., Handa M., Ikeda Y., et al. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen gamma chain dodecapeptide *in vitro* and *in vivo*. Bioconjugate Chem. (2005) 16: 1589–96.

Oliveira A., Nielsen J., Förster J. Modelling *L. lactis* using a genome-scale flux model. BMC Microbiology (2005) 5: 39.

Otto K., Silahvy T. Surface sensing and adhesion of *E. coli* under control of the Cpx signalling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2002) 99:2287– 92.

Palmfeldt J., Paese M., Hahn-Hagerdal B., van Niel E.W. The pool of ADP and ATP regulates anaerobic product formation in resting cells of *L. lactis*. Appl. Environ. Microbiol. (2004) 70: 5477-5484.

Park J., Chang H. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnol. Adv. (2000) 18: 303–319.

Pilkington P., Margaritis A., Mensour N. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. Crit. Rev. Biotechnol. (1998) 18:237– 55.

Pramod T., Lingappa K. Immobilization of *A. niger* in polyurethane foam for citric acid production from carob pod extract. Am. J. Food Technol. (2008) 3: 252-256.

Qiao M., Immonen T., Koponen O., Saris P. The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *L. lactis* N8 expressed in E. coli and L. lactis. FEMS Microbiology Letters (1995) 131: 75-80.

Qiao M., Ye S., Koponen O., Ra R., Usabiaga M., Immonen T., Saris P. Regulation of the nisin operons in *L. lactis*. J. Appl. Bacteriol. (1996) 80: 626-634.

Ra R., Beerthuyzen M., de Vos W., Saris P., Kuipers O. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *L. lactis* on nisin production and producer immunity. Microbiology (1999) 145: 1227-1233.

Raijnaarts H., Norde W., Bouwe E., Lyklema J., Zehnder A. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. Colloids Surf. B. Biointerfaces (1999) 14: 179-195.

Raijnaarts H., Norde W., Bouwer E., Lyklema J.,Zehnder A. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. Colloids Surf. B.Biointerfaces (1999) 14: 179-195.

Reddy K., Aranha C., Gupta S., Yedery R. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits. in vitro and in vivo studies. Reproduction 128: 117-126 (2004).

Redman J., Walker S., Elimelech M. Bacterial adhesion and transport in porous media: role of the secondary energy minimum. Environ. Sci. Technol. (2004) 38:1777-1785.

Reunanen J. Lantibiotic nisin and its detection methods. Academic dissertation. University of Helsinki (2007).

Rezaïki L., Cesselin B., Yamamoto Y., Vido K., van West E., Gaudu P., Gruss A. Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *L. lactis*. Molecular Microbiology (2004) 53:1331-1342.

Rijnaarts H., Norde W., Bouwer E., Lyklema J., Zehnder A. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. Appl. Environ. Microbiol. (1993) 59: 3255-3265.

Rijnaarts H., Norde W., Lyklema J., Zehnder A. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. Colloids Surfaces B: Biointerfaces (1995) 4: 191-197.

Roissart H., Luquet F. Bactéries Lactiques. Edited by Roissart H. And Luquet F. Lorica (1994).

Roosjen A., van der Mei H., Busscher H., Norde W. Microbial adhesion to poly(ethylene oxide) brushes: influence of polymer chain length and temperature. Langmuir (2004) 20: 10949-10955.

Sabbatini L., Zambonin P. Surface characterization of advanced polymers. New York: VCH Publishers, Inc.

Salminen, von Wright, Ouwehand (ed). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3º Ed. Marcel Dekker Inc, New York (2004).

Sanders J., Leenhouts K., Haandrikman A., Venema G., Kok J. Stress response in *L. lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. J. Bacteriol. (1995) 177: 5254-5260.

Sapan C., Lundblad R., Price N. Colorimetric protein assay techniques. Biotechnol. Appl. Biochem. (1999) 29: 99–108.

Schembri M., Kj&rgaard K., Klemm P. Global gene expression in *E. coli* biofilms. Mol. Microbiol. (2003) 48:253–67.

Schembri M., Klemm P. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. EMBO J. (2001) 20:3074– 81.

Severina E., Severin A., Tomasz A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistance Gram-positive pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1998) 41:41; 341-347.

Sheng E., Sutherland I., Brewis D., Heath R. Effects of the chromic-acid etching on propylene polymer surfaces. J Adhes Sci Technol. (1995) 9:47–60.

Schillinger U. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends in Food Science and Technology (1996) 7: 158-164.

Sibilia J. A guide to materials characterization and chemical analysis. New York: VCH Publishers, Inc. (1988).

Siegers K., Entian K. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *L. lactis* 6F3. Appl. Environ. Microbiol. (1995) 61: 1082-1089.

Siegers K., Heinzmann S., Entian K. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Post-translational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. J. Biol. Chem. (1996) 271: 12294-12301.

Situma C., Wang Y., Hupert M., Barany F., McCarley R., Soper S. Fabrication of DNA microarrays onto poly (methyl methacrylate) with ultraviolet patterning and microfluidics for the detection of low-abundant point mutations. Anal. Biochem. (2005) 340:123–35.

Slijper M., Hilbers C., Konings R., van de Ven F. NMR studies of lantibiotics. Assigment of the 1H-NMR spectrum of nisin and identifi cation of interresidual contacts. FEBS Lett. (1989) 252: 22-28.

Smart J., Thomas T. Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. (1987) 53: 533-541.

Stein T., Heinzmann S., Solovieva I., Entian K. Funtion of *L. lactis* nisin immunity genes nisI and nisFEG after coordinated expression in the surrogate host *B. subtilis*. J. Biol. Chem. (2003) 278: 89-94.

Storz G., Imlay J. Oxidative stress. Curr. Op. Microbiol. (1999) 2: 188-194.

Strevett K., Chen G. Microbial surface thermodynamics and applications. Research in Microbiology (2003) 154: 329-335.

Takala T. Nisin immunity and food-grade transformation in lactic acid bacteria. Helsinki, Finland (2005).

Tanaka H., Irie S., Ochi H. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. J. Ferment. Bioeng. (1989) 68: 216–219.

Tao G., Gong A., Lu J., Sue H., Bergbreiter D. Surface functionalized polypropylene: synthesis, characterization, and adhesion properties. Macromolecules (2001) 34:7672–7679.

Tao J., Lin G., Liese A. (ed.) Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry. Discovery, development and manufacturing. Ed. Wiley (2009).

Taylor R. Immobilized antibody and receptor based biosensor. In: Protein Immobilization. Fundamentals and Applications. Taylor ed. Marcel Dekker, New York (1991) 263-303.

Terada A., Yamamoto T., Hibiya K., Tsuneda S., Hirata A. Enhancement of biofilm formation onto surface-modified hollow-fiber membranes and its application to a membrane-aerated biofilm reactor. Water Sci. Technol. (2004) 49: 263-268.

Terada A., Yuasa A., Kushimoto T., Tsuneda S., Katakai A., Tamada M. Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces. Microbiology (2006) 152: 3575-3583.

Terada A., Yuasa A., Tsuneda S., Hirata A., Katakai A., Tamada M. Elucidation of dominant effect on inicial bacterial adhesión onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. Colloids and Sufaces B: Biointerfaces (2005) 43: 99-107.

Terzaghi B., Sandine W. Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1975) 29:807-813.

Thomas L., Ingram R., Bevis H., Davies E., Milne C., Delves-Broughton. Effective use of nisin to control *Bacillus* and *Clostridium* spoilage of a pasteurized mashed potato product. J. Journal of Food Protection (2002) 65:10; 1580-1585.

Thompson, J. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. J. Bacteriol. (1979) 140: 774-785.

Titgemeyer F., Hillen W. Global control sugar metabolism: a Gram-positive solution. Antonie van Leeuwenhoek (2002) 82: 59-71.

Trelles J. Obtención de nucleósidos modificados con potencial actividad farmacológica mediante biotransformaciones. Universidad Nacional de Quilmes, Tesis Doctoral (2005).

Trelles J., Bentancor L., Grasselli M., Lewkowicz E., Iribarren A., Nucleoside synthesis using a novel macroporous grafted polyethylene as biocatalyst support. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic (2008) 52:53; 189-193.

Trelles J., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E., Sinisterra J. V. and Iribarren A., Immobilized Escherichia coli BL21 as a Catalyst for the Synthesis of Adenine and Hypoxanthine Nucleosides. Chemistry and Biodiversity (2004) 1: 280-288.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. Extracellular polymeric substances responsable for bacterial adhesión onto solid surfaces. FEMS Microbiology Letters (2003) 223: 287-292.

Van der Meer J., Polman J., Beerthuyzen M., Siezen R., Kuipers O., de Vos W. Characterization of the *L. lactis* nisin A operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor prosessing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. J. Bacteriol. (1993) 175: 2578-2588.

Van Kraaij C., Breukink E., Noordermeer M., Demel R., Siezen R., Kuipers O., de Kruijff B. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. Biochemistry (1998) 37: 16033-16040.

van Loosdrecht M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. Microbial Ecology (1989) 17: 1-15.

van Niel E., Hahn-Hagerdal B. Nutrient requeriments of lactococci in defined growth media. Applied Microb. And Biotechnol. (1999) 52: 617-627.

van Niel E., Palmfeldt J., Martin R., Paese M., Hahn- Hagerdal B. Reappraisal of the regulation of lactococcal L-lactate dehydrogenase. Appl. Environ. Microbiol. (2004) 70:1843-1846.

Vilain S., Cosette P., Zimmerlin I., Dupont J., Junter G., Jouenne T. Biofilm proteome: homogeneity or versatility? J. Proteome Res. (2004) 3:132- 6.

Walker S., Hill J., Redman J., Elimelech M. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. Applied And Environmental Microbiology (2005) 71:6; 3093–3099.

Wang P., Tan K., Kang E., Neoh K. Surface functionalization of low density polyethylene films with grafted poly(ethylene glycol) derivatives. J. Mater. Chem. (2001) 11: 2951-7.

Welle A., Horn S., Schimmelpfeng J., Kalka D. Photochemically patterned polymer surfaces for controlled PC-12 adhesion and neurite guidance. J. Neurosci. Meth. (2005) 142: 243-50.

Whiteley M., Bangera M., Bumgarner R., Parsek M., Teitzel G., Lory S. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature (2001) 413:860–4.

Wiedemann I., Benz R., Sahl H. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin- a black lipid membrane study. J. Bacteriol. (2004) 186: 3259-3261.

Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. The J. of Biological Chemistry (2001) 276:1 1772-1779.

Yang S., Lo Y., Chattopadhyay D. Production of cell-free xanthan fermentation broth by cell adsorption on fibers. Ohio State Univ, Columbus, OH, USA (1998).

Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J., Sonomoto K. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *L. lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2003) 57, 1616-1619.

MODIFICACIÓN DE SOPORTES POLIMÉRICOS

En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de soportes de base polimérica para la inmovilización de bacterias. Para ello, se estudió la modificación de un material sintético, el polietileno, y uno de origen natural, las fibras de celulosa, por el método de injerto inducido por radiaciones ionizantes. Adicionalmente, se ensayó una modificación química de fibras de celulosa con sales de trialquilamonio.

INTRODUCCIÓN

Los polímeros son la clase de materiales más extensamente utilizados en medicina y biotecnología, tanto como en industria alimentaria y cosmética. Entre las aplicaciones se pueden mencionar implantes, prótesis, sistemas para liberación de drogas, biosensores, membranas filtrantes, matrices cromatográficas y soportes para enzimas y células. Comparados con otros tipos de materiales, como metales y cerámicas, los polímeros ofrecen la ventaja de que pueden prepararse en diferentes composiciones con una amplia variedad de estructuras y propiedades.

Los polímeros, según su origen, pueden clasificarse en naturales, sintéticos o compuestos.

Los polímeros *naturales* son abundantes, usualmente biodegradables, y con una gran complejidad estructural. Su principal desventaja reside en las variaciones en composición, que dependen tanto del organismo productor como de las condiciones ambientales en los que se da lugar la biosíntesis.

Existe una amplia variedad de polímeros sintéticos disponibles comercialmente. Adicionalmente, es posible obtener materiales con características fisicoquímicas y mecánicas diferenciales mediante tratamientos adicionales, como la copolimerización y el *blending* (Angelova *et al* 1999).

Características del polietileno (PE)

El PE (C 85.7%, H 14.3%) es un material sintético que se obtiene por polimerización de etileno. Posee la estructura química fundamental $(-CH_2-CH_2)_n$ y en general sus características químicas corresponden a las de un alcano de elevado peso molecular.

El PE es un termoplástico muy resistente con excelentes propiedades físicas y químicas (Brandrup 1989) (Tabla 2.1). A temperaturas inferiores a 60 ºC el PE es muy poco soluble en disolventes, mientras que a temperaturas mayores es soluble en hidrocarburos e hidrocarburos halogenados. Adicionalmente, posee baja solubilidad en líquidos polares como alcoholes, ácidos, ésteres, aminas, fenoles y nitrocompuestos.

Tabla 2.1
Propiedades del PE

• Químicamente inerte
• Atóxico, inodoro e insípido
• Hidrófugo
• Resistente al desgaste, corte, tensión, compresión y tracción
• Resistente a la corrosión

El PE es insoluble en agua y sólo absorbe muy pocas cantidades de ella a altas temperaturas. Posee alta permeabilidad al oxígeno, y como puede deducirse de su composición química, posee muy baja conductividad eléctrica.

Hay tres tipos fundamentales de PE, dependiendo del grado de ramificación del material: alta, media y baja densidad. Adicionalmente posee diferentes grados de complejidad estructural, desde cristalino a amorfo, que se obtiene por diferencias en las condiciones de presión y temperatura utilizadas para la polimerización.

El polietileno de alta densidad (HDPE) consiste en un polímero no ramificado con estructura del tipo cristalina de peso molecular promedio en el rango de 10^6 uma. La Tabla 2.2

Tabla 2.2
Propiedades del HDPE

Densidad (g/cm3)	0,95-0,96
Resistencia a la tracción x 1000 psi	2,9-5,4
Elongación (%)	20-120
Cristalinidad (%)	95
Rigidez dieléctrica (V/mill)	480
Máxima temperatura de uso (ºC)	80-120

resume sus principales características físicas.

Este material posee características macroscópicas y de resistencia mecánica adecuadas para la aplicación ensayada en este trabajo. Es un sólido de celda abierta con poros omnidireccionales, un grado de porosidad del 40-50% (Fig. 2.1) y un diámetro de poro promedio de 40-60 µm. Estas dimensiones permiten la interacción de células bacterianas con la superficie de los poros del material.

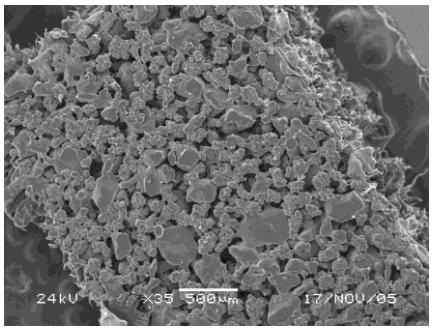


Figura 2.1
Microfotografía electrónica de barrido del HDPE macroporoso

Características de la fibra de algodón

La celulosa es el componente mayoritario del algodón, la matriz fibrosa natural más utilizada en la industria textil (Tabla 2.3).

Tabla 2.3
Composición promedio de la fibra de algodón

Celulosa	91,5%
Agua	7,5 %
Materias nitrogenadas	0,5 %
Grasa y ceras	0,3 %
Minerales	0,2 %

La celulosa es un polímero constituido por unidades de β-celobiosa, un dímero de glucosa unidas por enlaces de oxígeno β(1,4) (Fig. 2.2). El grado de polimerización del algodón es de 9000-15000 unidades de dímero (Joseph 1986, Show 1967).

Las cadenas de celulosa dentro de las fibras del algodón forman puentes de hidrógeno entre sí. Estos enlaces de hidrógeno ocurren entre los grupos oxhidrilos de las moléculas adyacentes y prevalecen en las áreas cristalinas de la fibra, que constituyen más del 60%. El resto de la cadena de celulosa posee estructura amorfa.

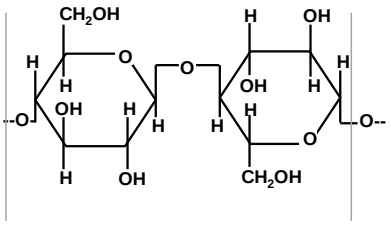


Figura 2.2
Estructura química de la β-celobiosa

Estructura de la fibra de celulosa. La fibra de celulosa está organizada en capas concéntricas (Fig. 2.3). La cutícula es la capa externa, constituida por ceras y pectina. Esta capa se elimina durante el procesamiento primario de la fibra. La pared primaria constituye la capa periférica de la fibra y está compuesta por fibrillas cristalinas de celulosa. La pared secundaria consiste de tres capas diferentes. Están conformadas por fibrillas de celulosa paralelas empacadas con un ángulo de 25-30° y representa la mayoría de la celulosa de la fibra. La parte más interna, el lumen, está compuesto por el resto de los componentes celulares. Cuando la fibra madura, el lumen colapsa generando un canal central vacío. La torsión y convolución en la fibra seca son consecuencia de la pérdida del líquido en el lumen (Duckett 1975).

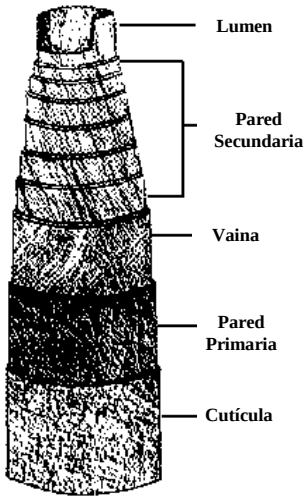


Figura 2.3
Estructura de la fibra de algodón (Duckett 1975)

A lo largo de la estructura de la fibra hay espacios capilares de diferentes tamaños, por lo que se comporta como una esponja física microscópica con una estructura porosa compleja. Estos espacios capilares representan cerca del 95% del volumen total de la fibra y es donde acceden líquidos y/o vapores por acción capilar (Gordon Cook 1968). Esta estructura interna hace que las fibras de algodón posean un gran área superficial (Andreozzi *et al* 2005). La densidad de las fibras de algodón es de 1,52 g/cm^3, que representa un promedio entre las densidades de las zonas cristalinas y amorfas presentes en el material.

El algodón se hincha en un ambiente húmedo en agua o en soluciones concentradas de ácidos y bases. Este efecto se atribuye usualmente a la adsorción de iones altamente hidratados. En condiciones normales, el algodón retiene un 7-8 % de humedad (Brandrup *et al* 1989).

La hidrólisis ácida de la celulosa, por tratamiento con soluciones ácidas diluidas calientes o concentradas frías, produce hidro-celulosa. Son pocos los solventes que pueden disolver este polímero; típicamente los protocolos de disolución involucran el uso de condiciones de reacción extremas y el reactivo de Scheitzer (complejo de hidróxido de cobre-amonio y cobreetilendiamina) es uno de los más utilizados (Babcock 1963). Recientemente, se propuso un método de disolución con líquidos iónicos como una opción "verde" a los tratamientos establecidos (Swatloski *et al* 2003).

Las fibras de algodón sumergidas en agua presentan un potencial Z negativo en su superficie que reduce la interacción de este material con especies cargadas negativamente (Poonam 2002). Por lo tanto, para utilizar este material como soporte de inmovilización es necesario introducir un intermediario cargado positivamente que permita la interacción con los microorganismos a inmovilizar.

Modificación de polímeros por injerto

Los polímeros en general poseen buena resistencia mecánica pero pobres propiedades superficiales para ser utilizados como soporte de inmovilización. Una alternativa es modificar su superficie de manera de mejorar la interacción con enzimas o células. La elección del método a utilizar depende del grado y la ubicación de la modificación que se desee en el material. Los métodos que utilizan radiaciones de baja penetración (radiación UV, plasma, corona y flama) tienen grandes limitaciones para lograr una modificación homogénea en la superficie de los poros internos del material. Se pueden observar efectos de heterogeneidad también con modificaciones con químicos en estado húmedo, donde es necesario trabajar en condiciones de agitación enérgicas para mejorar la homogeneidad del sistema.

La tecnología de injerto inducido por radiación de alta energía puede generar radicales altamente reactivos e iniciar la polimerización y extensión de cadenas de injerto sobre materiales poliméricos comunes de baja reactividad

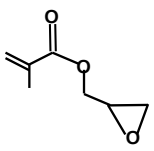


Figura 2.4
Estructura química del GMA

química, incluyendo la superficie interna. Como se explica en el Capítulo 1, esta modificación consiste en la irradiación del polímero en contacto con una solución conteniendo uno o más monómeros.

El monómero seleccionado en este trabajo es el glicidilmetacrilato (GMA). Este monómero es una molécula bifuncional constituida por un grupo vinilo y un grupo epóxido (Fig. 2.4). El grupo vinilo puede polimerizar por radicales libres, mientras que el epóxido puede generar polímeros por condensación en reacciones en medio anhidro. Las condiciones de reacción que se utilizan en este trabajo aseguran que la reacción predominante es la de polimerización por radicales permaneciendo el grupo epóxido disponible para una derivatización.

En un paso posterior el grupo epóxido puede reaccionar con compuestos que poseen hidrógenos reactivos (ácidos, bases, alcoholes, aminas primarias o secundarias). Por lo tanto en este trabajo se utilizó etilendiamina (EDA) para funcionalizar el polímero injertado con grupos amino primarios y secundarios (Lee *et al* 1993). La Fig. 2.5 muestra un esquema de la funcionalización.

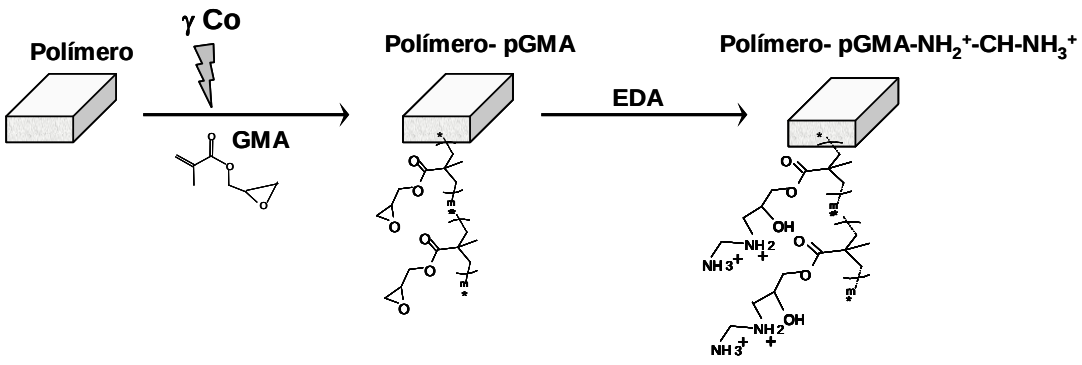


Figura 2.5
Esquema de funcionalización de polímeros por injerto simultáneo

Esta modificación aporta cargas positivas que hidrofilizan el injerto y podrían proveer al material de mejores características como soporte para inmovilización de microorganismos. Como se explicó en el Capítulo 1, las interacciones electrostáticas, ya sean repulsivas o atractivas, intervienen en la primera fase de la adhesión de una

bacteria a una superficie. Si el soporte expone cargas opuestas a las presentes en la superficie bacteriana la interacción electrostática será atractiva, reduciendo la barrera energética necesaria para conseguir una adhesión irreversible.

Modificación química de la fibra de algodón.

Existen reportes de numerosas estrategias de modificación química del algodón, con el objetivo de reducir o mejorar su capacidad de adsorción, tanto de microorganismos como de sustancias químicas como colorantes acídicos (Chu *et al* 2009, Liu *et al* 2001, Bai 2006).

Una de las técnicas utilizadas para cationizar el algodón es la adición de aminos cuaternarios (Degussa Co., Guía Técnica). Esta técnica, desarrollada para mejorar la adsorción de colorantes en la celulosa, puede ser aplicada también para conferir al material características apropiadas para inmovilización de células.

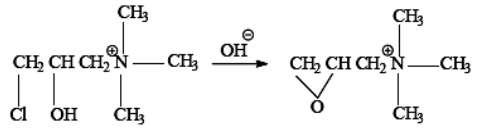


Figura 2.6
Estructura del GTMA. En condiciones alcalinas se forma un grupo epóxido reactivo

Los aminos cuaternarios se utilizan en forma de sales de trialquilamonio, las cuales se preparan por reacción entre una amina secundaria o terciaria, con epiclorhidrina seguida por cuaternización con un haluro de alquilo. El cloruro de epoxipropiltrimetilamonio, también denominado cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMA) es un producto comercial utilizado en la industria textil (Fig. 2.6) que se obtiene por la reacción de la sal de trialquilamonio con cantidades estequiométricas de álcali. Los grupos oxhidrilos de la celulosa reaccionan por

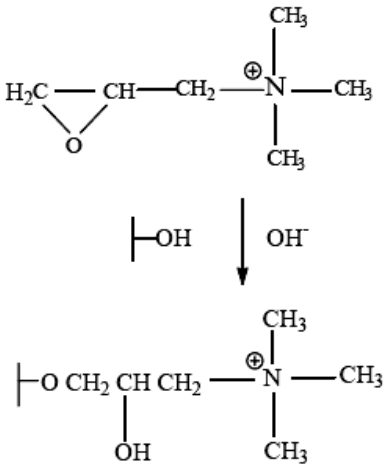


Figura 2.7
Reacción del GTMA con los oxhidrilos de la celulosa

catálisis básica con el epóxido del GTMA (Fig. 2.7) (Tabba 2000).

Las fibras de algodón también pueden ser modificadas por la técnica de injerto (Andreozzi *et al* 2005). Sin embargo, no se han reportado hasta el momento modificaciones de fibras de celulosa por injerto simultáneo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos. El HDPE sinterizado (placa de 1.5 mm de espesor, rango de volumen de poro 40 a 50 %, tamaño de poro de 45 a 90 µm, área superficial 1 m^2/g) fue donado por Porex Technology. Los reactivos químicos utilizados (GMA, EDA, GTMA) fueron de grado síntesis (Sigma) y los solventes orgánicos de calidad analítica o grado HPLC, según corresponda (Anedra y Sintorgan respectivamente).

Modificación de polímeros por injerto. El material a modificar (HDPE o algodón crudo) presolvatado en metanol, se sumergió en una solución de GMA al 3% en metanol/H_2O 1:1 desgasificada por burbujeo con nitrógeno. La irradiación se realizó a temperatura ambiente en una fuente de ^{60}Co, con una dosis de 10 kGy en condiciones estáticas (Comisión Nacional de Energía Atómica, Ezeiza, Argentina). Posteriormente el material se lavó con agua destilada y etanol y se colocó en estufa a 40-60 ºC hasta peso constante. El grado de modificación (o grado de injerto) se calculó por la diferencia porcentual de peso entre el material modificado y sin modificar por la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de injerto \%} = \frac{(\text{Peso material injertado} - \text{Peso material virgen})*100}{(\text{Peso material virgen})}$$

Inmovilización de EDA. El material se incubó a 45ºC *ON* con una solución de EDA/H_2O en relación 1:2 v/v. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con H_2O y uno con etanol. El material se secó en estufa a 40-60 ºC hasta peso constante.

Inmovilización de IDA. El material se incubó con una solución de IDA 0.5 M en DMSO/H_2O (1:1) pH 11 a 80 ºC durante 10 horas sin agitación. Posteriormente, los grupos epóxido no reaccionantes se hidrolizaron a diol por incubación en H_2SO_4 0.5 M a 80 ºC. La densidad de IDA inmovilizado se midió indirectamente por complejación. El material modificado se incubó con una solución de $CuSO_4$ 0.1 M, se lavó con agua desionizada e incubó con EDTA 0.1 M pH 7. El complejo EDTA-Cu(II) formado se cuantificó por absorbancia en 715 nm.

Cationización con aminas cuaternarias. El algodón se incubó a temperatura ambiente y con agitación (150-200 rpm) en una solución 4M de NaOH durante 2 horas. Se retiró el NaOH y se agregó dH_2O para llevar la solución de base hasta concentración final de 0,1 M. Se agregó GTMA a concentración final de 0,12 M y se incubó a 60 ºC 12-14 horas. Luego de este período el material se lavó con dH_2O hasta neutralidad y se secó en estufa a 40 ºC hasta peso constante.

Adsorción de colorantes. El material modificado se incubó en una dilución 1/100 de soluciones de colorantes para evaluar la efectividad de la cationización: (0,1% p/v en BP 30 mM pH7): 1) Naranja de Metilo, 2) Cibacron Blue, 3) Alizarin S y 4) Azul de Metileno.

Cuantificación de aminos cuaternarios. Para cuantificar los grupos amino incorporados en la cationización química se incubó el material modificado en una solución de Alizarin Red S y se midió el colorante remanente por absorbancia en 520nm.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las muestras se secaron a presión reducida y se fracturaron para observar la estructura interna del poro utilizando un microscopio electrónico JEOL JSM 5600LV.

Espectroscopia ATR FT-IR. Se utilizó un espectrómetro IMPACT 410, Nicolet, Sistema FT-IR con dispositivo ATR (Pike Technologies, Inc.) de ángulo vertical variable, cristal KRS-5 (Thallium Bromide-Iodide) de 50 mm de longitud y espejos de 25mm.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cationización por injerto

Modificación de HDPE. El HDPE se sometió a una modificación superficial por injerto de un polímero de GMA (pGMA) inducido por radiación como se describió en la Fig. 2.2 y en *Materiales y Métodos*. En la Fig. 2.8 se muestran imágenes obtenidas por SEM de una sección transversal del material original (A) y modificado (B) donde se evidencia la presencia de la capa superficial de polimetacrilato (pGMA) rodeando la matriz de polietileno.

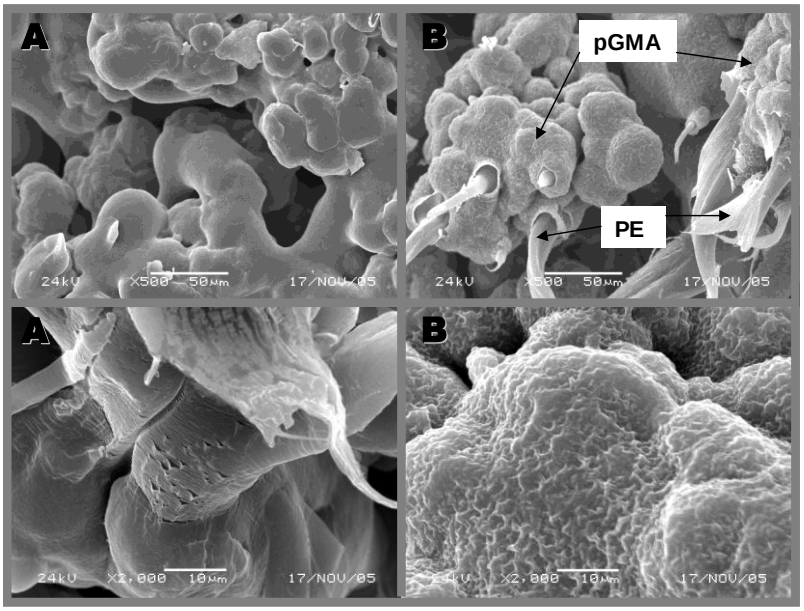


Figura 2.8
Microfotografías SEM en dos diferentes magnificaciones del HDPE macroporoso original (A) y modificado con poliGMA (B)

Esta capa superficial de pGMA, de unos micrómetros de espesor, forma un hidrogel con alto contenido de agua debido al carácter hidrofílico del polímero injertado. Esta característica podría favorecer la interacción entre las células y la superficie del material. Adicionalmente, la porosidad del material permitiría mayor disponibilidad de solutos para la célula inmovilizada por una menor resistencia a la transferencia de masa.

Análisis por Espectroscopia Infrarroja (ATR FT-IR). Las etapas de modificación del HDPE se analizaron por espectroscopía FT-IR. En la Figura 2.9 se observan los espectros FT-IR por la técnica ATR donde pueden distinguirse señales características de las modificaciones introducidas. El espectro (a) corresponde a la señal del HDPE sin modificaciones, (b) HDPE con injerto de pGMA inducido por radiación (HDPE-pGMA) y (c) HDPE con injerto de pGMA y derivatización con etilendiamina (HDPE-pGMA-EDA). El gráfico 1 de la Fig. 2.9 representa el espectro en la región de 1900-850 cm^{-1} y el 2 corresponde a 3800-2700 cm^{-1}.

Como puede observarse en el espectro (2a) el HDPE sin modificaciones presentó señales correspondientes a la vibración de las uniones C-H (región 2900 cm^{-1}) y en (1a) al estiramiento de las uniones C-C (región 1400 cm^{-1}). La presencia de señales correspondientes al carbonilo del metacrilato (región de 1700 cm^{-1}) se observaron en los espectros (1b) y (1c) coincidentes con la presencia de cadenas de pGMA (Grube *et al* 2002). Adicionalmente, la señal característica correspondiente al epóxido del GMA (910 cm^{-1}) se observó en el espectro (1b) pero no en el (1c). Esta diferencia en el patrón del polímero modificado con pGMA y el funcionalizado con EDA corrobora la reacción de adición. La reducción de la señal de epóxido en este último caso coincidió con la aparición de una señal débil y extendida en 3300-3500 cm^{-1} correspondiente al estiramiento N-H en el espectro (2c). La región entre 3000 y 4000 cm^{-1} corresponde a la señal emitida por los grupos amino e hidroxilo. De esta manera, los grupos amino

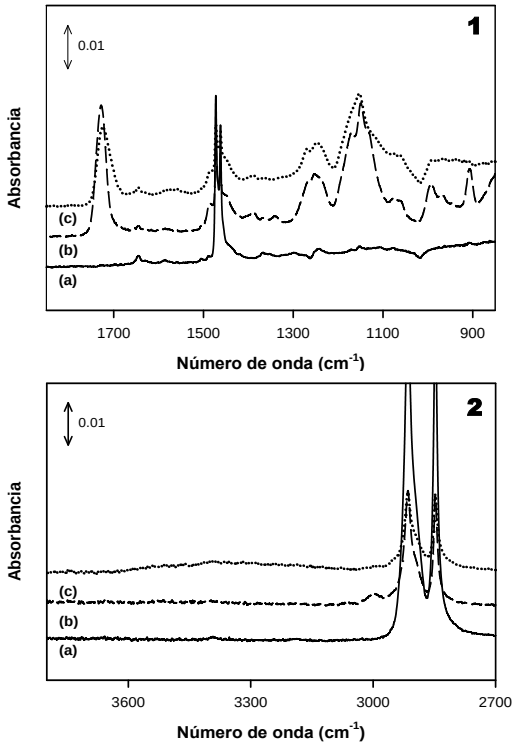


Figura 2.9
Espectros de ATR FT-IR en rango de 1900 a 850 cm^{-1} (1) y 3800 a 2700 cm^{-1}(2) a) HDPE sin modificar, b) HDPE- pGMA, c) HDPE-pGMA-EDA

primarios y secundarios presentes en el injerto de pGMA funcionalizado con EDA aparecen en la misma zona espectral que los grupos hidroxilo generados en la misma reacción de apertura del anillo epóxido, enmascarando la señal y dando una señal difusa en esta región.

Grado de modificación. Como se explicó en *Materiales y Métodos*, la extensión de la modificación superficial del HDPE se estima de manera simple y rápida por diferencia porcentual del peso del material modificado.

El contenido de GMA en la solución inicial determinó el grado de injerto final. La Fig. 2.10 muestra el rendimiento en injerto sobre HDPE utilizando diferentes concentraciones iniciales de GMA, donde se observa una relación lineal entre ambos parámetros. En este experimento se ensayaron concentraciones de GMA en el rango de 0-5 % v/v. De manera similar a la modificación de membranas de polisulfona (Carbajal *et al* 2003), existe una relación lineal entre el grado de injerto expresado en unidades porcentuales a bajas concentraciones de monómero. En estas condiciones, el monómero actúa como reactivo limitante y el proceso de polimerización se detiene cuando éste se agota. Los rendimientos en injerto son significativamente menores a los publicados en trabajos anteriores con otros materiales poliméricos aplicando la misma técnica (Grasselli *et al* 1999, Carbajal *et al* 2003). Esto puede explicarse debido a que el HDPE posee un área superficial 15 veces menor a las membranas ensayadas anteriormente.

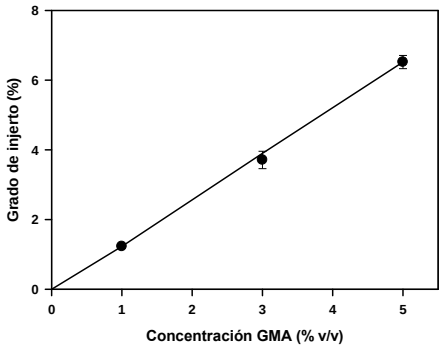


Figura 2.10
Grado de injerto en función de la concentración inicial de monómero

A partir de estos resultados se determinó como concentración de trabajo para modificaciones posteriores GMA 3% v/v con un rendimiento de 4 ± 1 % p/p.

Cuantificación de grupos epóxido. El ácido iminodiacético (IDA, Fig. 2.11) se incorpora por reacción de adición al grupo epóxido reactivo del GMA. Asimismo, es capaz de formar quelatos con iones metálicos de la primera serie de transición. Por lo

tanto, es posible la cuantificación del IDA incorporado por reacción de formación de complejos con Cu(II), permitiendo la estimación de los grupos epóxido presentes en el material.

EL IDA incorporado se determinó por medición indirecta. El Cu (II) asociado se separó por adición de un quelante de mayor afinidad, como el EDTA y se cuantificó por medio una curva de calibración Cu (II)-EDTA (Carbajal *et al* 2003).

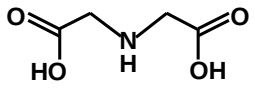


Figura 2.11
Estructura química del IDA

La concentración del ión asociado a muestras de HDPE modificado fue de 60 ± 20 μmol Cu(II)/g material. Considerando que la modificación por injerto corresponde a un 4 % (p/p) el contenido de epóxidos incorporados es de 210 μmol epóxido/g de material. La diferencia entre la cantidad de polímero injertado y la determinación experimental por cuantificación de IDA indica que aproximadamente el 30% de los grupos epóxidos presentes en el pGMA reaccionan con el IDA. Estos resultados coinciden con los obtenidos para pGMA injertado sobre membranas de PE (Grasselli *et al* 2003).

Adicionalmente, el Cu (II) asociado al IDA en el material permite valorar cualitativamente la modificación. El material modificado adquirió una coloración azul homogénea, correspondiente al complejo Cu(II)-IDA, indicando una modificación homogénea y superficial.

Funcionalización del HDPE modificado con EDA. La funcionalización con compuestos químicos que aporten cargas positivas como grupos aminos primarios o secundarios, permitiría aumentar el carácter electropositivo del material. Esto, sumado a que el injerto posee propiedades de hidrogel, daría como resultado un material mecánicamente fuerte y con propiedades que favorecerían la adhesividad celular.

La etilendiamina (EDA, Fig. 2.12) es capaz de reaccionar desde uno de los extremos amino con grupos epóxido del pGMA dando como resultado la adición de

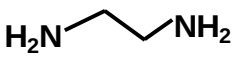


Figura 2.12
Estructura química del EDA

una amina primaria y una secundaria. El polímero resultante de esta adición también es capaz de complejar Cu(II), coloreando el soporte. Sin embargo en este caso los complejos EDA:Cu(II) pueden tener estequiometrías 1:1 o 1:2, razón por la cual no puede utilizarse con fines cuantitativos.

Solventes de lavado. El GMA polimeriza, por efecto de la generación de compuestos radicalarios reactivos, tanto con la superficie del PE como con otra molécula de GMA presente en solución. La formación de homopolímero de pGMA no asociado a la superficie del PE reduce la cantidad de monómero disponible para el injerto y por lo tanto afecta negativamente el rendimiento final de la reacción. El nitrato cúprico, el sulfato ferroso, la sal de Mohr, el cloruro cuproso y el cloruro de litio son algunas de las sustancias que pueden reducir la formación de homopolímeros durante el proceso de polimerización. En trabajos previos (Grasselli *et al* 1999) se estudió la efectividad de estas sales para reducir la homopolimerización y su efecto sobre el injerto simultáneo en PE. En todos los casos no se pudo encontrar el efecto diferenciado buscado: reducir homopolimerización sin afectar el grado de injerto. En consecuencia se deben asegurar condiciones de lavado del material injertado adecuadas para separar el homopolímero de GMA formado durante el proceso de modificación. La presencia de este producto secundario puede interferir en las estimaciones del grado de modificación, así como también obstruir los poros del material disminuyendo la capacidad de transporte de masa. Con el propósito de buscar solventes que permitan eliminar el homopolímero sin afectar la integridad del material, se ensayaron lavados del material irradiado con los siguientes solventes: acetona, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol.

Se realizaron lavados de 3 horas con agitación suave a temperatura ambiente; y al cabo de este período, se observó la disolución completa del homopolímero de GMA sin cambios en el aspecto y consistencia del material base. Sólo se detectaron cambios irreversibles en los materiales (deformaciones y cambios en el color) luego de una incubación de 24 horas con todos los solventes ensayados, excepto con el etanol.

Por lo tanto, se seleccionó un protocolo de lavados con agua y etanol de manera alternada y con agitación vigorosa que resultó satisfactorio para el objetivo buscado.

Modificación de fibras de celulosa. Para estudiar la cationización por injerto se irradiaron porciones de algodón de peso conocido sumergido en una solución de GMA al 3% v/v. La radiación γ emitida por el ^{60}Co indujo la polimerización del monómero sobre la superficie de la fibra. La estimación del grado de modificación de la fibra, obtenido por la diferencia porcentual del peso del material, fue de 18 ± 1 % p/p de injerto.

El algodón modificado con GMA se analizó por reacción con IDA y cuantificación por complejación con Cu(II). El material desarrollado presentó una densidad de 590 μmol IDA/g.

Por otro lado, el valor de injerto obtenido por gravimetría indicó que se incorporaron 1260 μmol epóxido/g material. En consecuencia, se puede estimar que el 47% de los grupos epóxido injertados están químicamente disponibles en este material. Este valor es superior a los encontrados en el presente trabajo y en reportes anteriores (Grasselli *et al* 2003) para la modificación de PE, evidenciando las diferencias estructurales entre los dos materiales ensayados.

Posterior a realizar el injerto de pGMA se realizó una derivatización de la fibra de algodón con EDA para ser evaluados posteriormente como soporte para la inmovilización de células.

Análisis de la modificación por injerto. Existen diferencias sustanciales entre la modificación realizada en este trabajo y otros reportes de modificación de HDPE por la técnica de injerto. En primer lugar, la dosis de radiación aplicada (10 kGy) en este trabajo fue 10-20 veces menor que la utilizada por otros autores (Lee *et al* 1996, Zu *et al* 2005) debido a que la polimerización se realizó en simultáneo. A pesar de ello, el rendimiento de polimerización en la técnica de injerto simultáneo fue mayor debido a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

que se evitan reacciones laterales de descomposición de los radicales libres generados (Bhattcharya 2000, Dargaville *et al* 2003).

Por otro lado, el grado de injerto obtenido en este trabajo fue menor a los reportados por otros autores, debido a que se utilizaron concentraciones iniciales de monómero bajas. Trabajos sobre modificaciones por injerto con pre-irradiación reportan rendimientos del 100 al 200%, dependiendo de la concentración de monómero utilizado y de la porosidad del polímero base (Terada *et al* 2005). Sin embargo, otros autores mostraron que valores de injerto mayores al 40% en membranas de HDPE modificadas por preirradiación producen además de modificaciones superficiales, cambios en la estructura interna del polímero base (Zu *et al* 2005). Adicionalmente, un estudio por espectroscopía de micro-Raman (Cardona *et al* 2002) de injertos de estireno sobre distintos sustratos por preirradiación confirman que la modificación tiene lugar no solo en la superficie sino también en el interior del sólido base, y que el incremento en el grado de injerto total es acompañado por un incremento proporcional en la cantidad de injertos dentro de la masa del material.

Las modificaciones estructurales en el material soporte producidas por grados de injerto elevados puede afectar las características mecánicas. Por lo tanto, es deseable que la modificación introducida en el polímero base sea sólo superficial y esto se logró mediante la técnica utilizada en este trabajo. La técnica de injerto simultáneo, aplicada sobre PSf, PES y PE de baja densidad también produce únicamente modificaciones superficiales (Carbajal 2008).

La ubicación del injerto de pGMA en el soporte se confirmó por microfotografía SEM (Fig. 2.8), donde se observa una zona amorfa de unos micrones de espesor cubriendo la superficie del polímero base. Este resultado concuerda con los obtenidos para injertos de GMA en membranas de HDPE inducidos por radiación UV. En estos casos la radiación de baja penetración sólo es capaz de inducir injertos superficiales sobre superficies planas (Han *et al* 2008).

Durante la polimerización, las moléculas de GMA libres pueden reaccionar entre sí formando homopolímeros no asociados al polímero base, puede injertarse en el HDPE o adicionarse a una cadena existente de pGMA injertado. El injerto tiende a ocurrir más fácilmente sobre los hidrógenos secundarios de las cadenas de pGMA que sobre la superficie del HDPE, formando cadenas lineales o ramificadas dependiendo del solvente utilizado (Wang *et al* 2007). La Fig. 2.13 reproduce las microestructuras propuestas por otros autores para el pGMA formado en presencia de diferentes solventes. Cuando se utiliza un solvente polar como la acetona se obtiene baja densidad de injerto y el pGMA es menos ramificado y con cadenas más largas. Cuando la reacción se realiza con tetrahidrofurano (THF), se obtiene menor densidad de injerto, con una distribución más uniforme; el pGMA presenta más ramificaciones pero de menor

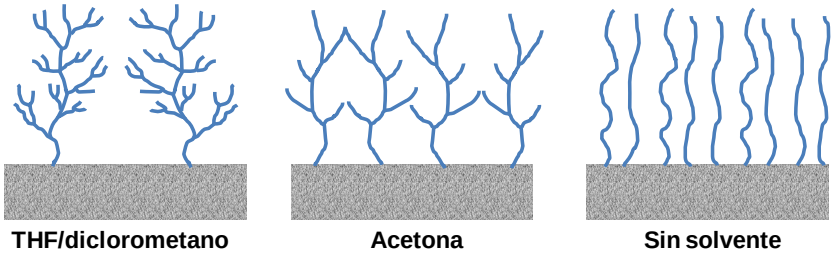


Figura 2.13
Microestructuras propuestas para las cadenas de pGMA obtenidas con diferentes solventes de reacción (Adaptado de Wang et al 2007)

longitud. Cuando el injerto se lleva a cabo sin solvente, se produce mayor densidad de injerto con cadenas de pGMA lineales.

Teniendo en cuenta estos modelos, se espera que el injerto realizado en este trabajo, utilizando metanol/agua como solvente, esté formado por cadenas de pGMA con ramificaciones intermedias como las propuestas para el caso de la acetona por Wang *et al*. Estas ramificaciones podrían explicar las diferencias encontradas en las cuantificaciones de grupos epóxido disponibles para reaccionar con IDA o EDA con respecto a los esperados según la masa de GMA injertado. Adicionalmente, la presencia de cadenas parcialmente ramificadas de pGMA daría al injerto una estructura compleja que podría mejorar la interacción con la superficie bacteriana.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Cationización química

La adición de aminos cuaternarios es una técnica que se utiliza para mejorar las propiedades de adsorción de tejidos de algodón. Es una metodología simple que puede realizarse en un laboratorio sin equipamiento especializado, por lo que es una opción interesante para aplicar. Como se mencionó en la *Introducción* y en *Materiales y Métodos*, la reacción de adición del GTMA (Fig. 2.7) se produce en condiciones básicas y requiere un paso previo de incubación de la fibra en una solución concentrada de NaOH. Una vez obtenida la modificación es necesario ajustar el pH del material a valores cercanos a la neutralidad para no afectar la integridad de la célula durante la inmovilización.

La modificación con GTMA no produjo una diferencia en el peso del material, por lo que no se pudo evaluar el grado de modificación por gravimetría, como en el caso de la modificación por injerto. Por lo tanto, se analizó la efectividad de la reacción por adsorción de colorantes.

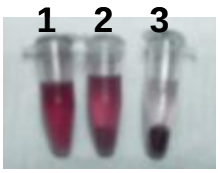
Evaluación cualitativa de la cationización. En primer lugar, se estudió cualitativamente la adsorción de cuatro colorantes: Naranja de Metilo, Cibacron Blue, Alizarin S y Azul de Metileno. Los tres primeros son sustancias colorantes que poseen grupos sulfónicos que se encuentran como aniones a pH neutro. El azul de Metileno por el contrario es un colorante básico electropositivo.

Tabla 2.4
Adsorción de colorantes a la fibra de algodón

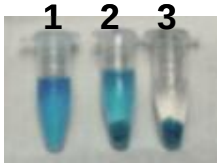
	Naranja de metilo	Cibacron Blue	Alizarin Red S	Azul de Metileno
Cel-TMA	++++	+++	+++	+/-
Celulosa	-	+	-	++

Cada colorante se incubó con una porción de fibra de algodón con y sin tratamiento con GTMA. La adsorción del colorante en cada material se comparó con la intensidad inicial de la solución.

Los resultados se resumen cualitativamente en la Tabla 2.4. Para el Naranja de Metilo se observó adsorción completa del colorante a la fibra de algodón modificada con GTMA (Cel-TMA). El líquido sobrenadante perdió completamente la coloración y el soporte retuvo el indicador luego de un lavado con dH_2O. Por otro lado, el algodón sin tratamiento no adsorbió colorante.



Alizarin Red S



Cibacron Blue

Figura 2.14
Adsorción de colorantes a la fibra de algodón.1: Solución de colorante, 2: algodón sin modificar, 3: algodón cationizado (Cel-TMA)

El Cibacron Blue también se adsorbió completamente a la superficie de las fibras de algodón modificadas (Fig. 2.14). En el caso del material sin tratamiento de cationización, se observó una adsorción leve. En el caso del Alizarin S, un colorante púrpura, se observaron resultados similares al anterior; adsorción completa por el material modificado y baja interacción con el algodón sin modificar. El Azul de Metileno se comportó de manera opuesta, de acuerdo a lo esperado para un colorante básico. En este caso, se produjo mayor adsorción de colorante en la fibra sin tratar, concordante con el potencial *zeta* negativo de este material sin modificar.

Cuantificación de aminos cuaternarios. Con el fin de evaluar la extensión de la cationización química en la fibra de celulosa se realizó un ensayo de adsorción cuantitativa de Alizarín Red S (Fig. 2.15), debido a que es el único de los colorantes ensayados que posee un único grupo sulfónico en su estructura y por lo tanto se espera una interacción de estequiometría 1:1 con los grupos trimetilamino (TMA). Para ello se cuantificó el colorante no adsorbido por absorbancia

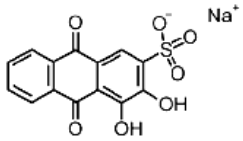


Figura 2.15
Estructura del Alizarin Red S

en 520 nm y se comparó con una curva de calibración del colorante construida para tal fin.

Los grupos aminos incorporados en el algodón cationizado fueron en el orden de 770 ±80 µmol TMA/g material. Considerando que la relación inicial fue de 0,01 moles de GTMA/g material el rendimiento de cationización fue del 8%. Este valor fue el doble de los reportados por otros autores (Poonam 2002). Como se explicó en la *Introducción*, la reacción entre aminos cuaternarios y las fibras de algodón procede de acuerdo a la reacción de la Fig. 2.7; sin embargo, en estas condiciones existe una reacción secundaria de hidrólisis del compuesto cuaternario en condiciones alcalinas. El producto de hidrólisis no posee afinidad por la fibra de celulosa y podría explicar los valores de rendimiento obtenidos (Tabba 2000).

Comparación de los materiales modificados

La Tabla 2.5 muestra una comparación de los polímeros desarrollados. Para el HDPE modificado por la técnica de injerto simultáneo de GMA (HDPE-pGMA) se obtuvo un grado de modificación de 4% con una adición de grupos amino incorporados a través de la reacción con EDA de 60 µmol/g de material. Estos valores fueron menores

Tabla 2.5
Comparación de las modificaciones de HDPE y fibras de algodón

	Tipo modificación	Grado Modificación (%)	Aminas incorporadas (µmol/g)
HDPE-pGMA	Injerto	4	60
Cel-pGMA	Injerto	18	590
Cel-TMA	Cationización química	-	770

a los obtenidos en la modificación de fibras de algodón por el mismo método (Cel-pGMA) y son congruentes con la diferencia en la superficie específica entre los dos materiales.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

A partir de los parámetros de densidad y diámetro promedio de la fibra de celulosa disponibles en bibliografía técnica, 1,52 g/cm^3 y 13 µm respectivamente, se estimó que la superficie específica de las fibras de celulosa es de 4 m^2/g. Este valor es 4 veces superior al del HDPE utilizado en este trabajo y podría explicar la diferencia en rendimiento en injerto.

Por otro lado, la cationización por adición de GTMA es una técnica alternativa a la modificación por injerto de fibras de algodón. Con este tratamiento se incorporaron 770 µmol/g de grupos amino cuaternarios, valor comparable con el obtenido por injerto de GMA.

Conclusiones Parciales

En este capítulo se describe la modificación de polímeros por injerto simultáneo y cationización química con el objeto de mejorar sus características como soporte para inmovilización de células. Para ello se utilizó el HDPE, un polímero sintético, y fibras de celulosa (o algodón) como polímero natural.

El HDPE modificado por injerto se caracterizó por técnicas microscópicas, donde se corroboró la presencia de una capa de pGMA sobre la superficie del HDPE. Esta capa de polímero, genera un hidrogel superficial de un espesor del orden de los micrómetros, y se identificó por espectroscopía ATR-FTIR. Esta capa de pGMA representó un 4% de injerto determinado por gravimetría.

El algodón es una fibra celulósica con características mecánicas adecuadas para su utilización como soporte para inmovilización. Esta fibra natural atóxica y biodegradable, resulta interesante para aplicaciones en el campo de la industria alimentaria y farmacéutica. En este capítulo se obtuvieron dos soportes basados en fibras de celulosa. Para ello se utilizaron dos estrategias de modificación; injerto de cadenas de pGMA y adición de GTMA a los grupos oxhidrilos reactivos.

La técnica de injerto produjo un material (Cel-pGMA) con un 18 % de injerto de pGMA medidos por gravimetría. Esta modificación representó un equivalente a 590 µmol epóxido/g material, medidos por titulación con Cu(II).

Las fibras de algodón modificadas por adición de GTMA adsorbieron colorantes aniónicos, resultado que se utilizó para evaluar la efectividad de la cationización. La cuantificación del Alizarin Red S adsorbido representó una incorporación de TMA de 770 µmol/g, indicando un rendimiento de reacción del 8%.

Las dos técnicas ensayadas resultaron efectivas para la cationización de fibras de celulosa, obteniéndose densidad de cationización comparables. Adicionalmente, la modificación de celulosa por injerto simultáneo no se ha reportado anteriormente y tampoco se encontraron reportes sobre el uso de fibras de celulosa cationizadas por adición de GTMA para inmovilización de células.

Por lo tanto, se obtuvieron tres materiales (HDPE-pGMA, Cel-pGMA y Cel-TMA) por dos métodos de modificación con buenos rendimientos. Estos materiales se ensayarán como soportes para inmovilización de bacterias.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

REFERENCIAS

Andreozzi L., Castelvetro V., Ciardelli G., Corsi L., Faetti M., Fatarella E., Zulli F. Free radical generation upon plasma treatment of cotton fibers and their initiation efficiency in surface-graft polymerization. Journal of Colloid and Interface Science (2005) 289: 455–465.

Angelova N., Hunkeler D. Rationalizing the desing of polymeric biomaterials. TIBTECH (1999) 17: 409-421.

Babcock Dove P. (ed). Webster's Third New International Dictionary. G. & C. Merriam Company (1963).

Bai Y. Surface modifications for enhanced immobilization of biomolecules: applications in biocatalysts and immuno-biosensor . Tesis Doctoral (2006).

Bhattacharya A. Radiation and industrial polymers. Progress in Polymer Science (2000) 25: 371-401.

Brandrup J., Immergut E. Polymer Handbook (1989).

Carbajal M. L. Bioreconocimiento sobre superficies poliméricas: Aplicaciones en Biotecnología. Tesis Doctoral (2008).

Carbajal M. L., Smolko E., Grasselli M. Oriented immobilization of protein on grafted polymers. Nuc. Instr. Meth. Phys. Res. B (2003) 208: 416-423.

Cardona, Hill, Perera, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. (2002) 40: 3191.

Chu Y., Hsu C., Soma P., Lo Y. Immobilization of bioluminiscent *E. coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethylenimine. Bioresource Technology (2009) 100: 3167-3174.

Dargaville G., Hill D., Whittaker A. High energy radiation grafting of fluoropolymers. Progress in Polymer Science (2003) 28: 1355–1376.

Degussa Co. QUAB 151 y 188 para la cationización de polímeros. Guía técnica.

Duckett K. Surface properties of cotton fibers in surface characteristics of fibers and textiles. Schick M. (ed). Fiber Science Series. Marcel Dekker, Inc. (1975).

Gordon Cook J. Handbook of Textile Fibers, Part I. Natural Fibers. Merrow Publishing Co. Ltd. (1968).

Grasselli M., Camperi A., Wolman F., Smolko E., Cascone O. Immobilized metal ion affinity hollow-fibre membranes obtained by the direct grafting technique. Radiation Physics and Chemistry (1999) 55:2; 203-208.

Grasselli M., Carbajal M.L., Yoshii F., Sugo T. Radiation-induced GMA/DMAA graft copolymerization onto porous PE hollow-fiber membrane. J Appl Polym Sci (2003) 87: 1646-1653.

Grube M., Gapesb J., Schuster K. Application of quantitative IR spectral analysis of bacterial cells to acetone-butanol-ethanol fermentation monitoring. Anal. Chim. Acta (2002) 471: 127-133.

Han J., Wang X., Wang H. Superhydrophobic surface fabricated by bulk photografting of acrylic acid onto high-density polyethylene. Journal of Colloid and Interface Science (2008) 326: 360-365.

Joseph M. Introduction to Textile Science (1986) 5ª ed.

Lee W., Furusaki S., Saito K., Sugo T., Makuuchi K. Adsorption kinetics of microbial cells onto a novel brush-type polymeric material prepared by radiation-induced graft polymerization. Biotechnology Progress (1996) 12: 178-183.

Lee W., Saito K., Furusaki S., Sugo T., Makuuchi K. Design of urea-permeable anion-exchange membrane by radiation-induced graft polymerization. J. Membrane Sci. (1993) 81: 295-305.

Liu X., Nishi N., Tokura S., Sakairi N. Chitosan coated cotton fiber: preparation and physical properties Carbohydrate Polymers (2001) 44: 233-238.

Poonam K. Use of cationized cotton for textile effluent color reduction. Tesis Doctoral (2002).

Shaw C. Cotton. Sir Isaac Pitman & Sons Ltd., London (1967).

Swatloski R., Rogers R., Holbrey J. Dissolution and processing of cellulose using ionic liquids (2003) WO 03/029329.

Tabba A. Cationization of cotton with 2,3-epoxypropyltrimethylammonium chloride. Masters Thesis in Textile Chemistry. North Carolina State University (2000).

Terada A., Yuasa A., Tsuneda S., Hirata A., Katakai A., Tamada M. Elucidation of dominant effect on inicial bacterial adhesión onto polymer surfaces prepared by radiation-induced grafo polymerization. Colloids and Sufaces B: Biointerfaces (2005) 43: 99-107.

Wang H., Brown H. Atomic force microscopy study of the photografting of glycidyl methacrylate onto HDPE and the microstructure of the grafted chains. Polymer (2007) 48: 477-487.

Zu J., Wu M., Fu H., Yao S. Cation-exchange membranas by radiation-induced graft copolymerization of monomers onto HDPE. Radiation Physics and Chemistry (2005) 72: 759-764.

ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN BACTERIANA EN POLÍMEROS FUNCIONALIZADOS

En este capítulo se describe la caracterización de los materiales desarrollados como soportes para la inmovilización de bacterias: HDPE modificado por injerto (HDPE-EDA), fibras de celulosa modificadas por injerto (Cel-EDA) y por cationización química (Cel-TMA). Se describen las condiciones óptimas para la obtención de un biocatalizador inmovilizado y su operación, utilizando como microorganismo modelo *E. coli*. Para evaluar la efectividad de la inmovilización se utilizó una reacción biocatalítica como indicador de actividad y se comparó el comportamiento del biocatalizador inmovilizado con la conversión catalítica de células libres. Por último se evaluó la efectividad de los soportes desarrollados para la inmovilización de *L. lactis*.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de los problemas difusionales asociados con el atrapamiento celular en geles poliméricos (Jen *et al* 1996, Braschler *et al* 2005) la inmovilización celular por adsorción no sólo ha mostrado eliminar tales inconvenientes sino que también ha mostrado otras ventajas importantes como la simplicidad operativa y los mínimos efectos sobre las propiedades celulares (Huang *et al* 1998, Yang *et al* 1998). La adsorción de *E. coli* a una resina de intercambio iónico fue el primer ejemplo reportado de inmovilización celular (Hattori 1960) y constituye un método suave y reversible que permite la recuperación del soporte para regenerar el biocatalizador (Lee *et al* 1997).

La interacción entre el microorganismo y el soporte depende esencialmente de sus propiedades superficiales e involucra fuerzas de *van der Waals*, dipolo-dipolo y electrostáticas. Para el microorganismo la carga superficial e hidrofobicidad gobiernan la interacción (Buschholz *et al* 2005, Li *et al* 2004). La superficie de las células bacterianas se encuentra en general cargada negativamente; por ende la interacción elec-

trostática se favorece si el soporte posee un elevado potencial zeta (Yoshioka *et al* 1986).

Ambos factores, potencial de membrana e hidrofobicidad, no solo afectan la adhesión sino también la viabilidad y actividad de la célula inmovilizada. El grado de contribución de cada uno de estos parámetros en el proceso de inmovilización depende fuertemente de las características del soporte y del tipo de microorganismo (Terada *et al* 2006).

En general, cualquier tipo de material polimérico puede ser utilizado como soporte para inmovilización de células y/o enzimas, ya que la inmovilización se puede conseguir por interacciones no-específicas de corto alcance, como interacciones de *van der Waals*. Sin embargo, al tratarse de interacciones en general débiles, la ocurrencia de liberación del biocatalizador durante la reacción debido a las fuerzas de corte son elevadas y en consecuencia el biocatalizador inmovilizado pierde actividad rápidamente (*Liese et al* 2006). Por ello, se busca desarrollar materiales que posean grupos funcionales capaces de interaccionar con enzimas y/o células para generar inmovilizados de mayor estabilidad.

Una de las interacciones más importantes que puede contribuir a la estabilización del inmovilizado es la electrostática, debido a que está marcadamente influenciada por los potenciales de superficie de la célula y el soporte, y por la concentración iónica del medio (Hayashi *et al* 2001).

Además de poseer una densidad de carga favorable para la interacción electrostática con el microorganismo, la porosidad del material define la densidad celular inmovilizada y la fracción activa. Los soportes con poros suficientemente grandes (mayores al tamaño celular) son favorables para conseguir altas densidades de microorganismos por disponer de grandes superficies accesibles para la interacción y de un volumen muerto suficiente para asegurar el transporte de masa (Buchholz *et al* 2005).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Análisis de la inmovilización por determinación de actividad biológica. Para evaluar la inmovilización de *E. coli* en los soportes modificados en este trabajo se utilizó

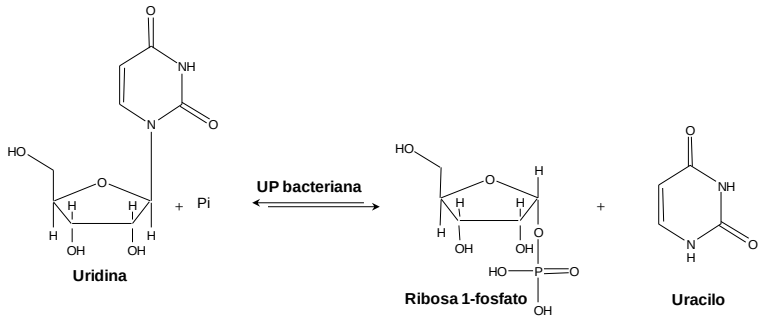


Figura 3.1
Reacción de hidrólisis de uridina por acción de la nucleósido fosforilasa de E. coli

como reacción estándar la fosforólisis de la uridina mediante la actividad de la u*ridín fosforilasa* (UP) (Fig. 3.1). Esta enzima pertenece a la familia de las nucleósido fosforilasas (NP) y cataliza el clivaje fosforolítico del enlace glicosídico de la uridina con la correspondiente formación de ribosa-1-fosfato y uracilo base.

Por otro lado, *L. lactis* posee el gen *pdp* que codifica para la pirimidín nucleósido fosforilasa (PNP). Esta enzima posee actividad sobre varios sustratos relacionados, como uracilo, uridina, desoxi-uridina, timina y timidina (Martinussen *et al* 1994, Kilstrup *et al* 2005). En condiciones apropiadas, cataliza la fosforólisis de timidina a timina y ribosa-1-fosfato (Fig. 3.2).

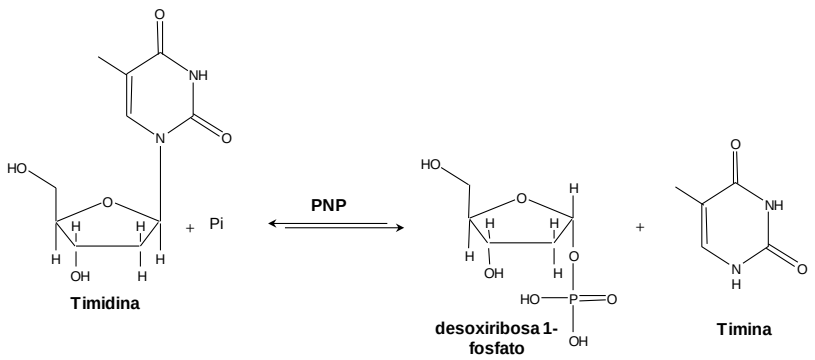


Figura 3.2
Reacción de hidrólisis de timidina por acción de la pirimidín nucleósido fosforilasa de L. lactis

Este tipo de reacciones poseen la ventaja de que se llevan a cabo sólo con la presencia del nucleósido sustrato en una solución *buffer* que aporte el ión fosfato (Pi) necesario para el clivaje. Adicionalmente, la generación de un único producto facilita el estudio del curso de la reacción biocatalítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos. Los reactivos utilizados (sales, nucleósidos, bases nucleotídicas) fueron de grado analítico (ICN o Anedra), los solventes orgánicos de calidad cromatográfica o grado HPLC, según corresponda (Anedra y Sintorgan, respectivamente), mientras que los componentes de los medios de cultivos de calidad microbiológica (Britania).

Cultivo celular. E. coli BL21 (ATCC 47092) se utilizó como biocatalizador estándar. Para el establecimiento de cultivos de *E. coli* en medio líquido, se inocularon fracciones de 30 ml. de medio LB con un stock primario y se incubaron durante 12-16 horas a 37 ºC y 200-220 rpm. Se realizaron repiques de este cultivo en el mismo medio al 2%v/v. *Stocks primarios de L. lactis* sub. lactis (ATCC 11454) se utilizaron para inocular fracciones de 30 ml. de medio CTS. Estos cultivos se incubaron a 30 ºC y 100-150 rpm.

Ensayos de inmovilización. Se incubó una suspensión bacteriana en una porción del material modificado a 37 ºC y 200-220 rpm de agitación. Posteriormente, el material se lavó 2-3 veces con *buffer* fosfato (BP) 30 mM pH 7 estéril y se almacenó hasta su uso a 4 ºC en el mismo *buffer*.

Ensayo de incubación en medio de crecimiento. Una porción de HDPE modificado y sometido a inmovilización se incubó en medio LB a 37 ºC 200-220 rpm. Posterior a tres lavados con BP 30 mM pH7, se incubó nuevamente en medio LB fresco. Esta operación se repitió 6 veces y se midió actividad del biocatalizador en cada paso.

Ensayo de reutilización del soporte. Se utilizó material inmovilizado para ensayar diferentes protocolos de lavado (A, B, C y D) seguido por una nueva inmovilización. Volumen de trabajo 30 ml.

Lavado A: 3 lavados dH_2O 50 °C, 1 lavado NaOH 0,5M 50°C 1 h, 3 lavados dH_2O 50°C, 1 lavado H_3PO_4 pH 4 (0,5 M) 50°C 1h, 3 lavados dH_2O.

Lavado B: 3 lavados dH_2O 50 °C, 1 lavado NaClO 100 ppm (pH 10-11) 50°C 1 h, 3 lavados dH_2O 50°C, 1 lavado H_3PO_4 pH 4 (0,5M) 1 h, 3 lavados dH_2O 50°C.

Lavado C: 3 lavados dH_2O 50°C, 1 lavado Tween 80 0,1% pH 5-8 50°C 1 h, 3 lavados dH_2O 50°C.

Lavado D: 3 lavados dH_2O 50 °C, 1 lavado solución detergente 0,1% v/v pH 9-10, 50 °C 1 h, 3 lavados dH_2O 50 °C.

Inmovilización en agarosa. Se resuspendieron $1,5x10^9$ células de *E. coli* en 3 ml de agarosa al 3% p/v, la suspensión se goteó en aceite de girasol a 20 ºC en agitación suave, las bolillas formadas se lavaron dos veces con hexano y tres veces con solución fisiológica estéril y se almacenaron hasta su uso en BP 30 mM pH 7 a 4ºC.

Inmovilización en poliacrilamida. Se resuspendieron $1,5x10^9$ células de *E. coli* en 7,3 ml de BP 30 mM pH7. Se agregó 2,7 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%, 14 ul de TEMED (N,N,N´,N´tetrametiletilendiamina) y 50ul de APS (persulfato de amonio) 10%. Se mezcló suavemente y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. El gel formado se cortó en porciones de 0,5x0,5x0,5 cm aprox., se lavaron y almacenaron en BP 30 mM pH7 estéril a 4ºC hasta su uso.

Reacción testigo de hidrólisis de nucleósidos. El material inmovilizado, o células libres recuperadas por centrifugación, se incubaron en una solución de uridina o timidina (30 mM en BP 30 mM pH 7) a 45 o 30ºC (para uridina y timidina respectivamente) y 200-220 rpm de agitación.

Análisis del curso de reacción por TLC. La hidrólisis de nucleósidos se evaluó de manera cualitativa o semicuantitativa por cromatografía en capa delgada en placa de sílica utilizando cloroformo/metanol 8:2 v/v como solvente de corrida y revelado directo por lámpara UV.

Análisis cuantitativo de la reacción por HPLC. La hidrólisis de nucleósido se cuantificó por una cromatografía isocrática por HPLC, utilizando una columna C-18 Kromasil 100 (C18, 5 um, 25 x 4 mm) y un detector UV. Condiciones de corrida: 6 min en H_2O/Metanol 90:10 v/v, flujo 0,9 ml/min, detección en 254 nm. Se realizaron curvas de calibración de los nucleósidos y bases en el rango de 0,1-1 mM por triplicado para la cuantificación. Las muestras de reacción de hidrólisis se diluyeron con dH_2O hasta una concentración en el rango de la curva de calibración y se centrifugaron 5 min a 10000 g antes de la inyección. Las muestras se analizaron por duplicado y se informaron los valores como promedio y desvío estándar.

Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM). Las muestras del biocatalizador se incubaron en solución de fijación (p-formaldehido 4% p/v, glutaraldehido 0.25 % v/v en BP 0.1 M pH 7.4) y se lavaron con dH_2O. Se realizó una incubación posterior de 1 hora en OsO_4 (1%, v/v), se contrastó con acetato de uranilo (1% v/v), se deshidrató y se humedeció en Durcupan®. Se cortaron secciones del material y se examinaron con un microscopio de transmisión electrónica Siemens Elmiskop I.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inmovilización de E. coli en HDPE-EDA

La metodología general de inmovilización consistió en la incubación *ON* de una porción de HDPE de 0,15 cm^3 con 1 ml de una suspensión de *E. coli* en BP 30 mM pH7, y se utilizó una relación células/volumen de soporte de $4x10^{10}$ células/cm^3 de material. Esta relación se basó en resultados previos, donde se calculó la carga máxima de células en relación al área disponible de material para la adhesión (Trelles *et al* 2008). Las consideraciones para la estimación se describen brevemente a continuación.

El área disponible en el HDPE para la inmovilización celular, calculado por isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno, es de 0,1 m^2/g. Para calcular el número máximo teórico de células se consideró la superficie del polímero y la superficie estimada promedio de una célula bacteriana (2 μm^2). Por lo tanto, una sección de soporte de 0,15 cm^3, con 58 mg de peso y $5,8x10^{-3}$ m^2 de área, es capaz de contener 2,9 $x10^9$ células. Por lo tanto, para asegurar un exceso de células en la mezcla de inmovilización, se utilizaron $6x10^9$ células para secciones de 0,15 cm^3 de HDPE-EDA.

Análisis por Microscopia del material inmovilizado. El biocatalizador inmovilizado en HDPE-EDA deshidratado a temperatura ambiente se sometió a análisis por SEM como se indicó en *Materiales y Métodos* del Capítulo 2. En la Fig. 3.3 se pueden observar las huellas de las bacterias alojadas originalmente en la matriz del hidrogel, como círculos de aproximadamente 0,3 µm de diámetro.

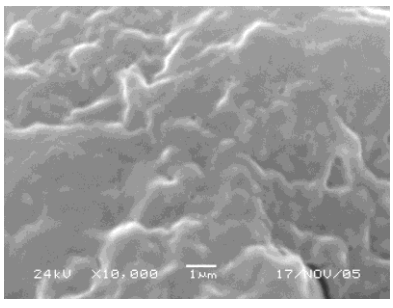


Figura 3.3
Microfotografias SEM de la superficie del biocatalizador inmovilizado

Con el objetivo de analizar la estructura del biocatalizador, el material inmovilizado con *E. coli* BL21 se fijó e incluyó en una resina para realizar una micrografía electrónica de transmisión (TEM) (Fig. 3.4). En estas imágenes de secciones transversales del biocatalizador inmovilizado, pueden identificarse tres regiones definidas: el hidrogel, una zona de transición y el soporte de PE.

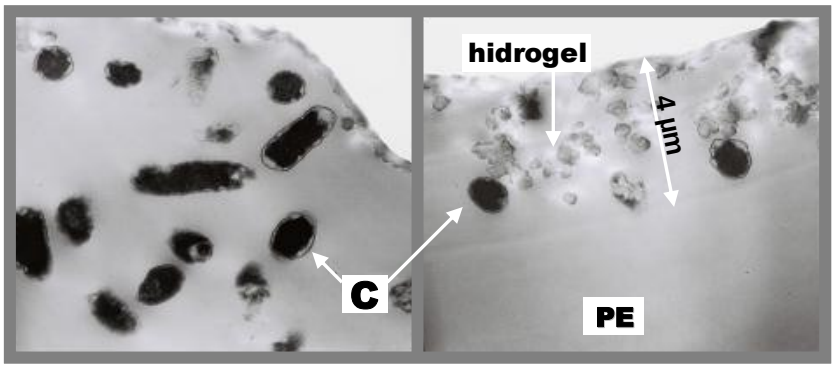


Figura 3.4
Microfotografías TEM del biocatalizador con la identificación de las diferentes regiones del material. C: células inmovilizadas, PE: polímero base

La zona externa del material, de estructura laxa, corresponde al pGMA derivatizado con EDA. Este hidrogel posee un espesor de aproximadamente 4 µm y se extiende sobre el polímero base de HDPE, que se visualiza en la microfotografía de la derecha como la zona inferior más densa.

Las células de *E. coli* inmovilizadas en HDPE-EDA se encuentran incluidas en la matriz del hidrogel, como se evidencia en la microfotografía TEM. Estas imágenes corroboran un modelo de interacción célula-soporte que no involucra únicamente interacciones del tipo adsortivas, sino que el hidrogel podría actuar a la vez como una barrera de confinamiento física para retener las células inmovilizadas en la superficie del HDPE modificado.

El hidrogel formado en superficies de polímeros por injerto posee una estructura de "peine flexible". Como se mencionó en el Capítulo 2, las cadenas de pGMA pueden poseer cierto grado de ramificación y adicionalmente pueden sufrir cambios conformacionales para minimizar la repulsión de cargas de los grupos de intercambio iónico presentes (Kawai *et al* 2000, Koguma *et al* 2000). Como resultado, las cadenas de pGMA cationizadas con EDA se estiran formando una estructura de cepillo que posee

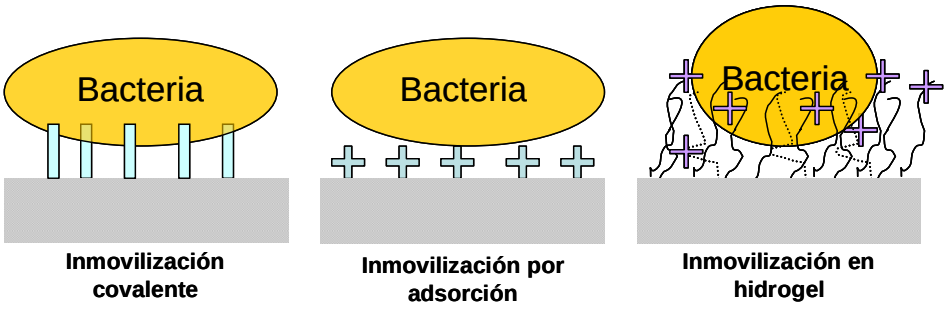


Figura 3.5
Comparación del efecto del tipo de interacción del soporte sobre la célula inmovilizada

la movilidad suficiente para rodear a la célula durante la inmovilización (Fig. 3.5). La interacción sobre toda la superficie reduce los efectos sobre la morfología celular, contrario a la inmovilización por entrecruzamiento químico (Lee *et al* 1996). Por otro lado, la modificación por injerto puede mejorar la estabilidad del inmovilizado con respecto a una adsorción por interacción electrostática simple. Además de que la interacción puede producirse sobre toda la superficie celular, el hidrogel puede mejorar la estabilidad del inmovilizado por proveer a la célula de un microentorno hidrofílico.

Análisis por Espectroscopía Infrarroja. El biocatalizador inmovilizado se analizó por espectroscopia ATR FT-IR como se describió en *Materiales y Métodos* del Capítulo 2. En la Fig. 3.6 se observan los espectros del HDPE modificado libre de células (a) y después del procedimiento de inmovilización (b).

La presencia de células inmovilizadas en el material modificado incorporó bandas características de moléculas biológicas. En el espectro (1b) de la Fig. 3.6 se destacan señales adicionales correspondientes a los grupos amidas de proteínas (1550 y 1660 1600 cm^{-1}), carbohidratos (1080 cm^{-1}), ácidos nucleicos (1250 cm^{-1}); y lípidos (2830-2930 cm^{-1} e hidroxilos de los compuestos orgánicos (3100-3400 cm^{-1}) en el espectro (2b) (Grube *et al* 2002).

De esta manera se pudo detectar la presencia de células inmovilizadas en el material por análisis de espectroscopía sin necesidad de realizar una confirmación por una técnica de visualización. A pesar de ser una técnica destructiva, es una opción para aquellos biocatalizadores que no puedan prepararse para microscopía.

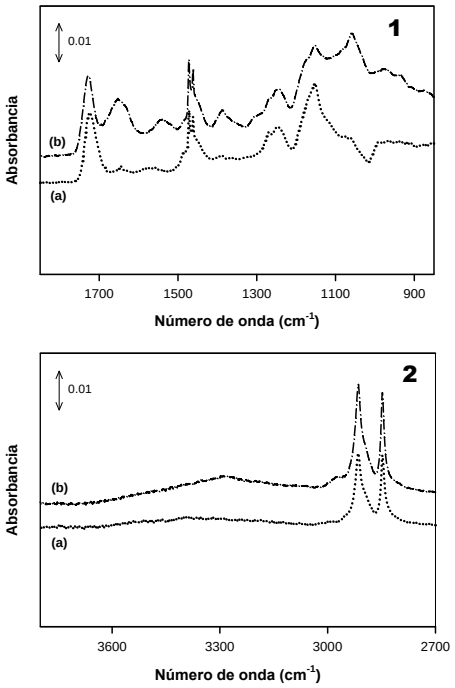


Figura 3.6
Espectros de ATR FT-IR. (1) 1900 a 850 cm^{-1} y (2) 3800 a 2700 cm^{-1}.a) HDPE-EDA, b)HDPE-EDA inmovilizado

Evaluación de la inmovilización por actividad biológica. Para evaluar la adsorción de los microorganismos a un soporte, otros autores utilizaron diferentes estrategias: medidas de absorbancia para estimar biomasa en suspensión (Terada *et al* 2006), recuento en placa (Lee *et al* 1996), tinción diferencial (Terada *et al* 2005) y cuantificación de señal de células bioluminiscentes (Chu *et al* 2009). En estos trabajos utilizaron volúmenes de inmovilización del orden de la decena de mililitros, que permite detectar pequeñas diferencias, por ejemplo en absorbancia. En este trabajo, se utilizó un volumen de inmovilización de 1 ml, por lo que es inviable la medición directa de absorbancia para la determinación de biomasa inmovilizada. La estimación de células viables, ya sea por recuento o por tinción vital, no es apropiada para la determinación, debido a que sólo en los casos de procesos de fermentación es necesario poseer un inmovilizado viable. Para reacciones de síntesis biocatalítica, como las utilizadas en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

este trabajo para caracterizar los soportes desarrollados, se utilizan células en condiciones de no-crecimiento. Por lo tanto, la estimación de biomasa inmovilizada mediante una reacción enzimática es una opción válida a las técnicas enunciadas y es la metodología que se utilizó en este trabajo. La actividad del biocatalizador inmovilizado se relativiza a la actividad desarrollada por una concentración conocida de células libres en las mismas condiciones de reacción.

Efectividad de la inmovilización de E. coli en HDPE-EDA. La fig. 3.7 muestra una comparación de las cinéticas de reacción de fosforólisis de uridina de *E. coli* in-

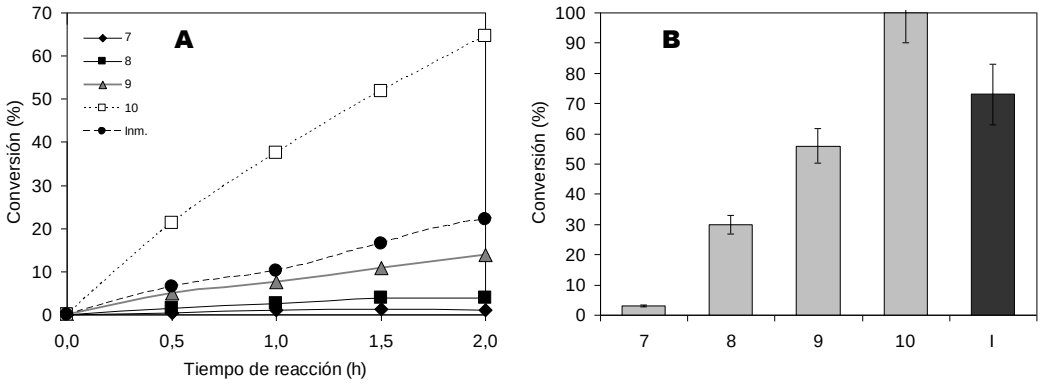


Figura 3.7
Comparación de la actividad de células libres e inmovilizadas en HDPE-EDA. A: Cinética de reacción para tiempos iniciales y B: Rendimientos de reacción a tiempo final para 7: 1x10^7 células, 8: 1x10^8 células, 9: 1x10^9 células, 10: 1x10^{10} células, I: Células inmovilizadas

movilizada en HDPE-EDA y en estado libre. Las células inmovilizadas en HDPE-EDA catalizaron la reacción con un comportamiento similar al de 1x10^9 células en estado libre. Asimismo, el rendimiento a tiempo final de reacción (Fig. 3.7 gráfico B) fue ligeramente superior al rendimiento con 1x10^9 células (73 ± 9 versus 56 ± 8 %). De la misma manera, la velocidad de reacción para las células inmovilizadas, estimada a partir de los tiempos iniciales, fue ligeramente mayor a 1x10^9 células (Fig. 3.7 A y Tabla 3.1). Estos resultados indican que se consigue la inmovilización de una pro-

Tabla 3.1
Velocidades iniciales (V_i en mM uracilo/h) para la reacción de fosforólisis de uridina con células libres e inmovilizadas

Células libres	V_i
1x10^7	0,3
1x10^8	0,9
1x10^9	3,0
1x10^{10}	12,7
Células inmovilizadas	***4,0***

porción mayoritaria de las células, dado que la incubación se realiza con $6x10^9$ células iniciales.

La diferencia sustancial entre los sistemas libre e inmovilizado se encontró en el tiempo de reacción. Los rendimientos obtenidos, calculados para tiempos finales de reacción mostraron que las células en suspensión llegan a conversiones máximas más tempranamente que el biocatalizador inmovilizado. La reacción con $1x10^{10}$ células en suspensión alcanzó el 70% de conversión a las 2 horas de reacción, mientras que las células inmovilizadas alcanzaron el mismo valor a las 8 horas. Estas diferencias observadas podrían deberse a efectos de transferencia de masa de reactivos y productos hacia y desde el hidrogel. Coincidente con otros métodos de inmovilización, la matriz del hidrogel podría actuar como protectivo contra alteraciones del medio pero también como barrera difusional reduciendo parcialmente la transferencia de masa (Chen *et al* 2002).

Determinación del tiempo óptimo de inmovilización. La determinación del tiempo de inmovilización toma importancia dado que, a nivel productivo, el tiempo requerido para llevar a cabo una operación es de suma relevancia desde el punto de vista de tiempo de proceso, consumo de energía y costo de producción. Con el objetivo de determinar el menor tiempo necesario para lograr la inmovilización de una suspensión de *E. coli* se ensayaron diferentes tiempos de inmovilización.

Para ello, se realizaron inmovilizaciones de $6x10^9$ células en HDPE-EDA a distintos tiempos de incubación: 4, 8, 12, 16 y 24 horas. Luego del lavado del material se ensayó la presencia de carga bacteriana por reacción testigo de fosforólisis de uridina.

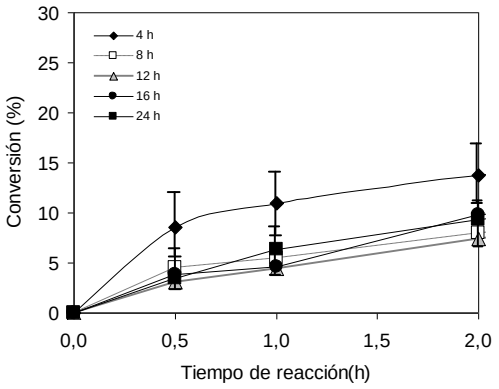


Figura 3.8
Efecto del tiempo de incubación sobre la inmovilización para la reacción de fosforólisis a tiempos iniciales

La fig. 3.8 muestra la cinética de

reacción de conversión de uridina con biocatalizadores inmovilizados sometidos a distintos tiempos de incubación con una suspensión de *E. coli.* No se detectaron diferencias significativas en las velocidades iniciales de reacción para incubaciones de 8 horas o más. Sin embargo, incubaciones de 4 horas dieron mejores rendimientos de inmovilización, que se reflejó en una mayor velocidad de reacción a tiempos iniciales. Como se explicó en el Capítulo 1, este tipo de inmovilización (mediada por adsorción) es reversible y por lo tanto es factible el establecimiento de un equilibrio entre células libres e inmovilizadas. Por otro lado, otros autores estudiaron el efecto de las fuerzas de corte (debidas a las condiciones de agitación y/o flujo de circulación) sobre la adhesión y desorción de bacterias a soportes sólidos, donde demostraron que altas fuerzas de corte pueden afectar la adhesión celular. Adicionalmente, mostraron que la fuerza de corte óptima para el paso de inmovilización representa un balance entre la fuerza necesaria para la liberación de la bacteria y la fuerza actuante en la adhesión (Liu *et al* 2002). Debido a que la inmovilización en estos materiales es reversible, es posible que las fuerzas de corte ejercidas durante incubaciones prolongadas reduzcan la cantidad de células inmovilizadas.

Trabajos de otros autores (Trelles *et al* 2008, Terada *et al* 2005) utilizan incubaciones de 8 a 16 horas para el paso de inmovilización. En este trabajo se demostró que es posible reducir el tiempo de inmovilización a 4 horas, con mejoras en la eficiencia de inmovilización.

Optimización de la carga microbiana. La capacidad catalítica de un biocatalizador inmovilizado está relacionada con la concentración de células confinadas, con el efecto del soporte y con el principio de inmovilización utilizado. Experimentos previos de optimización de la concentración bacteriana para la inmovilización de HDPE -EDA indicaron que la utilización de cantidades mayores a las del presente trabajo ($4x10^{10}$ células/cm^3 soporte) no conducen a mejorar la carga bacteriana en el soporte (Trelles *et al* 2005), por lo que no es factible aumentar la cantidad de biomasa inmovilizada por aumento en la concentración inicial de células. Por otro lado, existen estrategias

para "rejuvenecer" biocatalizadores inmovilizados y extender su vida útil que involucran incubaciones en condiciones que promueven el crecimiento celular (Norton *et al* 1994).

Por lo tanto, se ensayaron dos estrategias alternativas para incrementar la carga bacteriana inmovilizada: (a) re-inmovilizar el biocatalizador con una nueva suspensión de bacterias y (b) someter al biocatalizador a condiciones de crecimiento en medio de cultivo.

Para realizar la estrategia (a) se repitieron los pasos de inmovilización hasta seis veces con suspensiones bacterianas frescas sobre el mismo soporte. El efecto de aplicar inmovilizaciones sucesivas, o re-inmovilizaciones, se reflejó en un aumento del 10% en el rendimiento final de reacción hasta el cuarto paso de incubación (Fig. 3.9). A partir de la cuarta re-inmovilización la conversión de la reacción se redujo a valores comparables a los obtenidos con un solo evento de inmovilización. Esto podría explicarse como un efecto de máxima capacidad de

Tabla 3.2
Efecto sobre la cinética de reacción de las re-inmovilizaciones

Número de reinmovilizaciones	Velocidad inicial (mM/h)	Mejora (%)	Productividad (mM ura/g $_{soporte}$*h)	Rendimiento (%)
1	6	55	7	73
2	7	79	8	78
3	9	126	10	80
4	11	180	13	83
5	6	59	7	72
6	7	82	8	69

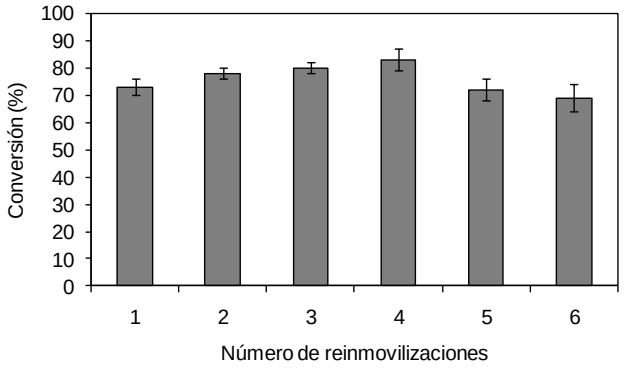


Figura 3.9
Efecto del número de pasos de re-inmovilización sobre el rendimiento de la reacción

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

inmovilización en las condiciones experimentales utilizadas, o por la formación de agregados celulares que reducirían la difusión de reactivos y productos en la matriz del hidrogel.

Sin embargo, las reinmovilizaciones generaron un incremento en las velocidades iniciales (Tabla 3.2), registrando una mejora de hasta el 180% con respecto al control de un único evento de inmovilización. La productividad inicial de la reacción también mejoró en este ensayo, aumentando de 7 a 13 mM Ura/g soporte*h.

La fig. 3.10 muestra las cinéticas de reacción del biocatalizador sometido a 1 y 4 eventos de inmovilización y la conversión de uridina con $1x10^9$ células libres. En este gráfico se evidencian los datos explicados anteriormente, donde la conversión inicial de reacción para el biocatalizador obtenido con 4 pasos de inmovilización fue significativamente mayor al biocatalizador con un paso de inmovilización y a la reacción llevada a cabo con células libres. A partir de los 30 minutos se observó una disminución en la velocidad de reacción para el biocatalizador con 4 eventos de reinmovilización posiblemente debido a limitaciones en la transferencia de masa.

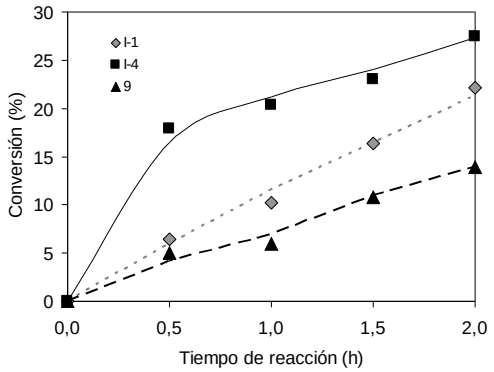


Figura 3.10
Comparación de cinéticas de reacción. I-1: 1 evento de inmovilización (control), I-4: 4 eventos de reinmovilización, 9: $1x10^9$ células libres

Con respecto a la estrategia (b) el biocatalizador inmovilizado por única vez con una suspensión de $6x10^9$ células se incubó sucesivamente en condiciones de crecimiento utilizando medio LB a 37 °C y 200 rpm de agitación.

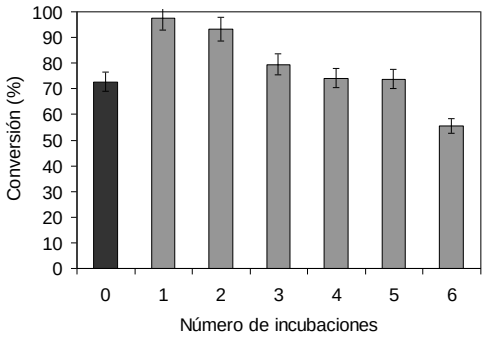


Figura 3.11
Efecto de las incubaciones en condiciones de crecimiento sobre el rendimiento de la reacción. La barra en negro corresponde al biocatalizador sin incubaciones con un evento de inmovilización

La fig. 3.11 representa el rendimiento del biocatalizador inmovilizado sometido a incubaciones sucesivas de 12 horas en condiciones de crecimiento. Se observa que con 1 a 2 incubaciones en medio LB el rendimiento incrementó desde un 73% inicial hasta una conversión casi completa. Con mayor número de incubaciones este rendimiento se redujo a niveles inferiores a la condición inicial, posiblemente debido a que la biomasa alcanza, en estas condiciones, una concentración que dificulta la transferencia de masa.

Tabla 3.3
Efecto sobre la cinética de reacción de las incubaciones en medio de crecimiento

Número de incubaciones	Velocidad inicial (mM/h)	Mejora (%)	Productividad (mM ura/g $_{soporte}$*h)	Rendimiento (%)
0	4	100	5	73
1	8	215	10	98
2	10	249	11	93
3	6	147	7	79
4	6	151	7	74
5	5	124	6	74
6	4	114	5	56

El aumento en el rendimiento de la reacción con una incubación en medio de cultivo rico en nutrientes posterior a la inmovilización se muestra adicionalmente en la Tabla 3.3. En la misma se detallan las velocidades iniciales y la productividad de la reacción. Concordante con el efecto sobre el rendimiento final, la velocidad inicial de la reacción catalizada por el inmovilizado sometido a 1 y 2 incubaciones mejoró en más de un 200% con respecto a la condición sin incubación.

La gráfica en la Fig. 3.12 muestra la cinética de reacción del biocatalizador con 1 y 2 incubaciones en LB y el control sin trata-

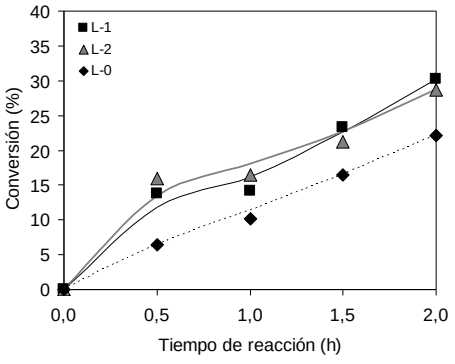


Figura 3.12
Comparación de cinéticas de reacción. LI-1: 1 incubación en LB, I-2: 2 incubaciones con LB, L-0: sin incubación en LB (control)

miento, donde se observa la mayor velocidad de conversión reflejo del aumento en la carga bacteriana. Como se observó en la estrategia (a) se detectaron limitaciones en la transferencia de masa a partir de los 30 minutos de reacción. Por lo tanto, además de ser una estrategia útil para recuperar la actividad de biocatalizadores inactivados (Junter *et al* 2004), la incubación en medios ricos es una estrategia atractiva para aumentar la concentración celular en biocatalizadores nuevos.

Ensayo de reusabilidad del biocatalizador. La reusabilidad es una propiedad que indica la cantidad de veces que puede ser utilizado un biocatalizador para un proceso determinado sin que pierda significativamente su actividad. Cuando los rendimientos de un biocatalizador disminuyen por debajo del 50% de su actividad inicial se considera inactivo.

Para determinar la reusabilidad del biocatalizador se inmovilizaron porciones de 0.15 cm^3 de HDPE-EDA con $6x10^9$ células de *E. coli*. Luego de ensayar la actividad del biocatalizador se lavó tres veces con BP 30 mM pH 7 y se utilizó para una nueva reacción. El biocatalizador retuvo más del 70% de la actividad inicial luego de 7 reusos, como puede observarse en la Fig. 3.13, donde se muestran los rendimientos de reacción del ensayo. En un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio con este soporte (Trelles 2005) se lograron 36 reusos sin pérdida significativa de la actividad biocatalítica inicial, mostrando la gran estabilidad y resistencia mecánica del biocatalizador desarrollado.

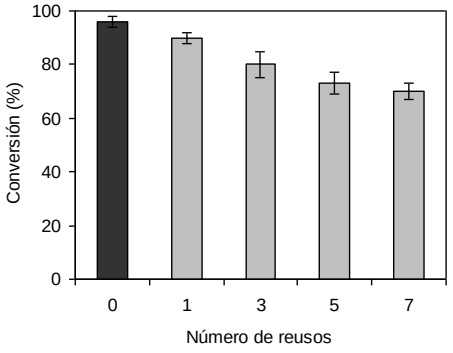


Fig. 3.13
Reusabilidad del biocatalizador. La barra en negro corresponde al biocatalizador sin uso

Ensayo de lavado del soporte. La vida útil de un biocatalizador inmovilizado está determinada, en general, por la actividad de las células confinadas en el soporte. Las incubaciones para regenerar la biomasa inmovilizada, junto con los reusos en múltiples procesos catalíticos, aumentan sustantivamente la utilidad del biocatalizador. Sin embargo, dado las características robustas del material desarrollado, tanto desde

el punto de vista físico como químico, se estudió la posibilidad de reutilizar el soporte para nuevas inmovilizaciones. Para ello, se ensayaron cuatro protocolos de lavado para remover las células inmovilizadas del soporte una vez que se han desactivado.

Los protocolos de lavado consistieron en tratamientos químicos fuertes (base y agente oxidante) y suaves utilizando detergentes y enzimas. Posterior al lavado, el material se sometió a una nueva inmovilización con suspensiones de *E. coli*. Cada paso de lavado incluyó controles, donde porciones de soporte lavado se sometieron a reacción de conversión de uridina antes de un nuevo paso de inmovilización. La ausencia de reacción de fosforólisis en estos controles se tomó como indicativo de la remoción completa de la biomasa.

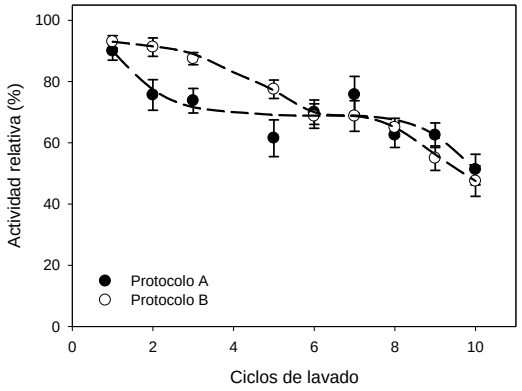


Figura 3.14
Actividad relativa del biocatalizador reinmovilizado después de cada ciclo de lavado según el Protocolo A (lavado NaOH) y B (lavado con NaClO)

Se realizaron 10 lavados por cada protocolo y posterior inmovilización en porciones de HDPE-EDA. Con todos los ensayos se logró la remoción completa de la biomasa inmovilizada, dado que los soportes inmovilizados, luego de los lavados, no retuvieron actividad catalítica. Sin embargo, fue necesario corroborar si se alcanza la misma eficiencia de inmovilización en estos soportes regenerados. En la Fig. 3.14 se presentan los resultados de la actividad relativa de soportes sometidos a *n* ciclos de lavado con agentes químicos fuertes. El lavado A corresponde al tratamiento con una solución de NaOH, mientras que el B es la denominación para el lavado con una solución de NaClO. En ambos casos, la actividad relativa se redujo en los primeros lavados. En el caso del lavado A, se ob-

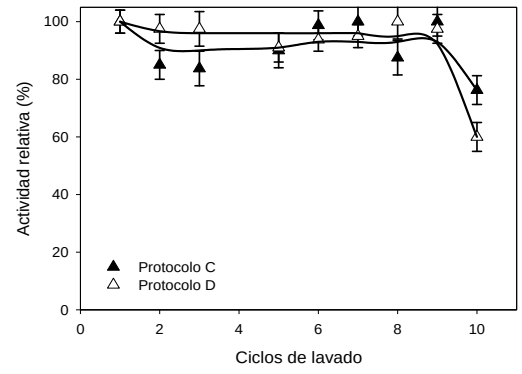


Figura 3.15
Actividad relativa del biocatalizador reinmovilizado después de cada ciclo de lavado según el Protocolo C (lavado con Tween80®) y D (lavado con detergente enzimático)

servó una reducción de casi el 20% de la actividad relativa con el primer lavado. El rendimiento de la reacción se mantuvo casi constante hasta el octavo lavado, donde se produjo un descenso significativo hasta valores inferiores del 45%, punto en el que se consideró como el límite de recuperación del soporte. En el caso del lavado B, la actividad relativa disminuyó gradualmente hasta llegar al valor límite de desactivación en el noveno lavado. A partir de estos resultados, se concluye que estos tratamientos, a pesar de que consiguen eliminar eficientemente la biomasa afectan las propiedades adsortivas del hidrogel.

La Fig. 3.15 representa la actividad relativa por reinmovilización de los soportes sometidos a lavados suaves. El lavado C corresponde al tratamiento con una solución de Tween® 80, mientras que el D involucra la incubación con una solución de detergente enzimático comercial. Ambos tratamientos mostraron ser altamente efectivos en la remoción de la biomasa retenida y en la retención de la actividad catalítica cuando el soporte se somete a un nuevo proceso de inmovilización. En ambos casos se observó una reducción cercana al 30% de la actividad del biocatalizador solo después de 9 lavados, sin llegar a una desactivación completa. Durante el desarrollo de este experimento no se observaron cambios visibles en las características físicas de los soportes. La reducción en la capacidad catalítica en los soportes durante los lavados podría explicarse por los efectos de los agentes utilizados sobre la integridad del hidrogel, dado que un menor rendimiento está asociado a una menor carga bacteriana inmovilizada.

Los resultados muestran que es factible la reutilización, o reciclado, del soporte para conformar un nuevo biocatalizador inmovilizado. Esta reutilización puede conseguirse hasta 9 veces por medio de lavados con detergentes sin pérdida apreciable de sus características como soporte.

Ensayos de inmovilización en Fibras de Celulosa

Comparación del biocatalizador inmovilizado. Se ensayó la inmovilización de *E. coli* en porciones de fibra de algodón sometidas a las dos metodologías de modificación descritas en el Capítulo 2, Cel-EDA y Cel-TMA. Para ello, se incubaron 20 mg de cada soporte con $3x10^9$ células suspendidas en BP 30 mM pH7. El biocatalizador inmovilizado resultante, y suspensiones de células libres, se compararon utilizando la reacción de fosforólisis de uridina.

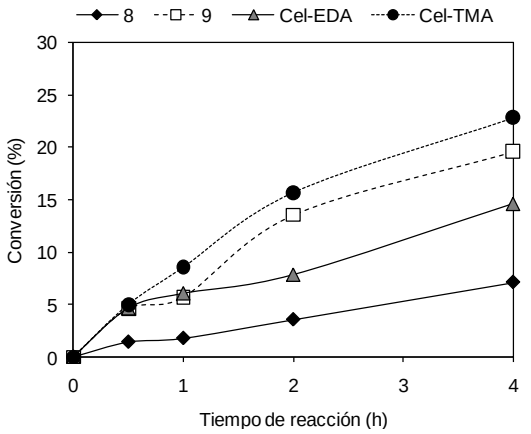


Figura 3.16
Cinética de reacción a tiempos iniciales de los biocatalizadores obtenidos por inmovilización en fibras de celulosa. 8: $1x10^8$ células, 9: $1x10^9$ células libres

La Fig. 3.16 muestra la cinética de conversión de uridina para el biocatalizador formado con Cel-EDA, Cel-TMA y dos suspensiones de *E. coli* con $1x10^8$ y $1x10^9$ células. La cinética de reacción a tiempos iniciales indica que los microorganismos inmovilizados catalizaron la reacción con comportamiento comparable a $1x10^9$ células libres. En tiempos iniciales, por lo tanto, no se observaron diferencias sustanciales entre los dos tipos de modificación. En cambio, los rendimientos (Fig 3.17) de los biocatalizadores inmovilizados, aunque similares entre sí (44 ± 10 % para el Cel-TMA y 52 ± 7 % para Cel-EDA), fueron del mismo orden que $1x10^8$ células libres (50 ± 2 %).

En los biocatalizadores sobre fibras de celulosa sin modificar (control) se detectó una inmovilización poco significativa. La cinética de este inmovilizado dió una respuesta inferior a la condición con $1x10^8$ células libres. Además, este inmovilizado no fue estable ya que se observó liberación de células durante tiempos

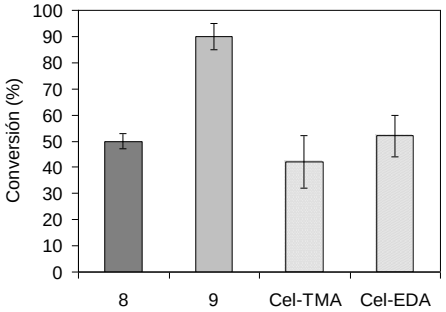


Figura 3.17
Rendimiento de la reacción de fosforólisis de uridina. 8: $1x10^8$ células, 9: $1x10^9$ células

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cortos de almacenamiento a 4 °C. De acuerdo a lo explicado en el Capítulo 1, la interacción entre las células y la celulosa sin cationizar puede ser menos estable que en el caso del polímero modificado, debido a repulsiones electrostáticas y al carácter más hidrófobo del soporte.

Determinación de la carga celular en la suspensión para inmovilización. Se realizaron experimentos de inmovilización en los dos soportes basados en fibras de celulosa (Cel-EDA y Cel-TMA) utilizando diferentes cantidades iniciales de células: $3x10^8$, $3x10^9$ y $3x10^{10}$. La Fig. 3.18 muestra los rendimientos a 8 horas de reacción de fosforólisis de uridina para estas inmovilizados.

No se observaron diferencias significativas en los rendimientos de reacción con el soporte Cel-EDA inmovilizado con diferentes cantidades de células, contrario a lo observado con Cel-TMA. En este caso, para la menor concentración celular ensayada ($1x10^8$) se observaron rendimientos por debajo del 20%, que incrementaron hasta valores superiores al 40% al aumentar un orden la cantidad de células disponibles para la inmovilización ($1x10^9$). Este comportamiento fue similar a las inmovilizaciones en HDPE-EDA. Se observó un límite aparente de células a inmovilizar, a partir del cual el aumento de la cantidad de células en la suspensión no favoreció la actividad catalítica.

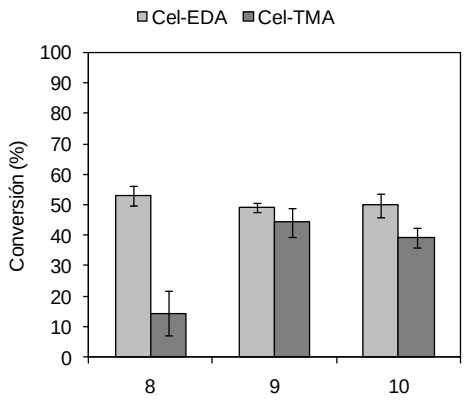


Figura 3.18
Efecto de la cantidad inicial de células sobre la inmovilización. 8: $1x10^8$ células, 9: $1x10^9$ células, 10: $1x10^{10}$ células

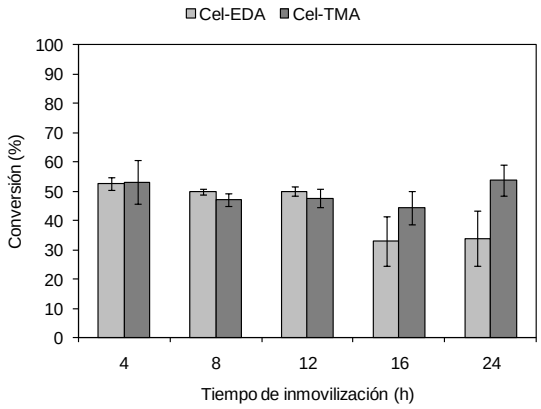


Figura 3.19
Efecto del tiempo de inmovilización en el rendimiento de la reacción

Determinación del tiempo óptimo de inmovilización. Se ensayaron experimentos de inmovilización a distintos tiempos de incubación del soporte con la suspensión

celular. Para ello, se incubaron porciones de Cel-EDA y Cel-TMA con suspensiones de $3x10^9$ células durante 4, 8, 12, 16 y 24 horas. Los biocatalizadores inmovilizados resultantes se evaluaron por su efectividad para catalizar la reacción de conversión de uridina en uracilo a 8 horas de reacción.

En la Fig. 3.19 se observa que la actividad de los inmovilizados con los dos soportes utilizados fue similar para todos los tiempos de incubación ensayados. El descenso en el rendimiento de la reacción a partir de las 16 horas de incubación para el soporte Cel-EDA podría deberse a la desorción de células del soporte, como se observó para el HDPE-EDA.

A partir de estos resultados, se concluyó que 4 horas fue un tiempo de incubación suficiente para la inmovilización de *E. coli* en estos soportes, coincidente con los resultados obtenidos con el HDPE-EDA.

Comparación entre inmovilización por adsorción y por atrapamiento. Se compararon los biocatalizadores inmovilizados obtenidos por incubación de *E. coli* con HDPE-EDA, Cel-EDA y Cel-TMA con dos obtenidos por atrapamiento en geles: agarosa y poliacrilamida. Estos geles se utilizan ampliamente para la inmovilización de células (Fernandez-Lucas *et al* 2008, Chen *et al* 2002). Para todas las condiciones se utilizó la misma carga celular, $1x10^9$ células, y porciones de 40 mg de HDPE-EDA y 20 mg de fibras de celulosa modificadas (Cel-EDA, Cel-TMA). Las inmovilizaciones en agarosa y poliacrilamida se prepararon como se explica en *Materiales y Métodos*. La Fig. 3.20 representa la conversión relativa de fosforólisis de uridina a 10 horas de reacción. Este ensayo muestra que el biocatalizador inmovilizado en HDPE-EDA dió el mejor rendimiento, mayor al 90 % con respecto a la misma cantidad de células libres. Los biocata-

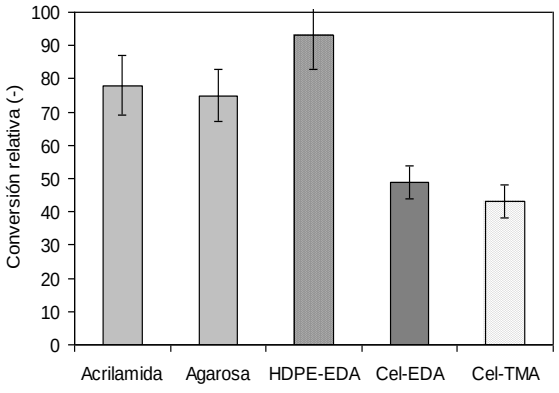


Figura 3.20
Comparación entre inmovilización por adsorción y por atrapamiento

lizadores inmovilizados en agarosa y acrilamida dieron rendimientos inferiores pero esta diferencia no fue significativa. Los biocatalizadores inmovilizados en fibras de celulosa, por otro lado, dieron rendimientos relativos sensiblemente menores, cercanos al 50%.

A diferencia de los biocatalizadores estudiados, durante la formación de los geles de agarosa y acrilamida todas las células agregadas a la mezcla quedan confinadas en la matriz del polímero. Por lo tanto la diferencia en rendimiento de los biocatalizadores por atrapamiento con el derivado del HDPE-EDA se pueden atribuir a barreras difusionales dentro de la matriz de los geles ensayados. En el caso de la inmovilización de HDPE-EDA se puede concluir que la transferencia de masa no influyó de manera significativa comparado con los demás biocatalizadores ensayados, debido a que la conversión relativa fue mayor al 90% con respecto a la reacción con células libres. Para los biocatalizadores derivados de fibras de celulosa, Cel-EDA y Cel-TMA, la diferencia en superficie y la menor disponibilidad de grupos aminos en la fracción de soporte

Tabla 3.4
Superficie y aminos disponibles de los soportes utilizados. (1) estimado; (2) estimado de resultados del Capítulo 2

	Peso (g)	*Superficie*(1) *(m^2)*	*Grupos amino*(2) *(µmol)*
HDPE-EDA	0,4	0,04	24
Cel-EDA	0,02	0,08	12
Cel-TMA	0,02	0,08	15

ensayada se reflejó en un menor rendimiento de reacción con respecto al HDPE-EDA (Tabla 3.4). La razón por la cual se utilizó una fracción menor de fibras de celulosa fue de índole experimental ya que es la fracción que permitió un mezclado aceptable en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, los soportes basados en fibras de celulosa poseen un 40-50% menos de grupos aminos disponibles para la interacción bacteriana, calculados en base a la cuantificación de EDA y TMA realizada en el Capítulo 2. Esta diferencia puede ser la razón de que los biocatalizadores derivados de estos soportes den cerca del 50% del rendimiento obtenido con células libres.

Los dos soportes obtenidos de fibras, Cel-EDA y Cel-TMA, poseen similar densidad de aminos disponibles para la interacción con las células bacterianas (Tabla 3.4) y, como se muestra en la Fig. 3.20, dieron niveles de actividad comparables.

Trabajos de otros autores sobre caracterización de superficies conteniendo grupos amino revelaron una relación proporcional entre potencial de membrana, densidad de grupos amino, y tasa de adhesión celular (Terada *et al* 2005). La adhesión bacteriana aumenta con el potencial de membrana hasta un valor máximo, más allá del cual se produce una reducción en la actividad del biocatalizador por pérdida de viabilidad (Terada *et al* 2006). Por lo tanto, la presencia de una mayor densidad de carga en Cel-TMA no se relaciona con una mayor tasa de inmovilización, posiblemente porque la presencia de una densidad de cargas mayor afecte negativamente la inmovilización.

Existen dos mecanismos propuestos para explicar la pérdida de actividad bacteriana por la interacción con superficies de polímeros (Kügler *et al* 2005, Tiller *et al* 2001). En uno de ellos, las cadenas poliméricas con cargas positivas de superficie desplazan cationes divalentes (Ca^{+2} o Mg^{+2}) las cuales sostienen la red de lipopolisacáridos, perturbando la estructura de la membrana externa. El otro mecanismo se produce cuando las cadenas poliméricas cargadas positivamente penetran en la membrana interna produciendo una apertura celular y eventual inactivación. Ambos mecanismos pueden operar en bacterias Gram-negativas (Lin *et al* 2003).

Ensayos de inmovilización de L. lactis

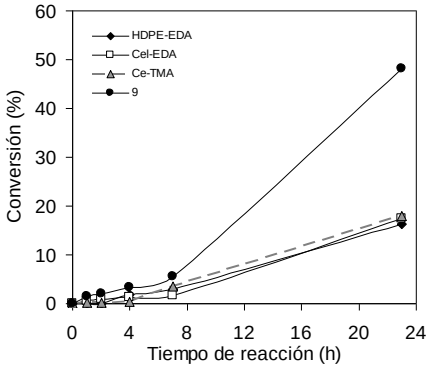
Inmovilización de L. lactis en soportes sintéticos y naturales. Se estudió la inmovilización de *L. lactis* sub. *lactis* en los tres soportes desarrollados en este trabajo: HDPE-EDA, Cel-EDA y Cel-TMA.

Para ello, se incubaron porciones de soporte en una suspensión conteniendo $3x10^9$ bacterias. Luego de 3 lavados con BP 30 mM pH7 estéril, el soporte inmovilizado se utilizó como catalizador de la reacción testigo de fosforólisis de timidina, según se

describió en *Materiales y Métodos*. En la Fig. 3.21 se muestra la cinética de reacción y valores de velocidad inicial de reacción y rendimiento para los tres soportes ensayados.

Los valores de velocidad inicial para los 3 biocatalizadores inmovilizados y el sistema libre (1x10^9 células) mostraron un comportamiento similar a tiempos cortos de reacción. Sin embargo, los rendimientos de reacción finales fueron significativamente menores a los de células libres y similares entre sí, representando un 35-40% del valor obtenido con 1x10^9 células libres.

Teniendo en cuenta que se utilizó la misma cantidad de células para inmovilizar, se puede inferir que todos los soportes alcanzaron la misma tasa de inmovilización y presentaron un perfil cinético comparable al sistema libre durante las primeras horas de reacción. Sin embargo, estos biocatalizadores no alcanzaron los rendimientos esperados. Si se compara con los rendimientos obtenidos con los mismos soportes con *E. coli* inmovilizada se observa que *L. lactis* tuvo un comportamiento diferente frente a la inmovilización, coincidente con las diferencias superficiales que poseen estos micoorganismos.



	Velocidad inicial (mM/h)	*Rendimiento (%)*
1x10^9 células libres	0,04	48
HDPE-EDA	0,05	16
Cel-EDA	0,02	17
Cel-TMA	0,04	18

Figura 3.21
Inmovilización de L. lactis en diferentes soportes. Cinética de reacción y valores de velocidad inicial y rendimientos obtenidos. 9: 1x10^9 células en suspensión

Determinación de la concentración de células para la inmovilización. Debido a las diferencias observadas entre la inmovilización de *E. coli* y *L. lactis*, se ensayó la concentración celular inicial óptima de este último para los soportes en estudio.

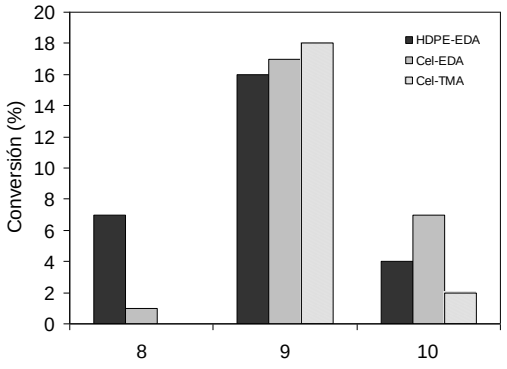


Figura 3.22
Rendimiento de la reacción para la inmovilización de L. lactis con diferente cantidad de células. 8: 1x10^8 células, 9: 1x10^9 células, 10: 1x10^{10} células

Para ello, se incubaron porciones de los 3 soportes en 1x10^8, 3x10^9 y 3x10^{10} células y se determinó la actividad biocatalítica. La conversión a tiempo final de la reacción (20 horas) de fosforólisis de timidina mostró que, una concentración inicial de 3x109 células fue la condición de mayor eficiencia de inmovilización para los 3 soportes ensayados (Fig. 3.22). Concentraciones mayores o menores a ésta no dieron rendimientos aceptables, coincidente con lo observado para el caso de *E. coli*. En particular, para el caso del Cel-TMA, no se observó catálisis de la reacción utilizando 3x10^8 células para la inmovilización.

Aumento de la carga bacteriana por reinmovilización. Con el fin de mejorar los rendimientos de reacción, se buscó mejorar la biomasa inmovilizada por inmovilizaciones sucesivas, como se aplicó para *E. coli*. Para ello, los 3 soportes en estudio se sometieron a 5 pasos de inmovilizaciones sucesivas con suspensiones de *L. lactis* conteniendo 3x10^9 células. Poste-

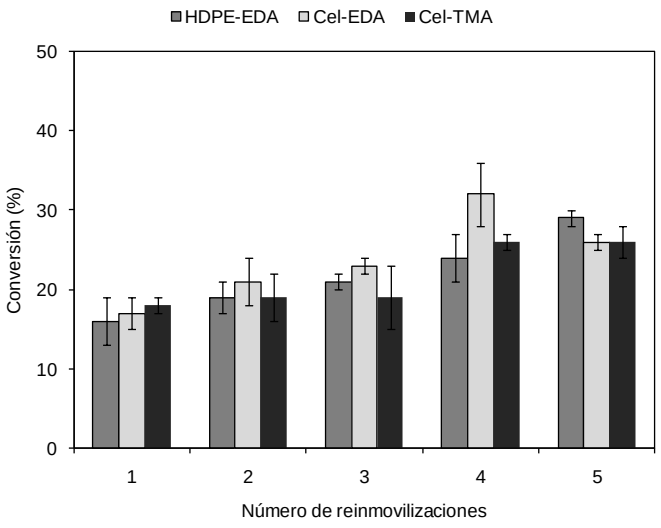


Figura 3.23
Rendimiento de la reacción para la re- inmovilización de L. lactis en HDPE-EDA, Cel-EDA y Cel-TMA

rior a cada paso de inmovilización se realizó una evaluación de la efectividad de la adhesión celular por determinación de la capacidad catalítica para la conversión de timidina.

La Fig. 3.23 muestra el rendimiento de la reacción biocatalítica a 20 horas. Se observa una tendencia general de mejora de la conversión para todos los soportes con las inmovilizaciones sucesivas hasta el 4 paso. En este punto, la conversión mejora sensiblemente con respecto a un único evento de inmovilización. En particular se observa una mejora de 1,4 veces para el HDPE-EDA, mientras que los soportes derivados de fibras de celulosa (Cel-EDA y Cel-TMA) este valor fue similar (1,26 y 1,35 respectivamente). Asimismo, para todos los soportes desarrollados se observó un efecto poco significativo con un paso más de inmovilización.

CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se comprobó la capacidad para inmovilizar microorganismos de los soportes desarrollados: HDPE-EDA, Cel-EDA y Cel-TMA.

La capacidad catalítica del biocatalizador en base a HDPE-EDA obtenido por inmovilización de *E. coli* fue similar a la obtenida con la misma concentración de células libres. Adicionalmente, fue posible optimizar la carga de biomasa en estos soportes a través de 4 re-inmovilizaciones o favoreciendo el crecimiento celular sobre el soporte por una incubación *ON* en medios ricos.

Se demostró además que el tiempo óptimo de inmovilización para este sistema es de 4 horas, reduciendo los tiempos de proceso global.

Finalmente se demostró que es posible regenerar 9 veces el soporte de HDPE-EDA a través de un proceso de lavado en condiciones suaves con detergentes y/o productos de limpieza enzimáticos, lo cual mejora significativamente la vida útil del soporte y reduce los costos asociados a su utilización.

En este trabajo se realizó por primera vez la modificación de fibras de celulosa por injerto en simultáneo y la aplicación de la cationización química con GTMA para desarrollar soportes para inmovilización celular. Se estudiaron parámetros básicos para el proceso de inmovilización en este tipo de materiales. No se encontraron efectos sobre el rendimiento de inmovilización con la concentración de células en suspensión para Cel-EDA utilizando *E. coli*. Por el contrario, la inmovilización en Cel-TMA requiere al menos $1x10^9$ células para obtener una inmovilización equivalente a los otros materiales.

Los 3 biocatalizadores desarrollados en este trabajo se compararon con dos tipos de inmovilizados por atrapamiento en geles: agarosa y acrilamida. Se observó que el biocatalizador basado en HDPE-EDA presentó rendimientos biocatalíticos similares a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

los obtenidos con biocatalizadores inmovilizados por atrapamiento con cantidades equivalentes de células inmovilizadas.

Por otro lado se estudió por primera vez la inmovilización de *L. lactis* en estos soportes. La efectividad de la inmovilización se analizó por su capacidad para catalizar la conversión de timidina en timina y ribosa-1-fosfato por acción de la 2´deoxi nucleósido fosforilasa presente en el microorganismo.

Los 3 soportes presentaron características adecuadas para la adhesión celular. Los rendimientos de los biocatalizadores inmovilizados obtenidos fueron sustancialmente menores al obtenido con un control de células libres en concentración similar. Cuando se analizó la actividad catalítica de estos soportes inmovilizados con suspensiones de $1x10^9$ bacterias, se obtuvieron rendimientos de reacción 50% menores al control de células libres, contrario a lo observado para *E. coli*. Esto se atribuye a la diferencia en composición de la superficie bacteriana entre Gram positivas y negativas.

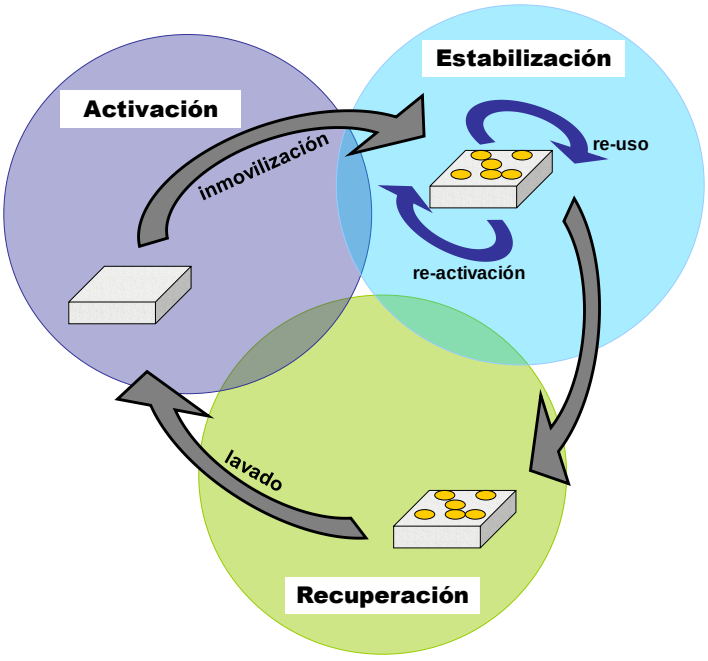


Figura 3.24
Estrategia de optimización de biocatalizadores

También fue posible mejorar en este caso la carga bacteriana por re-inmovilizaciones. Se obtuvo una mejora del 80 % en la conversión de timidina para el caso del HDPE-EDA con 5 pasos de reinmovilización, mientras que en el caso de Cel-

EDA el incremento en actividad fue del 90 %. Por otro lado, 4 pasos de inmovilizaciones sucesivas en Cel-TMA produjeron una mejora en la actividad biocatalítica del 44%. Sin embargo, a pesar de conseguirse un aumento en la biomasa inmovilizada, no alcanzó el nivel esperado con respecto a los resultados obtenidos con *E. coli*.

Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron establecer una estrategia general para optimizar el uso de biocatalizadores (Fig. 3.24). La posibilidad de aumentar la carga bacteriana en el material mejora los rendimientos del proceso. Los reusos, y en particular la reutilización del soporte, disminuyen los costos de producción relacionados con la obtención y preparación del biocatalizador. La posibilidad de recuperar el soporte para realizar una carga bacteriana fresca, es una característica distintiva de este tipo de materiales, en particular para el HDPE-EDA. Esto no es posible de realizar con otro tipo de soportes utilizado en bioconversiones, como son el agar y la agarosa.

En conclusión, tanto los soportes derivados de polímeros sintéticos como naturales resultaron adecuados para la inmovilización de las bacterias estudiadas, dadas sus características físicas, químicas y mecánicas. Estos materiales poseen gran potencial para su uso en múltiples aplicaciones desde purificación de efluentes hasta síntesis de compuestos de interés farmacológico y alimentario (Hibiya *et al* 2000, Talabardon *et al* 2000, Trelles *et al* 2005).

REFERENCIAS

Braschler T., Johann R., Heule M., Metref L., Renaud P. Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by *in situ* alginate hydrogel formation. Lab. Chip (2005) 5: 553-559.

Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U. Immobilization of microorganism and cells. In Biocatalysts and Enzyme Technology. Wiley-VCH (2005).

Burling F., Kniewel R., Buglino J., Chadha T., Beckwith A., Lima C. Structure of *E. coli* uridine phosphorylase at 2.0A. Acta Cryst. (2003) 59: 73-76.

Chen K., Lin Y., Chen W., Liu Y. Degradation of phenol by PAA-immobilized *C. tropicalis*. Enzyme and Microbial Technology (2002) 31: 490-497.

Chu Y., Hsu C., Soma P., Lo Y. Immobilization of bioluminiscent *E. coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethylenimine. Bioresource Technology (2009) 100: 3167-3174.

Fernandez-Lucas J., Condezo L., Quezada M., Sinisterra J. Low-temperature synthesis of 2´-deoxyadenosine using immobilized psychrotrophic microorganisms. Biotechnology and Bioengineering (2008) 100:2; 213-222.

Grube M., Gapesb J., Schuster K. Application of quantitative IR spectral analysis of bacterial cells to acetone-butanol-ethanol fermentation monitoring. Anal. Chim. Acta (2002) 471: 127-133.

Hayashi H., Tsuneda S., Hirata A., Sasaki H. Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesión behaviors in terms of DLVO theory. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2001) 222: 149-157.

Hattori T., Furusaka C. Chemical activities of *E. coli* adsorbed on a resin. J. Biochem. (1960) 48: 831.

Hibiya K., Tsuneda S., Hirata A. Formation and characteristics of nitrifying biofilm on a membrane modified with positively-charged polymer chains. Colloids Surf. B Biointerfaces (2000) 18: 105- 112.

Huang Y., Yang S. Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. Biotechnol. Bioeng. (1998) 60: 498-507.

Jen A., Wake M., Mikos A. Review: hydrogels for cell immobilization. Biotechnol. Bioeng. (1996) 50: 357-364.

Junter G., Jouenne T. Immobilized viable microbial cells : from the process to the proteome... or the cart before the horse. Biotechnology Advances (2004) 22: 633-658.

Kawai T., Sugita K., Saito K., Sugo T. Extension and shrinkage of polymer brush grafted onto porous membrane induced by protein binding. Macomolecules (2000) 33: 1306-1309.

Kilstrup M., Hammer K., Ruhdal Jensen P., Martinussen J. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews (2005) 29 :555-590.

Koguma I., Sugita K., Saito K., Sugo T. Multilayer binding of protein to polymer chains grafted onto porous hollow-fiber membranes containing different anion-exchange groups. Biotechnol. Prog. (2000) 16: 456-461.

Kügler R., Bouloussa O., Rondelez F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. Microbiology (2005) 151: 1341-1348.

Lee W., Furusaki S., Saito K., Sugo T., Makuuchi K. Adsorption kinetics of microbial cells onto a novel brush-type polymeric material prepared by radiation-induced graft polymerization. Biotechnology Progress (1996) 12: 178-183.

Lee W., Saito K., Furusaki W., Sugo T. Capture of microbial cells on brush-type polymeric materials bearing different functional groups. Biotechnol. Bioeng. (1997) 53: 523-528.

Li B., Logan B. Bacterial adhesion to glass and metaloxide surfaces. Colloids Surf B Biointerface (2004) 36: 81-90

Liese A., Seelbach K., Wandrey C. Industrial Biotransformations, 2º Ed. Wiley-VCH (2006).

Lin J. Qiu S., Lewis K., Klibanov A. Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkilated polyethylenimine. Biotechnol. Bioeng. (2003) 83: 168-172.

Liu Y., Tay J. The essential rol of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. Water Research (2002) 36: 1653-1665.

Martinussen J., Hammer K. Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *L. lactis*. Journal of Bacteriology (1994) 176: 21; 6457-6463.

Norton S., D'Amore T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. Enzyme Microb. Technol. (1994) 16: 365– 75.

Talabardon M., Schwitzguebel J., Peringer P., Yang S. Acetic acid production from lactose by an anaerobic thermophilic coculture immobilized in a fibrous-bed bioreactor. Biotechnol. Prog. (2000) 16: 1008-1017.

Terada A., Yuasa A., Kushimoto T., Tsuneda S., Katakai A., Tamada M. Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces. Microbiology (2006) 152: 3575-3583.

Terada A., Yuasa A., Tsuneda S., Hirata A., Katakai A., Tamada M. Elucidation of dominant effect on inicial bacterial adhesión onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2005) 43: 99-107.

Tiller J., Liao C., Lewis K., Klibanov A. Designing surfaces that kill bacteria on contact. Proc. Natl. Acad. Sci. (2001) 98: 5981-5985.

Trelles J. Obtención de nucleósidos modificados con potencial actividad farmacológica mediante biotransformaciones. Universidad Nacional de Quilmes, Tesis Doctoral (2005).

Trelles J., Bentancor L., Grasselli M., Lewkowicz E., Iribarren A. Nucleoside synthesis using a novel macroporous grafted polyethylene as biocatalyst support. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic (2008) 52-53: 189-193.

Yang S., Lo Y., Chattopadhyay D. Production of cell-free xanthan fermentation broth by cell adsorption on fibers. Ohio State Univ, Columbus, OH, USA (1998).

Yoshioka T., Shimamura M. Studies of polyestirene-based ion-exchange fiber. V. Immobilization of microorganism cells by adsorption on a novel fiber-form anion exchanger. Bull. Chem. Soc. Jpn. (1986) 59: 77-81.

DESARROLLO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS Y TRATAMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

En este capítulo se describe el desarrollo de las técnicas analíticas necesarias para el análisis de cultivos de *L. lactis* y los protocolos de tratamiento de los componentes mayoritarios de un medio de fermentación industrial. Estas técnicas se utilizan para desarrollar los temas de los capítulos subsiguientes.

INTRODUCCIÓN

El estudio del crecimiento bacteriano y de la capacidad de generar un producto de interés involucra la disponibilidad de métodos de detección y cuantificación de los metabolitos principales. Para el sistema bacteriano en estudio resulta indispensable la cuantificación de la fuente de carbono y energía y el producto de interés.

Desarrollo de métodos analíticos

Cuantificación de lactosa y ácido láctico. Existen varios métodos de cuantificación de estos analitos, entre los que se destacan: enzimáticos, químicos y cromatográficos.

Métodos enzimáticos. Además de su especificidad, las determinaciones enzimáticas ofrecen alta sensibilidad, preparación rápida de las muestras, facilidad para automatización, y pocos requerimientos en equipamiento. La mayoría de las enzimas poseen un estrecho rango de pH para su máxima actividad, por lo que es necesario utilizar soluciones *buffers* para acondicionar las muestras. Las mediciones de los productos de reacciones enzimáticas se realizan por varios métodos, siendo la espectrofotometría uno de los preferidos. Si el producto de la reacción absorbe en el UV, visible o IR la concentración puede medirse directamente. En los otros casos deben utilizarse reacciones indicadoras coloreadas acopladas para su cuantificación.

El suero de leche posee como componente mayoritario lactosa, y se utiliza en este trabajo para el desarrollo de un medio de fermentación para *L. lactis*. La lactosa

es un disacárido de galactosa y glucosa unidas mediante un enlace glicosídico β 1-4 (Fig. 4.1).

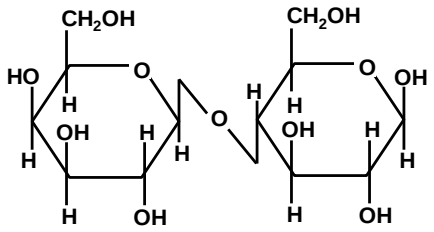


Figura 4.1
Estructura química de la lactosa

La lactosa se hidroliza por acción de la β-galactosidasa (o lactasa) en solución acuosa liberando D-glucosa y D-galactosa. A su vez las hexosas pueden determinarse por acción de una segunda enzima. En esta reacción la glucosa se oxida a ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa con formación estequiométrica de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno produce el acoplamiento oxidativo del fenol con 4-aminofenazona, formando un cromógeno que se cuantifica por absorbancia en 505 nm (Burin *et al* 2002).

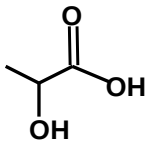


Figura 4.2
Estructura química del ácido láctico

Por otro lado, la determinación enzimática de ácidos orgánicos en general se basa en la medición de la variación de las coenzimas NADH o NADPH. La principal ventaja de estos métodos es que es posible cuantificar específicamente los isómeros de las especies presentes. El ácido láctico (Fig. 4.2) se convierte en piruvato por acción de la (L o D)-lactato deshidrogenasa y el NADH formado se cuantifica por absorción en 340 nm (Mato *et al* 2005).

Métodos químicos. Estos métodos se basan en la reacción del analito para dar lugar a la formación de compuestos o complejos coloreados que son cuantificados por espectrofotometría. La cuantificación de azúcares reductores por titulación con un agente oxidante es un método económico que no requiere equipamiento sofisticado. Un ejemplo de esta clase de determinación es el método fenol-sulfúrico para azúcares totales (Guerra *et al* 2001). Numerosos ácidos orgánicos, entre ellos el ácido láctico, se pueden cuantificar por reacción con p-fenilfenol (Barker *et al* 1941). El ácido láctico, en condiciones ácidas, se convierte en acetaldehído el cual reacciona cuantitativa-

mente con *p*-fenilfenol y el producto de la reacción redox se cuantifica por absorbancia en 560 nm. A pesar de que estos métodos son simples ambos poseen serias interferencias con otros compuestos orgánicos.

Métodos cromatográficos. El HPLC es una técnica ampliamente utilizada en análisis de muestras complejas debido principalmente a su alta sensibilidad y a la posibilidad de separación de compuestos no volátiles. La detección por UV es la más utilizada. Los carbohidratos en general absorben en el rango de 190-210 nm; sin embargo, esta región posee gran interferencia de otras especies orgánicas y de los solventes utilizados como fase móvil. Para mejorar la sensibilidad de la detección los carbohidratos se derivatizan, por ejemplo con *p*-aminobenzoico (Sexton 2004). Adicionalmente, se puede realizar la detección de carbohidratos sin derivatización por medida del índice de difracción (Desjardins *et al* 2001, Liu *et al* 2005). El ácido láctico y otros ácidos orgánicos son determinados por HPLC en fase reversa, cromatografía iónica y gaseosa. En muchos casos es necesario un paso de derivatización previo al análisis (Mato *et al* 2005). La detección se puede realizar por espectrofotometría, conductividad o mediante detectores electroquímicos (Niven *et al* 2004). Uno de los principales inconvenientes en la aplicación de estas técnicas es la necesidad de tratamientos previos de acondicionamiento (precipitación, filtración y tratamientos con resinas de intercambio iónico) que dificultan el análisis de grandes cantidades de muestras complejas.

Cuantificación de bacteriocinas. El efecto inhibitorio de la nisina sobre un microorganismo testigo es la base de la mayoría de los métodos de cuantificación desarrollados (de Vuyst *et al* 1994).

Existen tres métodos generales para la determinación de susceptibilidad bacteriana a un compuesto inhibitorio. Dos consisten en métodos de dilución para calcular la concentración crítica de inhibición del crecimiento de una bacteria sensible (Kawai *et al* 1997, Budde *et al* 2001), mientras que el tercero consiste en un ensayo por difusión en agar. Este último involucra el uso de la sustancia antibiótica en una zona central, en forma de disco o colocada en un sector delimitado del agar, para establecer un gra-

diente de concentración. Este gradiente de concentración se forma por difusión de la sustancia antibiótica, y por lo tanto está sujeto a las leyes de difusión (Ley de Fick). Bajo condiciones específicas de trabajo, la difusión en el agar es lineal y puede relacionarse la distancia de difusión con la concentración de la sustancia inhibitoria. La sensibilidad y exactitud de los métodos de difusión en agar (Fowler *et al* 1975, Tramer *et al* 1964) dependen de varios parámetros, siendo los más importantes la densidad bacteriana y la composición del medio de cultivo (Wolf *et al* 1996).

Para la aplicación en industria se reportan otros métodos de cuantificación que poseen ventajas principalmente en los tiempos de detección, aunque presentan a su vez ciertas limitaciones. Por ejemplo, es posible determinar la concentración de nisina A en quesos blandos por un método inmunológico basado en la reacción de anticuerpos policlonales (Falahee *et al* 1990). El método basado en un ELISA con anticuerpos monoclonales es más sensible que la difusión en agar pero presenta reactividad cruzada con subtilisina (Falahee *et al* 1992). Otro ejemplo de inmunoensayo permite la diferenciación de las variantes de la nisina (Dadoudi *et al* 2001). Por otro lado, un ensayo de bioluminiscencia, basado en la inducción de una cepa recombinante que expresa una proteína fluorescente (GFP o luciferasa) bajo un promotor inducible por nisina, se utiliza para la detección de esta bacteriocina en leche y otros productos lácteos (Wahlström *et al* 1999, Reunanen *et al* 2003).

Componentes de un medio de cultivo industrial

Para que las bacteriocinas sean un producto con viabilidad comercial es necesario que su producción sea económica. Hay dos alternativas para reducir los costos de producción: aumentar el rendimiento y/o diseñar medios de cultivo de bajo costo (Cho *et al* 1996). El suero es un subproducto de la industria láctea que puede servir como un medio de fermentación económico para la producción de bacteriocinas, en lugar de leche utilizada en las patentes de obtención (De Vuyst *et al* 1992).

Suero de leche. La industria láctea genera enormes cantidades de desechos líquidos que requieren una gran inversión de capital para su disposición. Aproximada-

mente el 85% del total de la leche utilizada para la fabricación de quesos se descarta como suero (Panesar *et al* 2007). Se estima que por cada kilogramo de queso producido se generan 9 kg de suero (Liu *et al* 2005). En Argentina se generan anualmente 3800 millones de litros de suero producto de la fabricación de quesos (Schaller 2009).

Mientras que parte de este suero es utilizado para formulaciones alimentarias y farmacéuticas, los volúmenes generados por la industria láctea sobrepasan los requerimientos del mercado y una fracción mayoritaria debe disponerse o ser procesado nuevamente. Cerca del 50% de la producción mundial total de suero de queso se trata y transforma en varios productos alimentarios, de los cuales el 45% se utiliza directamente en forma líquida, 30% como suero de queso en polvo, 15% como lactosa y subproductos de recuperación y el resto como concentrados de proteínas (Marwaha *et al* 2000). En Argentina, el suero se utiliza principalmente como aditivo para el engorde de cerdos, seguido por la elaboración de suero en polvo y concentrados de proteínas. Sin embargo, sólo se aprovecha del 20 al 25% del volumen disponible (Schaller 2009).

La disposición del suero genera graves problemas de polución. Afecta la estructura física y química del suelo resultando en un descenso en los rendimientos en siembra y, cuando se dispone en cuerpos acuíferos, reduce la vida acuática por depleción del oxígeno disuelto (Marwaha *et al* 1988). A pesar de ello, la disposición del suero en suelos se practica desde hace más de 50 años (Singh *et al* 2006).

Debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (40000-60000 mg/l) el suero disrumpe el proceso biológico de plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales. Las tecnologías de tratamiento de aguas residuales pueden asistir en la disposición segura del suero bajo las especificaciones ambientales, pero son muy costosas. Evaluaciones de biodegradabilidad de efluentes indican que todos los efluentes de la industria láctea pueden ser tratados juntos salvo el suero, cuya demanda de biodegradación compleja supera cualquier sistema de líquidos residuales y debe ser manejado por instalaciones separadas (Janczukowicz *et al* 2008).

La mayoría de las plantas lácteas no poseen sistemas de tratamiento apropiados para la disposición de suero, y el vertido constituye una pérdida significante de una potencial fuente de alimento y energía, dado que este desecho retiene aproximadamente el 55% de los nutrientes totales de la leche (Panesar *et al* 2007, Lobo *et al* 2009).

Actualmente, la demanda de suero se encuentra en expansión debido al hallazgo de beneficios aportados por ciertas proteínas del suero en salud humana. La aplicación farmacéutica de fracciones proteicas para el control de la presión sanguínea e inducción del sueño extienden el mercado del suero de leche. El informe "*The World Market for Whey and Lactose Products 2006-2010- From Commodities to Value Added Ingredients*" muestra un incremento del 60% en el consumo de productos con concentrados de proteínas de suero en el período desde 2001-2003 a 2004-2006 (The World Market… 2007).

Recientemente, otro informe evalúa las consecuencias económicas de las diferentes alternativas de procesamiento del suero. De todas las posibilidades, la obtención de concentrados de proteínas de suero presenta la mayor factibilidad, sin embargo este proceso genera un gran flujo de lactosa acuosa remanente que debe disponerse. Esto implica que el precio de las proteínas de suero debe compensar el gasto de disposición del permeato de lactosa generado como desecho. Una alternativa para incrementar el valor de los productos del suero es asignarle un valor agregado a la fracción de lactosa remanente (Peters 2005).

Esta situación representa una oportunidad para desarrollar tecnologías de conversión económicamente apropiadas para la recuperación de subproductos y generación de compuestos de alto valor agregado. La disponibilidad de un reservorio de lactosa y la presencia de otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos convierte al suero en un potente material crudo para la producción de diferentes bioproductos a través de procesos biotecnológicos. Procesos basados en suero para la obtención de proteína unicelular, levaduras de panadería, ácidos orgánicos,

aminoácidos, enzimas, saborizantes y pigmentos, bacteriocinas, gomas y polisacáridos microbianos son factibles técnicamente aunque aún no son económicamente viables (Kosseva *et al* 2009). De todos ellos, la producción de bacteriocinas, en particular nisina, es una de las opciones más atractiva debido a que se trata de un producto de alto valor agregado (Gonzalez 1996).

Tipos de suero y composición. De acuerdo al Código Alimentario Argentino, la denominación de suero de lechería comprende a "*los líquidos formados por parte de los componentes de la leche, que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos, por ejemplo de quesos, de manteca, de caseína o de ricotta*" (Schaller 2009). El tipo y composición del suero en las plantas de producción depende de las técnicas de procesamiento utilizada para la remoción de la caseína de la leche. El tipo mayoritario se origina de la manufactura de quesos donde el proceso se basa en la coagulación de la caseína por la renina, una preparación industrial conteniendo quimosina u otras enzimas que coagulan caseína (Fox *et al* 2000). La coagulación de la caseína inducida por renina ocurre a un pH aproximado de 6,5 y el suero generado se denomina comúnmente *suero dulce*. El segundo tipo de suero, el *suero ácido* (pH menor 5), resulta del proceso de la fermentación o de la adición de ácidos orgánicos o minerales para coagular la caseína, como en la manufactura de quesos frescos (Jelen 2003). En general, el suero producido de quesos coagulados por renina es bajo en acidez, mientras que la producción de quesos frescos tales como ricota o queso *cottage* rinde suero ácido.

Tabla 4.1
Componentes de los sueros (adaptado de Jelen 2003)

Componente	*Suero dulce (g/l)*	*Suero ácido (g/l)*
Sólidos totales	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Proteínas	6-10	6-8
Calcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfatos	1-3	2-4,5
Lactato	2	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Los principales componentes del suero, después del agua, son lactosa, proteínas y minerales (Tabla 4.1). Las principales diferencias entre los dos tipos de suero son el contenido mineral, la acidez y la composición de la fracción proteica. La coagulación ácida resulta en un incremento sustancial de la acidez (pH final 4,5) necesaria para la precipitación de la caseína. A este pH, el calcio coloidal contenido en las micelas de caseína presentes en la leche normalmente se solubiliza. La coagulación de la renina produce un fragmento de la molécula de k-caseína denominado glicomacropéptido (GMP). El GMP constituye aproximadamente el 20% de la fracción proteica del suero dulce y está ausente en el suero ácido. Otros pasos tecnológicos utilizados en el pretratamiento de la leche también influyen en la composición del suero (Panesar *et al* 2007). En Argentina, el suero generado de la fabricación de quesos (suero dulce) se utiliza parcialmente para la fabricación de ricota. Después de la extracción de las grasas y caseínas por tratamiento con renina, se hace una re-extracción ácida de proteínas con un tratamiento termo-cálcico, que genera a su vez suero ácido con una composición equivalente a la Tabla 4.1 salvo que el contenido en proteínas que es casi diez veces menor (Schaller 2009).

Aditivos. Dado que el suero disponible para la realización de este trabajo es este último, es de esperar muy bajos rendimientos en la obtención de nisina debido a su bajo contenido en proteínas. Por lo tanto, es necesario evaluar la adición de una fuente de nitrógeno para cubrir los requerimientos nutricionales del microorganismo productor.

Como se discute en el Capítulo 1, la fuente de nitrógeno puede consistir en una mezcla de aminoácidos puros o en el producto de un digerido de proteínas. En general, preparar un medio con aminoácidos puros resulta tedioso y costoso para escala industrial, por lo tanto la opción a estudiar en este trabajo es la adición de hidrolizados de proteínas. Dentro de ellos, la peptona de soja es un producto que puede utilizarse como fuente de aminoácidos y vitaminas para un medio de fermentación de este tipo de microorganismos. Sin embargo, este componente es costoso y hasta el

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

momento no se produce en el país. Por ello, en este capítulo se estudia adicionalmente la obtención de un hidrolizado de proteínas en base a harina de soja, que es un producto industrial de bajo costo y se encuentra disponible en el mercado local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos. Se utilizaron reactivos (sales, BSA, ácidos y bases) de grado analítico (ICN, Anedra, Sigma) y componentes para medios de cultivos de calidad microbiológica (Britania). El suero de ricota fue donación de Mogaris SA. Las harinas de soja fueron donación de Argensoja SA y de Soja Pampa SA. La solución de ß-lactamasa *Maxilact L2000®* fue donada por BIOTEC SA y la nisina patrón *Maxinis®* por AMG SA. Se utilizó reactivo de Bradford marca Bio-Rad, kit para determinación de glucosa de Wienner Lab y papaína marca Parafarm. Los microorganismos utilizados provienen de la colección de cultivos de CERELA (Tucumán, Argentina).

Cuantificación de glucosa. La determinación enzimática de glucosa se adaptó a microplaca. Para ello se mezcló 160 µl de reactivo de trabajo (preparado según detalla el fabricante) con 40 µl de muestra o solución patrón de lactosa digerida en concentración menor a 0,5 g/l. Se incubó a temperatura ambiente 15 min y se midió absorbancia en 505 nm. Las muestras y patrones se ensayaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio y desvío estándar.

Cuantificación de proteínas totales. La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (Bradford 1976) adaptado a microplaca. Para ello se mezclaron 160 µl de muestra con 40 µl de reactivo, se incubó a temperatura ambiente 15 min y se midió absorbancia en 565 nm. Como patrón se utilizó BSA en concentración de 8-80 µg/ml. Las muestras y patrones se ensayaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio y desvío estándar.

Tratamiento del suero. El suero se sometió a un tratamiento de desproteinización según trabajos de otros autores (Guerra *et al* 2001). Para ello, se ajustó el pH del suero a 4,5 y se esterilizó a 121ºC por 15 min. Se dejó enfriar, se filtró para eliminar el precipitado formado, se ajustó el pH a 6,3 y se autoclavó en las mismas condiciones que el paso anterior. De ser necesario se filtró nuevamente en esterilidad.

Tratamiento de la harina de soja. La harina de soja se sometió a tratamiento químico-térmico para liberación de proteínas en solución basado en trabajos de otros autores (Rao 2005). Se resuspendieron 2,5 g de harina en 50 ml de ácido acético 0,1 M pH 4,5, se incubó *ON* a temperatura ambiente en agitación. Se separó la solución sobrenadante y se agregó 50 ml de bicarbonato de sodio 0,1 M pH 8. Se incubó *ON* a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se agregó 1 ml de solución de papaína por cada 50 ml de mezcla (papaína 100 mg/ml en BP 20 mM, Cys 25 mM, EDTA 10 mM pH 6,5). La mezcla de digestión se incubó *ON* a 50 ºC sin agitación. Se dejó reposar en cámara refrigerada para decantar los sólidos y se recuperó el sobrenadante por filtración. Se ajustó el pH de la solución a pH 7 y se esterilizó por autoclave a 121 ºC 15 min.

Solución de nisina patrón. Como patrón se utilizó nisina comercial (2,5% en NaCl) disuelta en HCl 0,01N para dar una solución stock de 25 µg/ml. La solución stock se almacenó a -20ºC hasta su uso.

Cinética de crecimiento de cepas sensibles a nisina. Con un cultivo iniciado el día previo desde stock congelado se inocularon frascos con el medio apropiado en relación al 2% v/v por

triplicado para cada condición. Una vez iniciados, los frascos de cultivos se incubaron a la temperatura y condiciones de agitación apropiadas. Se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar absorbancia en 600 nm.

Microorganismos, medios y condiciones de crecimiento. *L. lactis* sub. *cremoris*: 30 ºC, 200 rpm, medio LAPTg. *L. delbrueckii* sub. *lactis*: 37 ºC, 200 rpm, medio MRS. *M. luteus*: 30 ºC, 200 rpm, medio LB.las composiciones de los medios utilizados se detallan en el anexo I.

Curva de recuento en placa. Se tomó en esterilidad una muestra de un cultivo *ON* de *L. lactis* sub. *cremoris* y se midió turbidez por absorbancia en 600 nm. Se realizaron 4 diluciones independientes del cultivo utilizando como diluyente LAPTg fresco. Se midió la absorbancia a estas diluciones. Para cada dilución se realizaron entre 4 y 6 diluciones seriadas al décimo dependiendo del valor de absorbancia registrado. Se sembraron por quintuplicado entre 30 y 100 µl de las diluciones por extensión con hisopos estériles en placas de agar LAPTg. Se incubaron a 30 ºC en estufa *ON* y se contaron las colonias desarrolladas en las placas. Límites de recuento: entre 30 y 300 colonias por placa. La gráfica se construyó luego de 10 experimentos similares como unidades formadoras de colonias (UFC/ml) *versus* absorbancia de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de métodos analíticos

Cuantificación de lactosa. Los métodos colorimétricos, y en particular los ligados a reacciones enzimáticos, poseen buena sensibilidad, y permiten el procesamiento de muestras en tiempos cortos. Debido a su alta especificidad estos métodos son apropiados para analizar muestras altamente complejas como el producto de una fermentación.

En este trabajo se diseñó un protocolo de cuantificación de lactosa a partir de dos reacciones enzimáticas acopladas: (i) hidrólisis de la lactosa presente en la muestra por incubación con β-galactosidasa (lactasa comercial), y (ii) cuantificación enzimática de la glucosa liberada por reacción de la glucosa oxidasa.

La glucosa oxidasa reacciona específicamente, por lo tanto se ajustaron los parámetros del protocolo para asegurar que ambas reacciones ocurran completamente. De esta manera, la glucosa medida por glicemia corresponde a la cantidad de lactosa presente en relación 1:1. Adicionalmente, se construyó una curva de calibración con lactosa como patrón.

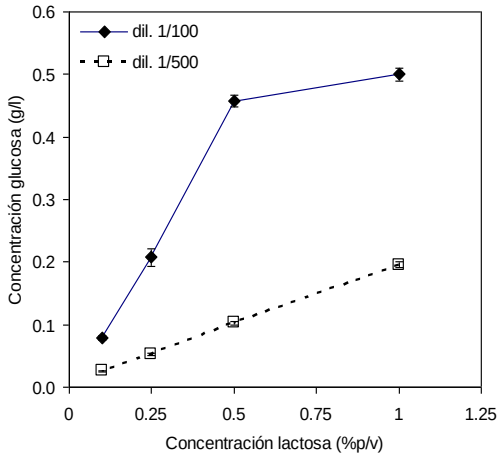


Figura 4.3
Efecto de la dilución de lactasa comercial en la determinación de lactosa

Para el primer paso de la hidrólisis de la lactosa, se estandarizó la cantidad de enzima a utilizar y el tiempo de hidrólisis. El segundo paso se realizó de acuerdo al ensayo de glicemia comercial, modificado para la determinación en microplacas de 96

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

pocillos. En la Fig. 4.3 se observa la relación entre concentración de lactosa patrón y estimación de la concentración por medición de la glucosa libre en solución para dos diluciones de lactasa. La solución de lactasa en dilución 1/100 dió una respuesta con mayor sensibilidad en concentraciones menores a 0.5 g/l que la dilución de mayor orden. Por lo tanto, esta dilución se utilizó para realizar el ensayo de hidrólisis, cuyo protocolo se describe a continuación. La Fig. 4.4 muestra una curva de calibración obtenida por este método.

Protocolo de cuantificación de lactosa

(1) Diluir las muestras o la solución patrón de lactosa con buffer fosfato 30 mM pH 7 para obtener soluciones de 1 a 0,25 % p/v de concentración.

(2) Mezclar 50 µl de solución conteniendo lactosa con 140 µl de buffer fosfato 30 mM pH7 y 50 µl de solución de lactasa comercial dilución 1/100. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

(3) Cuantificar la glucosa de las mezclas de digestión resultantes como se describe en Materiales y Métodos.

Asimismo, se corroboró que la presencia de nisina y ácido láctico en las muestras no interfieren con la cuantificación, por lo tanto este método es apropiado para el análisis de muestras complejas sin necesidad de tratamientos previos de acondicionamiento.

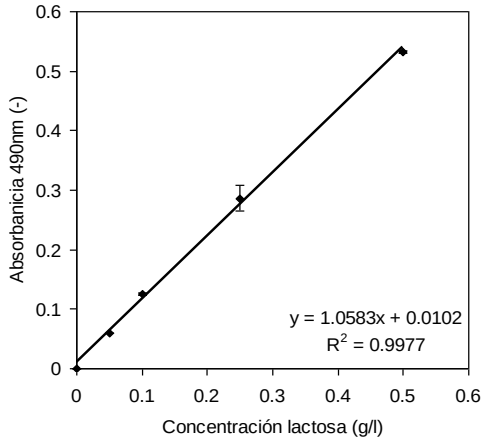


Figura 4.4
Curva calibración lactosa. Cada punto de la curva se ensaya por triplicado

Cuantificación de ácido láctico.

El método enzimático, aunque más preciso y específico, requiere de reactivos costosos para cuantificar grandes cantidades de muestras, por lo que se analiza como alternativa la determinación de ácido láctico por un método químico. Para ello, se diseñó un protocolo basado en el método del *p*-Fenilfenol en medio ácido (Barker *et al* 1941) que se detalla a continuación.

Protocolo de cuantificación de ácido láctico

(1) Mezclar 150 µl de muestra (10-50 mg/l de ácido láctico) con 850 µl de H_2SO_4 concentrado.

(2) Incubar 10 min a 100 °C y llevar inmediatamente a temperatura ambiente.

(3) Agregar 15 µl de $CuSO_4$ 4% p/v y 30 µl de reactivo de p-fenilfenol 1.5% en etanol 95%.

(4) Mezclar y dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.

(5) Incubar a 100 °C durante 90 seg para eliminar el reactivo en exceso que aporta turbidez a la coloración final y medir absorbancia en 560-570 nm a temperatura ambiente.

La Fig. 4.5 muestra una curva de ácido láctico patrón obtenida por este método. Cada punto de la curva se ensaya por quintuplicado.

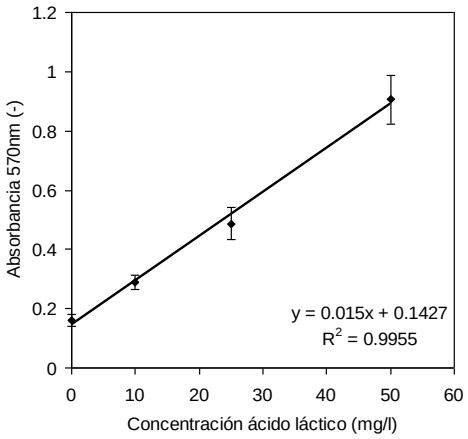


Figura 4.5
Curva calibración de acido láctico por el método químico

Los ensayos de muestras complejas (mezclas de ácido láctico, lactosa y glucosa) mostraron una seria interferencia en el paso de oxidación con ácido sulfúrico que afecta al desarrollo de la coloración final del ensayo. Por lo tanto, se realizaron pruebas para disminuir la interferencia a través de digestiones enzimáticas.

Modificación del protocolo para disminuir interferencias. Se ensayó una combinación de la reacción del *p*-fenilfenol con la reacción de determinación de lactosa, para minimizar la interferencia de la lactosa en la reacción de determinación de ácido láctico.

Para ello, se realizó una predigestión de mezclas de ácido láctico y lactosa en diferentes proporciones (Muestras A-E) con lactasa comercial en las mismas condiciones que las descritas para la determinación de lactosa. Luego del tratamiento, se realizó la cuantificación de lactosa y ácido láctico como se describe previamente. Los resultados de la cuantificación para las muestras ensayadas por triplicado se muestran en la Tabla 4.2.

La primer y tercer columna de la Tabla 4.2 muestra las concentraciones reales de los componentes de las mezclas, mientras que las columnas 2 y 4 corresponden a la cuantificación por el método adaptado para muestras complejas. En ninguno de los

Tabla 4.2
Cuantificación de muestras complejas de lactosa y láctico

	concentración de lactosa (g/l)		concentración de ácido láctico (g/l)	
	real	*experimental*	*real*	*experimental*
Muestra A	10	6,57	0	0,00
Muestra B	8	3,42	2	0,51
Muestra C	5	0,03	5	1,38
Muestra D	2	0,00	6	0,14
Muestra E	0	0,00	6	1,24

casos las cuantificaciones fueron representativas de las concentraciones reales de las muestras. A partir de estos resultados se concluyó que no es posible determinar ácido láctico en presencia de altas concentraciones de lactosa por el método de *p*-fenilfenol.

Por lo tanto se evaluó utilizar un método cromatográfico por HPLC en fase reversa con una columna RP-18 y detección en 210 nm (absorción de grupos carboxílicos) utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 0,01 M (Sun *et al* 2006). La Fig. 4.6 representa un cromatograma de una muestra patrón de ácido láctico de 8 mg/ml de concentración. Por este método fue posible cuantificar el ácido láctico, y otros ácidos orgánicos generados durante la fermentación de *L. lactis*.

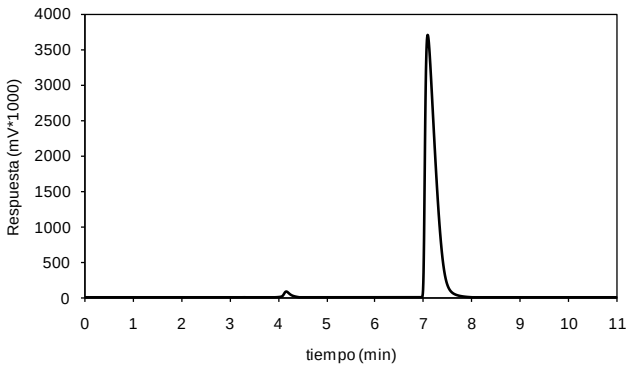


Figura 4.6
Perfil de HPLC del ácido láctico

Cuantificación de nisina. La determinación de nisina consiste en un ensayo biológico donde se determina la potencia de inhibición de crecimiento de una cepa bacteriana sensible al mismo. En este trabajo se utilizó un ensayo de inhibición por difu-

sión en agar. La sensibilidad y reproducibilidad del método es dependiente principalmente del medio de cultivo utilizado, la concentración de agar presente y la concentración de la cepa sensible en el medio. Todos estos parámetros debieron determinarse para establecer un protocolo experimental.

Selección de la cepa sensible para el bioensayo de nisina. La nisina A presenta acción inhibitoria del crecimiento de microorganismos estrechamente relacionados. De acuerdo a la bibliografía disponible se ensayaron tres microorganismos como cepa susceptible a nisina: *L. lactis* sub. cremoris ATCC 14365, *L. delbrueckii* sub. lactis ATCC 4797 y *M. luteus* ATCC 4698.

Las cepas se reconstituyeron desde *starters* liofilizados en medio de cultivo apropiados para cada cepa como se detalla en *Materiales y Métodos*. Para cada una se realizaron tres subcultivos sucesivos en medio líquido y estriado en placas del

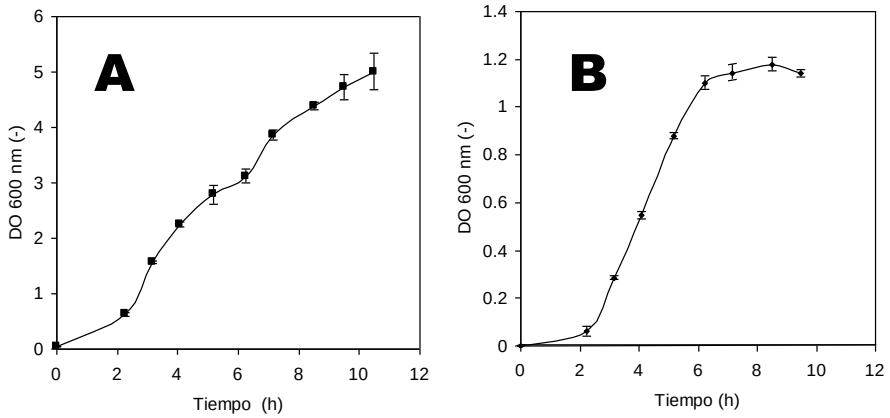


Figura 4.7
Cinéticas de crecimiento. A: M. luteus, B: L. lactis sub. cremoris

medio correspondiente con agar. Las colonias formadas se identificaron por morfología y microscopía.

L. delbrueckii subesp lactis no creció luego del primer subcultivo en medio líquido, por lo que no se incorporó en ensayos posteriores. Con el objetivo de evaluar las condiciones de crecimiento y estandarizar las condiciones de cultivo de la cepa sensible seleccionada, se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas *L. lactis* subesp cremoris ATCC 14365 y *M. luteus* ATCC 4698.

Las figura 4.7 muestra los perfiles de crecimiento de los microorganismos ensayados. *M. luteus* desarrolló colonias de gran tamaño, y fue dificultoso ajustar la densidad celular para lograr crecimiento homogéneo sobre la superficie de la placa de agar. Por lo tanto, se seleccionó *L. lactis* sub. cremoris ATCC 14365 como microorganismo sensible a nisina, debido a que no presentó ninguno de los inconvenientes observados para *M. luteus.*

Con respecto al crecimiento, *L. lactis sub. cremoris* presentó una cinética adecuada para los fines. El comportamiento cinético del microorganismo permitió estimar el tiempo necesario para obtener un cultivo saturado en fase exponencial en 6 horas de incubación.

Determinación de la curva de recuento celular. Para poder estandarizar la cuantificación de nisina por difusión, fue necesario determinar una concentración adecuada de *L. lactis sub. cremoris* a sembrar en la placa, asegurando así una mejor reproducibilidad del método. La nisina es capaz de revelar su actividad sólo cuando la bacteria sensible es viable, por lo que la determinación de densidad celular por medición de dispersión no es completamente adecuada. La medición de biomasa en suspensión por densidad óptica es una metodología muy simple y accesible en cualquier laboratorio. Por el contrario, el recuento de colonias viables en placa de agar es un método donde es posible determinar sólo las células viables presentes en una muestra, pero involucra un protocolo tedioso, con necesidad de realizar numerosas diluciones y réplicas por muestra. Adicionalmente, la cuantificación por recuento de colonias requiere incubaciones de larga duración, por lo que no es útil como método para determinar densidad celular durante un proceso. En consecuencia se realizó una curva

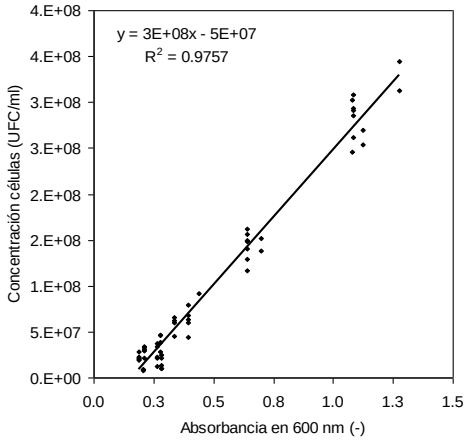


Figura 4.8
Curva UFC vs Absorbancia para L. lactis sub. cremoris

de cuantificación de biomasa que relaciona la densidad óptica con las unidades formadoras de colonia. El rango de mediciones que muestren una relación lineal entre los parámetros permitió establecer una correlación para determinar la densidad de un cultivo por medida de densidad óptica, siempre y cuando se mantengan las mismas condiciones de cultivo.

En la Fig. 4.8 se presenta la curva de regresión obtenida a partir de los datos experimentales. El gráfico corresponde a los datos obtenidos en 10 experimentos independientes para aumentar el grado de confianza del resultado obtenido.

Con esta información fue posible estandarizar densidad de células sensibles a sembrar por placa para el ensayo de difusión. Para ello, se sembraron por extensión diferentes diluciones y/o volúmenes de un cultivo saturado de L. *lactis sub. cremoris* en fase exponencial. Se seleccionó $1x10^7$ células por placa como la cantidad adecuada para que el microorganismo desarrolle una pátina uniforme luego de un período de incubación de 16 horas.

Bioensayo. Una vez determinadas las condiciones para obtener extendidos de la cepa sensible en placas de agar, se diseñó un protocolo para determinar la concentración de nisina por inhibición de crecimiento en medio sólido, el cual se detalla a continuación.

Protocolo de cuantificación de nisina

(1) Sembrar por extensión 10^7 UFC de L. lactis sub. cremoris en placas de LAPTg-agar.

(2) Colocar 10 µl de la solución conteniendo nisina en huecos realizados en el agar.

(3) Incubar ON en estufa a 30°C y medir el halo de inhibición formado.

Se utilizaron muestras de nisina de concentración conocida (0,1-1 µg/ml) para establecer una curva de calibración la cual se realiza de manera independiente para cada determinación.

En la Fig. 4.9 se muestra una placa con los halos de inhibición de crecimiento y un gráfico de diámetro de halo de inhibición en función de la concentración de nisina.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

El método de cuantificación de nisina por difusión presentó gran dispersión principalmente debido a heterogeneidades en el agar, sumado al error del operario en la medición del halo de inhibición. Por ello, todos los puntos, muestras o patrones de nisina, se ensayaron por quintuplicado.

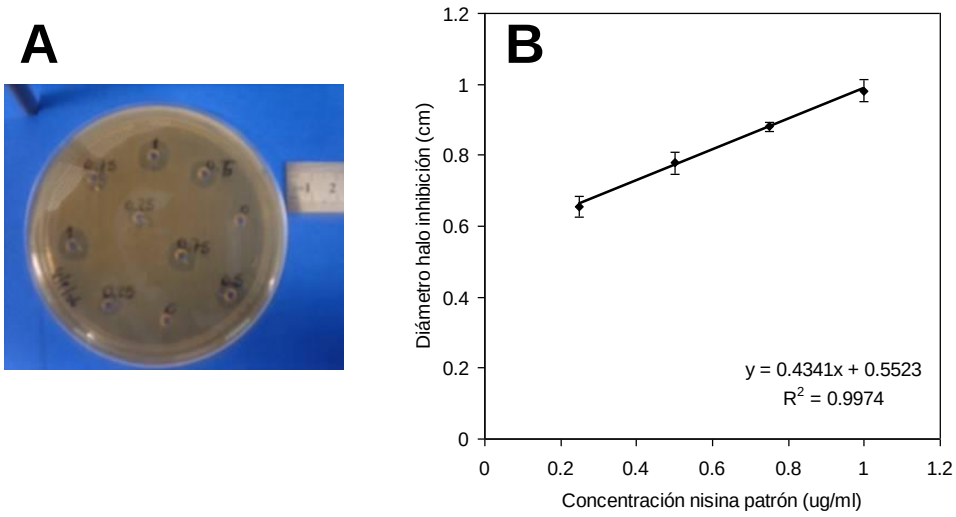


Figura 4.9
A: placa con halos de inhibición del crecimiento de L. lactis sub. cremoris.
B: curva de calibración para cuantificación de nisina

Preparación de componentes de un medio de fermentación

Tratamiento del suero de leche. Para la utilización del suero como base de un medio de fermentación se aplicó un protocolo de tratamiento de esterilización, basado en un trabajo de otros autores (Guerra *et al* 2001) como se detalla en *Materiales y Métodos*. Este procedimiento se seleccionó debido principalmente a que es fácilmente escalable. El mismo consta de una doble esterilización por calor, la primera a pH 4,5 y la segunda a pH 6,3 con remoción intermedia de los precipitados formados. Finalmente se filtra en esterilidad y se desecha el precipitado producido.

La utilización del suero sometido a este tratamiento para el crecimiento de *L. lactis* indicó que el tratamiento elegido para el suero es adecuado, como se muestra en los capítulos a continuación. Sin embargo, este procedimiento consta de dos tratamientos térmicos, que tienen el objetivo de eliminar proteínas insolubles, pero que

además elimina importantes nutrientes del suero que podrían ser aprovechados si éstos se mantienen solubles de alguna manera.

A partir del concepto de tratar de utilizar todos los componentes nutricionalmente importantes del suero, se diseñó un protocolo basado en un tratamiento enzimático. Si las proteínas componentes del suero se hidrolizan para dar péptidos solubles, estos no precipitan durante el tratamiento de esterilización y permanecen disponibles como fuente de aminoácidos y nutrientes, aprovechando al máximo los componentes del suero.

El protocolo para tratamiento de suero por métodos enzimáticos constó de las etapas que se detallan a continuación. Este tratamiento enzimático posee ventajas importantes con respecto al tratamiento térmico: (i) se evitan los cambios de pH, con ahorro de productos químicos y agua; (ii) se evita un tratamiento térmico con menores pérdidas de vitaminas y componentes termolábiles; (iii) se reducen en un 50% los procesos de esterilización y el tiempo total de procesamiento.

Preparación de lactosuero hidrolizado (LSH)

(1) Ajustar si es necesario, el pH del suero entre pH 6,5 y 7.

(2) Agregar 2 ml de solución de papaína 100 mg/ml (en BP 20 mM, Cys 25 mM, EDTA 10 mM, pH 6.5) cada 100 ml de mezcla de reacción.

(3) Incubar ON a 50 °C sin agitación.

(4) Incubar en frío para decantar los sólidos y recuperar el líquido sobrenadante.

(5) Ajustar el pH del sobrenadante a 7 y esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

La concentración de proteínas totales, determinada por Bradford, del suero sometido a este tratamiento fue de 0.05 g/l, valor esperado para la materia prima utilizada. Esto indica que durante el tratamiento no se produjeron pérdidas significativas de proteínas. Contrariamente, el suero con el tratamiento de doble esterilización basado en el trabajo de Guerra (Guerra *et al* 2001), no presentó una concentración en proteínas detectable por este método de cuantificación (< 8 µg/ml).

Preparación del hidrolizado de harina de soja. Con el objetivo de reemplazar los componentes del medio de cultivo que aportan fuente de nitrógeno orgánico (aminoácidos, péptidos y vitaminas), se estudió la posibilidad de usar hidrolizados de harina de soja.

Las proteínas de soja son inestables a pH levemente ácidos (4-5) con lo cual para mantener estos componentes en solución es necesario hacer una hidrólisis a péptidos más solubles. Por lo tanto, se desarrolló un protocolo de hidrólisis de proteínas de soja a partir de harinas comerciales adaptado del trabajo de Rao (Rao 2005). Se ensayaron dos tipos de harina de soja de producción nacional disponibles en mercado, cuyas características generales se detallan en la Fig. 4.10.

Harina Farmesa: Harina de soja elaborada a partir del poroto desgrasado e inactivado. Malla ASTM 140.

Harina Argensoja: Harina de soja micronizada elaborada a partir del poroto activo (no desgrasado). Granulometria 120 micrones.

Figura 4.10
Harinas de soja utilizadas

El hidrolizado de proteínas de soja se obtuvo por hidrólisis enzimática con papaína de grado técnico. Este tratamiento posee la ventaja de que, a diferencia de las hidrólisis químicas, se preserva la estructura de algunos aminoácidos esenciales y también genera péptidos de bajo peso molecular. Por ejemplo, la hidrólisis alcalina degrada la arginina y cisteína, mientras que la hidrólisis ácida elimina el triptofano y desamina la serina y treonina (Guadix *et al* 2000). El protocolo de hidrólisis de harina de soja se detalla en *Materiales y Métodos* con modificaciones operativas para ajustar los proto-

Tabla 4.3
Efecto de la digestión enzimática sobre el tipo de harina de soja

Harina	*Digestión enzimática*	*Absorbancia en 280 nm*
Argensoja	No	10,3
	Si	11,7
Farmesa	No	5,5
	Si	10,6

colos a la materia prima nacional (granulometría, disolución, viscosidad, etc.).

A nivel operativo las dos harinas fueron adecuadas para la digestión. En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de una estimación del contenido de péptidos y proteínas solubles del hidrolizado, estimado en base a la absorbancia en 280 nm. El hidrolizado de harina de soja de Farmesa mostró mayor rendimiento. Luego del tratamiento, la señal en 280 nm se duplicó para la harina Farmesa, mientras que la harina Argensoja mostró un leve incremento. Además, la harina Farmesa presenta un tamaño de partícula mayor, que simplifica la separación posterior al tratamiento de digestión. Cuando se aumentó la escala de trabajo al orden de litros, el hidrolizado obtenido con la harina Farmesa resultó operativamente más simple de realizar, debido a que por el tamaño y densidad de partícula se simplificaron los pasos de separación de sedimento por decantación. Desde el punto de vista del diseño de un proceso, esta característica presenta importantes ventajas ya que se reduce la potencia requerida para la agitación mecánica y la separación de fases.

Optimización del tratamiento de harina de soja. El procedimiento para la preparación del hidrolizado de harinas de soja también se simplificó eliminando las etapas de prelavados que tienen por objeto eliminar carbohidratos a través de la disolución en medio ácido. Esta operación unitaria se realiza normalmente en la producción de hidrolizados de harinas de soja para tener un producto más puro en proteínas. En este caso, como los carbohidratos solubles presentes no son tóxicos para el crecimiento del microorganismo a ensayar, esta operación puede ser eliminada y el protocolo se puede simplificar como se detalla a continuación.

Preparación optimizada de un hidrolizado de harina de soja (HHS)

*(1) R*esuspender la harina de soja en buffer fosfato 20 mM pH 7.

(2) Agregar 2 ml de solución de papaína 100 mg/ml (en BP 20 mM, Cys 25 mM, EDTA 10 mM, pH 6.5) cada 100 ml de mezcla de reacción.

(3) Incubar ON a 50 °C sin agitación.

(4) Incubar en frío para decantar los sólidos y recuperar el líquido sobrenadante.

(5) Ajustar el pH del sobrenadante a 7 y esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

De esta manera se redujo significativamente el tiempo de proceso a la mitad, de 3 a 1,5 días, y se eliminaron operaciones de lavado que requieren grandes cantidades de agua. Adicionalmente, este proceso es similar al utilizado para el tratamiento del suero de leche, por lo que se simplifican las operaciones.

Se analizó el contenido de proteínas y péptidos en los hidrolizados de harina de soja obtenidos por los dos protocolos de hidrólisis. La Tabla 4.4 muestra los resultados de una comparación del contenido de péptidos y proteínas del hidrolizado, estimado en base a la absorbancia en 280 nm y el contenido de proteínas determinado por la reacción de Bradford.

Tabla 4.4
Comparación de los tratamientos de hidrólisis de harina de soja

Harina / Tratamiento	*Absorbancia en 280 nm*	*Concentración de proteínas (g/l)*
Farmesa / sin digerir (HS)[a]	3	< 0,008
Farmesa digerida tratamiento completo (HSR)[b]	30	0,7
Farmesa digerida proceso optimizado (HHS)[c]	32	0,7

[a] Harina resuspendida en *buffer* sin tratamiento
[a] Tratamiento basado en Rao 2005
[b] Tratamiento desarrollado en este trabajo

En base a estos resultados, se observa que el nuevo tratamiento dio como resultado un digerido de características similares al obtenido por tratamiento químico completo. Adicionalmente, los tratamientos permitieron la liberación de proteínas de la matriz de la harina como se observa en la diferencia de cuantificación entre la harina sin tratamiento y sometida a hidrólisis.

Finalmente se comprobó que no es posible esterilizar el hidrolizado de soja junto con el suero de leche por reacciones químicas entre los componentes de cada uno. Esto condujo a la necesidad de preparar al menos dos soluciones estériles diferentes para obtener la formulación final del medio de fermentación, una solución produc-

to del tratamiento del suero de leche y una proveniente de la digestión de la harina de soja.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Conclusiones Parciales

En este capítulo se diseñaron las principales técnicas para estudiar el crecimiento bacteriano. Se determinó que la mejor técnica para determinación de ácido láctico es por HPLC. Para la cuantificación de lactosa se desarrolló un procedimiento enzimático que permite analizar muestras complejas como las de una fermentación.

Finalmente se ajustaron las condiciones experimentales para la cuantificación de nisina por un bioensayo. Para ello, se seleccionó el microorganismo indicador de actividad bactericida y se determinó el procedimiento para cuantificar nisina por difusión en agar.

Se optimizó un proceso para la obtención de un hidrolizado de harina de soja y los protocolos de acondicionamiento y esterilización del suero de ricota. En ambos casos se buscó simplificar los tratamientos para reducir tiempos y costos de elaboración y mejorar sus características nutricionales. En este sentido se incorporaron pasos de digestión enzimática con papaína para eliminar el agregado de sustancias químicas, disminuir el consumo de agua y reducir el tiempo del proceso. Estos componentes fueron la base de un medio de cultivo para ensayos de fermentación de *L. lactis*, los cuales se describen en el próximo capítulo.

REFERENCIAS

Barker, Summerson. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol. Chem. (1941) 138: 535.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem (1976) 72: 248-254.

Budde B., Rash M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assesment of the antibacterial effect of bacteriocins. Int. J. Food Microbiol. (2001) 63: 65-72.

Burin L., Buera M. β-galactosidase activity is affected by apparent pH and physical properties of reduced moisture systems. Enzyme and Microbial Technology (2002) 30: 367-373.

Cho H., Yousef A., Yang S. Continuous production of pediocin by immobilized *P. acidilactici* PO2 in a packed-bed bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1996) 45: 589-594.

Dadoudi L., Turcotte C., Lacroix C., Fliss I. Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies; suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2001) 56:114-119.

De Vuyst L., Vandamme E. Influence of the carbon source on nisin production in Lactococcus lactis subsp. lactis batch fermentations. J. Gen. Microbiol. (1992) 138: 571-578.

De Vuyst L., Vandamme E. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London (1994) 151-221.

Desjardins P., Meghrous J., Lacroix C. Effect of aeration and dilution rate on nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *L. lactis* UL719 in supplemented whey permeate. Int. Dairy J. (2001) 11: 943-951.

Ding L., Yao Z., Li T., Yue Q., Chai J. Study on papain immobilization on a macroporous polymer carrier. Turk J. Chem. (2003) 27: 627-637.

Falahee M., Adams M. Cross-reactivity of bacteriocins from lactic acid bacteria and lantibiotics in a nisin bioassay and ELISA. Lett. Appl. Microbiol. (1992) 15:214-216.

Falahee M., Adams M., Dale J., Morris B. An enzyme immunoassay for nisin. Int. J. Food Sci. Technol. (1990) 25:590-595.

Fowler G., Jarvis B., Tramer J. The assay of nisin in foods. Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. (1975) 8:91-105.

Fox P., Guinee T., Cogan T., McSweeney P. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers (2000).

Gonzalez S. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresour. Technol. (1996) 57: 1-11.

Guadix A., Guadix E., Paez-Dueña M., Gonzalez-Tello P., Camacho F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars. Pharmaceutica (2000) 41:1; 79-89.

Guerra N., Rua M., Pastrana L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. J. Food Microbiol. (2001) 70: 267-281

Janczukowicz W., Zieliński M., Debowski M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. Bioresource Technology (2008) 99:10; 4199-205.

Jelen P. Whey processing. In Roginski H., Fuquay J., Fox P (eds.). Encyclopedia of dairy sciences. London Academics Press (2003) 4: 2739-2751.

Joshi B., Sainami M., Bastawade K., Deshpande V., Gupta V., Ranjekar P. Pearl millet cysteine protease inhibitor. Evidence for the presence of two distinct sites responsible for anti-fungal and anti-feedent activities. Eur. J. Biochem. (1999) 265: 556-563.

Kawai Y., Saito T., Uemura J., Itoh T. Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *L. acidophilus* group lactic acid bacteria isolated from human feces. Biosci. Biotechnol. Biochem. (1997) 61: 179-182.

Kosseva M., Panesar P., Kaur G., Kennedy J. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. Int. J. Biological Macromolecules (2009) 45: 437-447.

Liu X., Chung Y., Yang S. Yousef A. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *L. lactis*. Process Biochemistry (2005) 40: 13-24.

Lobo Poblet M. Aspectos ambientales, sociales y económicos de la industria láctea. Unidad de Medio Ambiente, Secretaría de Industria, Comercio y PyME (2009).

Marwaha S., Arora J. Food Processing: Biotechnological Applications. Asiatech Publishers Inc. (2000).

Marwaha S., Kennedy J. Whey pollution problem and potential utilization. International Journal of Food Science and Technology (1988) 23:323-336.

Mato, Suárez-Luque y Huidobro. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. Food Res. International. (2005) 38: 1175-1188.

Niven, Beal, Brooks. The simultaneous determination of short chain fatty acid, monosaccharides and ethanol in fermented liquid pig diets. Animal Feed Sc. And Tech. (2004) 117: 339-345.

Panesar P., Kennedy J., Gandhi D., Bunko K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chemistry (2007) 105: 1-14.

Peters R. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. International Dairy Journal (2005) 15: 6-9; 537-545.

Rao A. Process for preparation of protein-hydrolysate from soy flour. US6.896.917 (2005).

Reunanen J., Saris P. Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence. Appl Environ Microbiol. (2003) 69:7; 4214-4218.

Schaller A. Sueros de lechería. Cadenas Alimentarias (2009) http://www.alimentosargentinos.gov.ar.

Sexton D. Determination of lactose by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography. MS Thesis. East Tennesee State University (2004).

Singh J., Ghaly A. Reduced fouling and enhanced microbial inactivation during online sterilization of cheese whey using UV coil reactors in series. Bioprocess and Biosystems Engineering (2006) 29: 4; 269-281.

Sun X., Wang Q., Zhao W., Ma H., Sakata K. Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolisis method. Separation and Purification Technology (2006) 49:43-48.

The World market for whey and lactose products 2006-2010-From commodities to value added ingredients. http://www.3abc.dk/Report%20information%202007.pdf.

Tramer J., Fowler J. Estimation of nisin in foods. J. Sci. Food Agric. (1964) 15:522-528.

Wahlstöm G., Saris P. Nisin bioassay based on bioluminescence. Appl. Environ. Microbiol. (1999) 65:3742-3745.

Whitaker J. Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker Incorporated (2002) 1006-1010.

Wolf C., Gibbons W. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. J. Appl. Bacteriol. (1996) 80:453-457.

ESTUDIOS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

En este capítulo se describen las condiciones de crecimiento y producción de nisina por *L. lactis* sub. *lactis* en medios complejos de laboratorio y en medios basados en suero de ricota (LS) e hidrolizado de harina de soja (HHS). Para ello se estudiaron cultivos en frascos agitados y en fermentador con el fin de encontrar la composición más apropiada de un medio de cultivo de aplicación industrial.

INTRODUCCIÓN

Fermentación de L. lactis y producción de nisina

L. lactis subespecie *lactis* ATCC 11454 produce nisina A. Debido a su peculiaridad estructural, los métodos de fermentación para la producción de nisina son la opción preferida (Sonomoto *et al* 2000). Comercialmente la nisina se obtiene por fermentación anaeróbica de células en suspensión con medios de cultivo basados en leche a pH controlado. Sin embargo, la productividad en estos sistemas es baja (aproximadamente 50 mg/l) por lo que la obtención de este compuesto en cantidades industriales es costosa (Miserendino *et al* 2008).

Los medios de crecimiento complejos; como de Man Rogosa and Sharpe (MRS), All Purpose with Tween (APT), Elliker, Brain Heart Infusion (BHIT), Triptona Glucosa Extracto de Levadura (TGE), Caldo Tripteína Soja (TSB), y Caldo Tripteína Soja Extracto de Levadura (TSBYE); promueven en general mejores rendimientos en crecimiento y producción (60-100 mg/l). Sin embargo, sus costos los convierten en prohibitivos para producciones a gran escala (de Vuyst *et al* 1992, Matsusaki *et al* 1996, Chinachoti *et al* 1997). Adicionalmente, algunos componentes de estos medios complejos, como péptidos y proteínas, no se consumen durante el crecimiento y pueden interferir en la purificación de la bacteriocina (Barefoot *et al* 1984). Por lo tanto, es de sumo interés el diseño de medios de crecimiento y/o producción económicos que permitan maximizar la productividad.

Para bacteriocinas tales como la nisina, la producción está asociada al crecimiento (Amiali *et al* 1998) y a numerosos factores como cepa microbiana, composición del medio de fermentación, temperatura y aireación (de Vuyst *et al* 1994). La densidad celular en el reactor, la fuente de carbono y el perfil de control de pH durante la fermentación juegan un rol vital en la actividad y rendimiento de producción de nisina (Parente *et al* 1999).

Requerimientos nutricionales de L. lactis. Muchos genes que codifican para enzimas anabólicas en las BAL están presentes en plásmidos, los cuales son susceptibles de perderse durante el crecimiento en cultivo y en ausencia de la presión de selección adecuada. Por lo tanto, en general los nutrientes requeridos por una cepa dependen de: (i) la fuente de aislamiento, (ii) el tiempo de mantención del cultivo en colección y (iii) el medio que se utiliza para mantener la cepa (van Niel *et al* 1999). Esto hace necesario ajustar la composición óptima de los medios de crecimiento y producción para cada cepa en particular (Zhang *et al* 2009).

Como se describió en el Capítulo 1, *L. lactis* es un microorganismo que requiere de medios ricos para obtener buenos rendimientos en biomasa y/o producto. Su limitada capacidad biosintética implica que para crecer y generar producto, debe importar precursores anabólicos del medio de crecimiento y sólo sintetiza *de novo* una fracción menor. Por lo que los medios para crecimiento de *L. lactis* deben contener, además de la fuente de carbono y energía, numerosos aminoácidos y vitaminas esenciales, fosfatos, potasio y magnesio (Novak *et al* 2000).

Las BAL son incapaces de crecer con una fuente de nitrógeno mineral en ausencia de aminoácidos exógenos (van Niel *et al* 1999). En particular para *L. lactis*, estudios de flujos metabólicos mostraron que este microorganismo no sintetiza *de novo* arginina, metionina, glutamato, leucina, isoleucina, valina, histidina y aspartato; y que de ellos los tres primeros son esenciales según ensayos *in sílico* (Oliveira *et al* 2005). *L. lactis* requiere además de la presencia de otros aminoácidos no esenciales, pero existen variaciones en la identidad y concentración de ellos entre cepas. Por otro lado, la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

glicina ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, posiblemente debido a que altera la síntesis de precursores del peptidoglicano (De Jonge *et al* 1996).

Las cantidades relativas de los aminoácidos son probablemente más importantes que sus concentraciones. A altas tasas de crecimiento, el transporte activo de ciertos aminoácidos podría actuar como limitante del crecimiento por inhibición competitiva, dado que en general poseen sistemas de transporte que sirven para la incorporación de más de un aminoácido (Poolman *et al* 1988).

Los aminoácidos pueden adicionarse en forma pura o como hidrolizados. Existen reportes de medios mínimos suplementados con aminoácidos puros que presentan efectos estimulatorios en la velocidad de crecimiento (Jensen *et al* 1993, Cocaign-Bousquet *et al* 1995, Zhang *et al* 2009). Estos medios contienen desde 6 a 18 aminoácidos, por lo que la preparación resulta tediosa. Una alternativa es el uso de hidrolizados de proteínas.

Los péptidos pueden derivar de diferentes fuentes, tales como digeridos papaínicos de leche descremada, extracto de levadura, triptona (caseína tratada con tripsina), peptona de soja, peptona de origen animal, licor de macerado de trigo, extracto de hígado e hidrolizado de proteínas de suero (Porubcan *et al* 1979). Dado que cada fuente contiene diferentes tipos de péptidos, cada cepa responderá de manera diferente debido a la especificidad de las enzimas involucradas. Por ejemplo, trabajos recientes muestran que el uso de fuentes de nitrógeno que son metabolizadas lentamente (como semillas de algodón o extracto de sangre) dan bajas velocidades de crecimiento pero, contrariamente, favorecen la biosíntesis de nisina en cultivos de *L. lactis* (Lv *et al* 2004).

Estudios con diferentes cepas de *L. lactis* muestran que las exo-enzimas y sistemas de transporte involucrados en la internalización de péptidos son altamente específicos con respecto a la longitud y secuencia. De acuerdo a esto, estos sistemas de transporte se clasificaron en tres tipos, que involucran (i) oligopéptidos (4-8 unidades), (ii) di- y tripéptidos y (iii) aminoácidos libres (Konings *et al* 1989).

Varios autores proponen que los péptidos son más importantes que los aminoácidos en la síntesis de bacteriocinas, argumentando que los sistemas de transporte celular son más eficientes para péptidos que para aminoácidos (Monnet *et al* 1994), que los aminoácidos están más protegidos del catabolismo cuando forman parte de péptidos (Law *et al* 1983), o que las células obtienen energía a través de la hidrólisis y subsecuente eliminación de péptidos (Aasen *et al* 2000). Una segunda corriente postula que los péptidos son inductores de la síntesis de bacteriocinas por activación directa de la transcripción una vez dentro de la célula o a través de un mecanismo de segundo mensajero.

Además de los aminoácidos, varias vitaminas del grupo B son esenciales para el crecimiento de BAL, siendo el nicotinato, pantotenato y la biotina esenciales para el crecimiento (Cocaign-Bousquet *et al* 1995). El nicotinato es necesario para la síntesis de NAD(P) y el pantotenato es el cofactor de la coenzima A. La biotina por otro lado, es necesaria para la síntesis de los ácidos oleico y aspártico. Para varias cepas de *L. lactis,* la tiamina y riboflavina son esenciales o estimulatorias del crecimiento. La riboflavina es necesaria como cofactor del FAD y la tiamina está involucrada en la oxidación del piruvato por la piruvato deshidrogenasa (van Niel *et al* 1999). Otros, como el ácido fólico y la vitamina B12 no son requeridos para el crecimiento. Estas vitaminas funcionan como cofactores en la síntesis de purinas y pirimidinas y pueden ejercer un efecto estimulatorio del crecimiento o ser esenciales en ausencia de bases nucleotídicas en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando el medio se suplementa con timidina o timina, estas vitaminas no son necesarias (Ledesma *et al* 1977).

Las bases nucleotídicas no son esenciales pero tienen un efecto estimulatorio sobre el crecimiento. Se consiguen incrementos de hasta un 35% en el crecimiento con medios ricos suplementados con ácidos nucleicos (Cocaign-Bousquet *et al* 1995).

Existen numerosas contradicciones sobre los requerimientos en minerales. El hierro se reporta como innecesario para el medio de crecimiento (Pandey *et al* 1994), mientras que para cultivos en condiciones aeróbicas el manganeso es un elemento

necesario para la actividad de la superóxido dismutasa (Hansson *et al* 1984). El magnesio es esencial para numerosas reacciones enzimáticas, y se encontró una dependencia de la concentración inicial de éste con la biomasa final (Vignolo *et al* 1995, Loubiere *et al* 1997). El calcio está involucrado en la maduración de la prenisina (Siezen *et al* 1995) y se observaron incrementos en la producción cuando *L. lactis* se cultivó en presencia de $CaCl_2$ (Taniguchi *et al* 1994), aunque este efecto también puede ser resultado del desplazamiento de la bacteriocina adsorbida a la superficie celular por el catión divalente, como lo propusieron otros autores (Matsusaki *et al* 1996).

Aditivos y condiciones de cultivo. El Tween® 80 afecta la permeabilidad celular y puede promover la incorporación y liberación de compuestos desde la célula. De esta manera este detergente puede incrementar la concentración de bacteriocina soluble por su liberación de la superficie celular (Vignolo *et al* 1995, Amiali *et al* 1998).

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento y obtención de productos en BAL está poco explorado. Por ejemplo, se determinó que la producción máxima de ácido láctico utilizando glucosa como fuente de carbono se obtiene a 33,5°C (Akerberg *et al* 1998).

Por otro lado, se ha propuesto que la inhibición del crecimiento por el incremento en la concentración de lactato es consecuencia de limitaciones en el proceso citoplasmático de regulación del pH (Poolman *et al* 1988, Taniguchi *et al* 1994). Durante la fermentación *L. lactis* produce ácido L(+)-láctico que a pH ácido se encuentra en su forma no disociada y es capaz de difundir a través de la membrana celular (Curry *et al* 2003). Una vez en el citoplasma, el ácido láctico se disocia causando una acidificación interna que conduce a la inhibición del crecimiento (Mercade *et al* 2000). Para minimizar la toxicidad del ácido láctico por acumulación se reportaron varias estrategias, como la separación *in situ* por adsorción (Yu *et al* 2002) o el co-cultivo con microorganismos que utilicen lactato como fuente de carbono y energía (Shimizu *et al* 1999).

El pH además puede afectar la producción de bacteriocinas de diferentes maneras. Puede alterar la adsorción y desorción de bacteriocinas a la membrana celular (Pongtharangkul *et al* 2006), las actividades enzimáticas necesarias para las modificaciones postraduccionales y secreción (Ray 1992), y la regulación génica de los genes necesarios para su expresión.

Además de la elevada estabilidad de la nisina a pH ácido, el incremento de nisina libre observado en el caldo de fermentación cuando el pH desciende puede explicarse por la desorción de la nisina de la membrana de las células productoras. El pI de la nisina, estimado por su secuencia primaria, es de 8,8 y una reducción en el pH del medio a valores inferiores a 6,8 incrementa el número de moléculas de nisina cargadas positivamente. Como adicionalmente se reduce la carga negativa de la pared celular, en un ambiente de pH ácido se reduce la interacción electrostática entre la bacteriocina y la bacteria productora (Cabo *et al* 2001, Pongtharangkul *et al* 2006).

Con respecto a la aireación, algunos autores sostienen que los cultivos anaerobios dan mayor rendimiento en producto (Hurst 1981), y otros por el contrario obtienen mejoras con cultivos aireados (Cabo *et al* 2001). En este último caso se encontró una relación directa, entre lineal y exponencial, de la pO_2 (presión parcial de oxígeno) y la producción de nisina hasta un valor límite de 80% de oxígeno, a partir del cual el rendimiento disminuye. Asimismo, otros autores encontraron mejoras en la producción de nisina Z con un aumento en la oxigenación y sugirieron que la producción de bacteriocinas podría estar asociada a una ruta metabólica oxidativa (Amiali *et al* 1998).

Utilización de hierro hemo en el medio de cultivo. El uso de hemina como aditivo en medios de cultivo para el crecimiento de *L. lactis* fue descripto por primera vez en una patente conjunta de Christian Hansen SA y el INRA para la obtención de cultivos *starters* para fabricación de quesos (Duwat *et al* 1999). La adición de esta coenzima permite realizar cultivos aeróbicos de *L. lactis* aumentando el rendimiento en biomasa y la supervivencia. Sin embargo, no se encontraron trabajos sobre el efecto

del agregado de fuentes de hierro hemínico en la viabilidad de un cultivo en períodos extensos de fermentación, ni sobre el efecto de este aditivo en la producción de nisina. La posibilidad de obtener biomasa estable durante largos períodos es un requerimiento para el desarrollo de procesos en continuo, ya sea con células en estado libre o inmovilizado.

Uso de suero de leche para producción de bacteriocinas

Numerosos autores estudiaron la producción de nisina en lácteos y derivados, donde los mejores rendimientos se obtuvieron con leche (13 mg/l) y con suero de queso (8 mg/l) (Huggenholtz *et al* 1991). La producción de bacteriocinas y el rendimiento en biomasa para fermentaciones *batch* en suero de queso fueron menores que las obtenidas con MRS (Guerra *et al* 2001). Otros autores estudiaron la utilización de suero dulce desproteneizado por ultrafiltración como base de un medio de cultivo, el cual soportó el crecimiento y producción de bacteriocina cuando era agregado extracto de levadura (Liao *et al* 1993). La adición a este mismo suero de hidrolizados de caseína mejoraron los rendimientos en biomasa y producto en otro trabajo, sin embargo no fueron superiores a los cultivos desarrollados en medios complejos como el M17 (Liu *et al* 2005).

En este trabajo de tesis se buscó utilizar el suero de ricota como el principal componente de un medio de cultivo que aporte, en forma mayoritaria, la fuente de carbono y energía, parte de los oligo y microelementos y algunas vitaminas. Debido a que este suero posee bajo contenido en proteínas, se estudió la adición de una fuente de nitrógeno alternativa. En base a los posibles extractos a ser utilizados un hidrolizado en base a soja sería una fuente más económica que una basada en hidrolizados de caseína. No existe hasta el momento ninguna publicación científica o patente que utilice este componente para el cultivo de *L. lactis* por lo que es necesario demostrar su factibilidad de uso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos. *L. lactis* sub. *lactis* ATCC 11454 se adquirió en MicroBioLogics. Se utilizaron componentes de medios de cultivo Britania calidad microbiológica. El medio M17 fue marca Biokar. Los reactivos fueron de calidad analítica (Anedra). Las soluciones de suero de ricota y digerido de harina de soja se trataron y esterilizaron como se detalló en el Capítulo 4. Las reconstituciones de los medios de cultivo se realizaron en esterilidad en el momento de uso.

Obtención del inóculo. El inóculo de *L. lactis* para los ensayos de crecimiento se obtuvo según el protocolo en *Materiales y Métodos* Capítulo 3.

Cinéticas de crecimiento. Se inoculó el medio de fermentación con un cultivo saturado de *L. lactis* al 2%v/v. Se incubó a 30 ºC y 100-120 rpm en ensayos de frascos agitados. Se tomaron muestras para determinar biomasa, lactosa y nisina. Las muestras para determinación de nisina se acondicionaron como se explica a continuación. Las cuantificaciones de lactosa y nisina se realizaron según los métodos desarrollados en el Capítulo 4.

Cultivo Batch. Los cultivos *batch* se realizaron en un fermentador de 5 litros New Brunswick BIOFLO III. Para ello se reconstituyó el medio de cultivo en el reactor previamente estéril y se inoculó con un cultivo saturado de *L. lactis* al 2 %v/v. Se monitoreó oxígeno disuelto (%OD), pH, temperatura y agitación. Condiciones de operación: 30 ºC, 100-200 rpm, pH 5,5, caudal de entrada de aire: 1 l/min. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para determinar biomasa, lactosa y nisina.

Tratamiento de las muestras para cuantificación de nisina. Se agregó a una fracción de 1ml de cultivo 20 µl de HCl 4N. Se incubó a 100 ºC por 3 minutos y se centrifugó 5 minutos a 14000g. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -20ºC para su posterior análisis (basado en Guerra *et al* 2001).

Medio CTS con lactosa. Se mezcló una solución concentrada 2x del medio CTS preparado sin glucosa con un volumen apropiado de solución de lactosa para dar una concentración final de 5, 10, 20, 30 o 40 g/l y *Tween®* 80 1 g/l. Se ajustó a volumen final con agua destilada y pH a 7,2-7,3.

Medio con suero de ricota. Se mezcló 1 parte de suero tratado, una parte de solución 2x de peptona de soja y tripteína y *Tween®* 80 1 g/l. Se ajustó el pH a 7,2-7,3.

Medio con suero de ricota y soja. Se mezcló 1, 2 o 3 partes de suero tratado con 1 parte en volumen de hidrolizado de harina de soja y *Tween®* 80 1 g/l.

Medio suplementado con hierro hemínico. A una fracción de medio basado en suero de ricota se agregó hemina, harina de sangre o hemoglobina para dar una concentración final de 5 mg/l. La solución stock de hemina se preparó según Duwat *et al* 2001.

Medio suplementado con oligo- y micronutrientes. A una fracción de medio basado en suero de leche se agregó el volumen apropiado de soluciones de vitaminas, aminoácidos y/o minera-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

les. Solución minerales (100x): $MgSO_4$ 50 g/l, $MnSO_4$ 5 g/l; solución vitaminas (1000x): tiamina 10 g/l, niacina 10 g/l, solución aminoácidos (20x): arginina 1 g/l, glutamina 1 g/l.

Estudios del crecimiento bacteriano en frascos

Existen varias formulaciones de medios de cultivo de laboratorio para el crecimiento de *L. lactis.* En términos generales todos son medios ricos, con glucosa como fuente de carbono y energía y fuentes de aminoácidos y vitaminas. Éstas últimas requieren condiciones de esterilización diferentes a la estándar y su preparación a partir de los componentes individuales es dificultosa. El medio Caldo Tripteína Soja (CTS, composición en Anexo I), es el medio más simple de los reportados para este microorganismo y está basado en proteínas derivadas de leche y soja, por lo que se selecciona en este trabajo como medio de cultivo de referencia para facilitar la adaptación posterior del microorganismo a un medio basado en suero de ricota e hidrolizado de harina de soja.

Cinética de crecimiento de L. lactis en presencia de lactosa. Con el objetivo de evaluar si la cepa seleccionada es capaz de metabolizar la lactosa presente en el suero de ricota, se estudió el crecimiento de *L. lactis* en el medio de referencia con lactosa como única fuente de carbono y energía. La Fig. 5.1 muestra los resultados de la cinética de crecimiento y producción de nisina para las condiciones estudiadas.

El cultivo denominado control consiste en el crecimiento del microorganismo en medio CTS con glucosa como fuente de carbono, según su composición original. Las otras condiciones corresponden a cultivos realizados con un medio CTS modificado, donde la glucosa se reemplaza por lactosa en diferentes concentraciones finales (5-40 g/l). Todos los cultivos mostraron el mismo comportamiento en cuanto a crecimiento, siendo los medios control y lactosa 40 g/l los que llegaron a un valor de DO_{600nm} ligeramente inferior (Fig. 5.1A). Concordante con trabajos de otros autores (Oliveira *et al* 2005) no se encontraron diferencias significativas entre el uso de glucosa y lactosa como fuente de carbono y energía. Los perfiles de pH de los cultivos (Fig. 5.1 B) tam-

bién mostraron un comportamiento similar, donde se observó una acidificación rápida durante las primeras 2 horas de cultivo hasta valores cercanos a las 4,8 unidades. En el

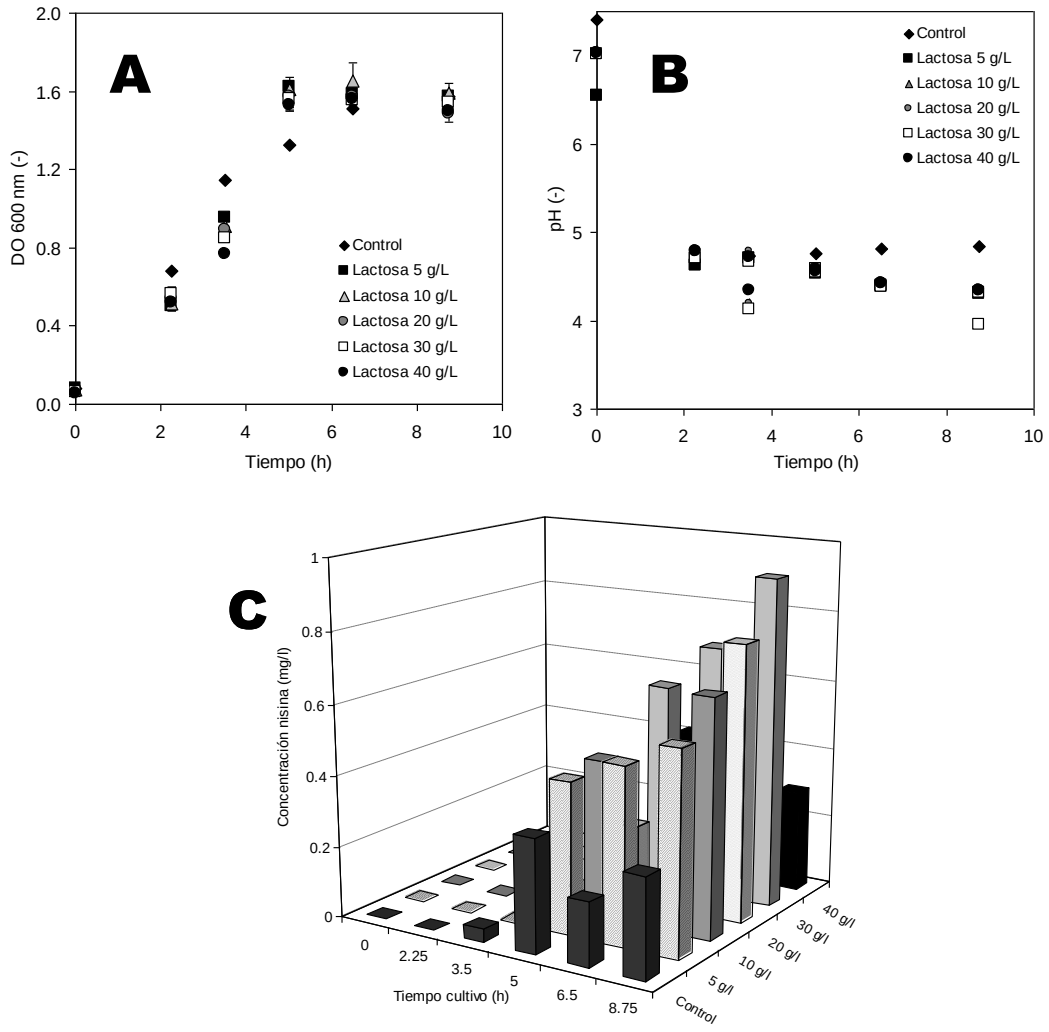


Figura 5.1
Cinéticas de crecimiento (A), evolución del pH (B) y producción de nisina (C) con diferentes concentraciones de lactosa

caso del control el valor de pH se mantuvo invariable hasta el final de la incubación, mientras que los cultivos con lactosa registraron un descenso hasta 4-4,3 unidades.

Con respecto a la producción de nisina se observó un incremento progresivo en la concentración en todos los cultivos, excepto los correspondientes a control y lactosa 40 g/l. Los mejores niveles de producción se obtuvieron para los cultivos con una concentración inicial de 30 g/l de lactosa dando una concentración de nisina de 0.9 mg/l, coincidente con otros autores (Liu *et al* 2005). Como se mencionó en el Capí-

tulo 1, existen reportes de mejoras en la producción de nisina Z en cultivos con lactosa y este efecto estaría relacionado con el rol que posee el disacárido sobre la inducción de la expresión de los genes del operón *nis* (Cheigh *et al* 2005). Adicionalmente, estos ensayos muestran que la producción de nisina es superior en cultivos con concentraciones de lactosa inferiores a la existente en el suero (45-50 g/l), hecho que coincide con resultados de otros autores (Guerra *et al* 2001).

La utilización de lactosa en reemplazo de glucosa en el medio CTS incorporó una presión de selección hacia la maquinaria necesaria para el consumo de este disacárido. La capacidad de incorporar y metabolizar lactosa es una característica que puede perderse con las generaciones, dado que está demostrado ser una característica que, en la mayoría de las BAL, se encuentra codificada en plásmidos (Klaenhammer *et al* 2005). Dado que el crecimiento en lactosa fue satisfactorio, se buscó evaluar la sustitución de la lactosa del medio por suero de ricota.

Crecimiento en suero de ricota. Se ensayó el crecimiento de *L. lactis* en un medio CTS modificado donde se reemplazó la solución de lactosa por suero de ricota hidrolizado (LSH) preparado como se describió en el Capítulo 4. La reconstitución del medio se detalla en *Materiales y Métodos*.

Tabla 5.1

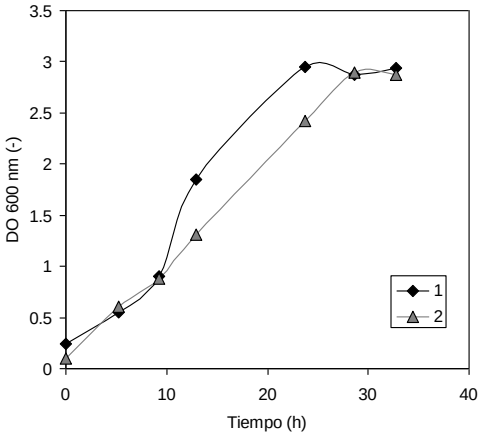
Efecto del suero de ricota sobre el crecimiento de L. lactis. Composición de las soluciones: Lactosa: 50% de vol de una solucion de 5 g/l, LSH: 50 % de vol., Tripteina: 25 % de vol. de una solución de 17 g/l, Peptona de soja: 25% de vol. de una solución de 3 g/l

Cultivo	Lactosa	LSH	Tripteína	Peptona de soja	DO_{600nm}
1	X		X	X	2,3
2		X	X	X	2,2

El crecimiento en suero de ricota fue similar al de lactosa, llegando a un valor de biomasa por DO_{600nm} de aproximadamente 2 unidades (Tabla 5.1). Como no se observaron diferencias significativas se concluyó que es factible reemplazar la lactosa por suero de leche.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Crecimiento en suero de ricota e hidrolizado de soja. Una vez corroborado que es posible utilizar el suero de ricota como fuente de carbono y energía para el crecimiento de *L. lactis*, se estudió el crecimiento y producción de nisina en un medio con el hidrolizado de harina de soja (HHS) preparado por el método optimizado descripto en el Capítulo 4. Para ello se realizaron cultivos en frascos utilizando LSH y HHS



Cultivo	DO $_{600\ nm}$final	Conc. Nisina (mg/l)	Nisina/DO
(1)LSH / HHS	2,94	0,61	0,21
(2) LSH+Tripteína+ Peptona de Soja	2,87	0,60	0,21

Figura 5.2
Crecimiento de L. lactis sub. lactis ATCC 11454 con digerido de harina y peptona de soja

en partes iguales (cultivo 1 Fig. 5.2). Como control (cultivo 2 Fig. 5.2)se utilizó un cultivo compuesto por LSH y peptona de soja y tripteína como fuentes de nitrógeno en concentraciones equivalentes a las presentes en el medio CTS, como se utilizó en el experimento anterior.

En este experimento no se detectaron diferencias significativas en crecimiento y producción de nisina. Los dos cultivos ensayados dieron el mismo valor de productividad por unidad de DO_{600nm}. Analizando el gráfico de la Fig. 5.2, donde se muestra la variación de la biomasa con el tiempo, se encuentran ciertas diferencias. Por ejemplo, el medio más rico en fuente de nitrógeno (cultivo 2) presentó un comportamiento cinético cercano al lineal, mientras que el cultivo compuesto por los dos componentes desarrollados en este trabajo, presentaron un crecimiento con una cinética tipo exponencial. Sin embargo, estas diferencias no se reflejaron en los valores finales de densidad bacteriana y concentración de nisina en el medio de cultivo, que se muestran en

la tabla de la Fig. 5.2. Los resultados de estos experimentos corroboraron la factibilidad del uso de suero de ricota y harina de soja como componentes mayoritarios de un medio de cultivo para *L. lactis*.

Efecto de la hemina en la sobrevida de L. lactis. El uso de hemina por parte del microorganismo ayuda a minimizar los efectos tóxicos derivados de la presencia del oxígeno (Duwat *et al* 2001). Para evaluar su efecto sobre el crecimiento y sobrevida de *L. lactis* se realizaron cultivos basados en LSH y CTS sin fuente de carbono en partes iguales como en los experimentos anteriores. Estos cultivos se ensayaron en dos condiciones por duplicado: estático y agitado. A la condición de cultivo en agitación se le adicionó hemina en concentración final de 5 mg/l (Duwat *et al* 2001), desde una solución concentrada preparada según se detalla en *Materiales y Métodos*.

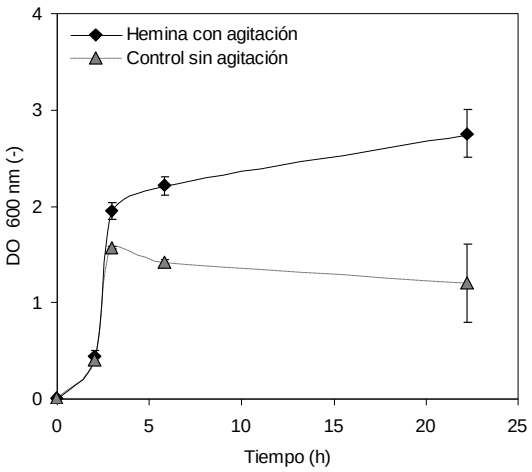


Figura 5.3
Efecto del agregado de hemina en el crecimiento de L. lactis sub. lactis ATCC 11454

En la Fig. 5.3 se muestra la evolución de los cultivos durante las primeras 25 horas de incubación a 30 °C. En las 3 primeras horas de incubación, no se detectan diferencias en las condiciones con y sin agitación; ambos crecieron con una cinética exponencial. A este tiempo, el cultivo sin agitación registró un máximo de 1,6 unidades de $DO_{600nm,}$ mientras que la condición con agitación y hemina registró crecimiento hasta las 2 unidades. A partir de este momento, la condición sin agitación se mantuvo sin variaciones significativas en biomasa hasta el final del experimento. Por el contrario, el cultivo aireado registró un leve aumento en biomasa llegando hasta valores cercanos a las 2,8 unidades de DO_{600nm}. El mayor rendimiento en biomasa en cultivos aireados con agregado de hemina fue concordante con trabajos de otros autores (Duwat *et al* 2001).

Para evaluar la estabilidad de los cultivos en tiempos de operación prolongados, se continuó la incubación hasta 72 horas y se contabilizaron las células viables presentes mediante recuento en placa. En la Fig. 5.4 se muestran placas correspondientes a los cultivos luego de 72 horas de incubación sembradas con un mismo orden de dilución. Las placas superiores de la figura corresponden a cultivos con agitación y hemina, mientras que las inferiores a la condición estática. Como se observa en la figura, los cultivos en condiciones aireadas mantuvieron mayor viabilidad luego de 72 horas de cultivo.

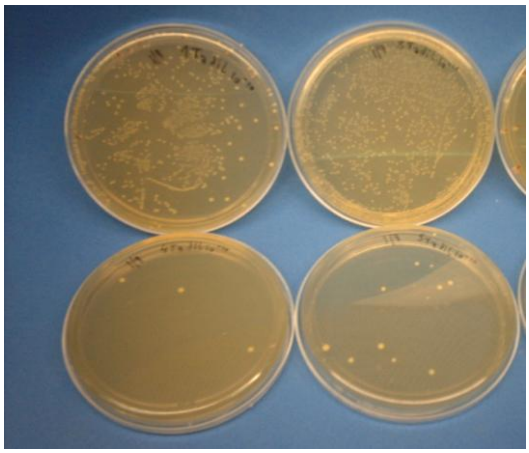


Figura 5.4
Placas de agar de cultivos de medio con hemina y agitación (superior) y condición estándar (inferior) para igual tiempo de incubación y dilución

Fuentes alternativas de hierro hemo. La hemina es un producto que se obtiene por extracción de la hemoglobina bovina, por lo que se estudió la suplementación directa del medio con hemoglobina o sangre bovina completa en polvo como fuentes más económicas de hierro hemínico.

Para ello, se realizaron 3 cultivos con agitación y hemina, harina de sangre o hemoglobina en concentración de 5 mg/l, y un cultivo control en condiciones estáticas. Todos los cultivos se realizaron con medio reconstituido de suero de ricota (LS) e hidrolizado de harina de soja (HHS) en relación 1:1. Las cinéticas de crecimiento se muestran en la Fig. 5.5. Para todos los cultivos ensayados, el agregado de hierro hemínico permitió obtener mayor biomasa final y estabilidad en tiempos de cultivo prolongados. Estos resultados muestran que todas las fuentes de hierro ensayadas fueron efectivas para la suplementación de cultivos en condiciones de aireación.

Con respecto al pH, los cultivos control alcanzaron las 5 unidades mientras que los cultivos con hierro hemínico agregado registraron un pH de 6. Posterior a las 20 horas de cultivo todas las condiciones registraron pH entre 4-4,2 unidades, un valor

reportado como inhibitorio del crecimiento. Con respecto a la producción de nisina, los cultivos con hierro hemínico proveniente de diferentes fuentes rindieron el doble de bacteriocina que los obtenidos en los cultivos control (1,2 y 0,6 mg/l respectivamente).

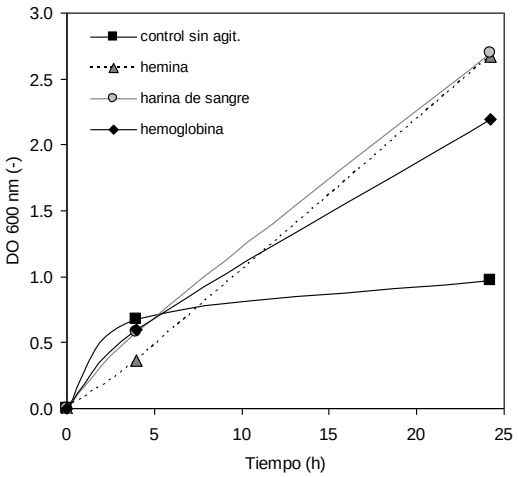


Figura 5.5
Comparación de crecimiento de L. lactis sub. lactis ATCC 11454 con diferentes fuentes de hierro hemo

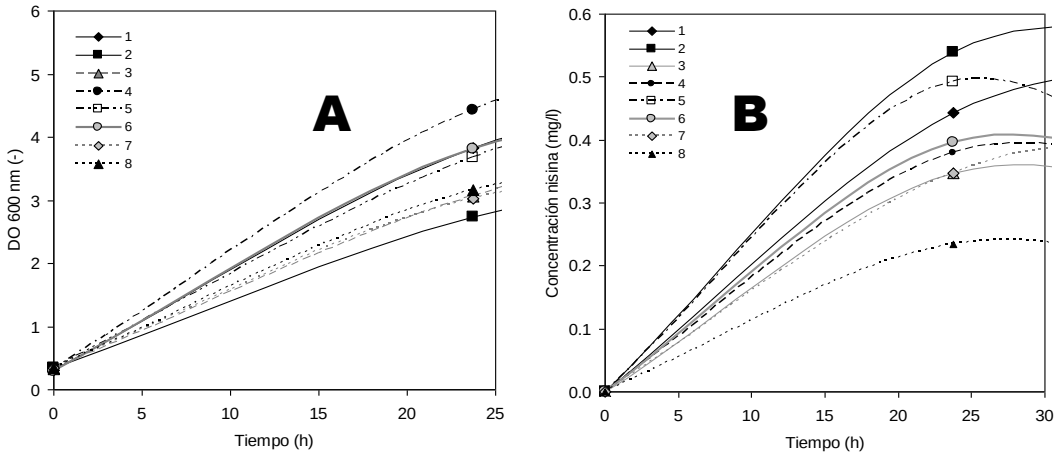
Trabajos de otros autores también mostraron que la adición de hemina reduce la acidificación por disminución en la producción de lactato, sin embargo no observaron efectos diferenciales en la producción de nisina (Nagayasu *et al* 2007). La evidencia de otros trabajos sobre el aumento en la producción de nisina con la aireación (Cabo *et al* 2001) refuerzan los resultados obtenidos en este trabajo.

Suplementación del medio basado en suero de ricota e hidrolizado de soja. Una vez determinada la composición aproximada de los principales componentes del medio de cultivo basado en suero de leche, se estudió el efecto de oligo-, micronutrientes y vitaminas sobre la cinética de crecimiento y producción de nisina. Para ello se realizaron experimentos preliminares evaluando el efecto por grupos: (i) minerales, (ii) vitaminas y (iii) aminoácidos.

Minerales. La adición de magnesio (Mg) y manganeso (Mn) mejoran sustancialmente el crecimiento de *Lactobacillus casei* CRL 705 en concentraciones del orden de 0.05 % para el Mg y 10 veces menores para el Mn (Vignolo *et al* 1995). En base a estos datos se preparó una solución con estos cationes como aditivo mineral.

Vitaminas. En base a un estudio *in silico* de las formulaciones de medios complejos con diferentes extractos (Anexo I) se puede deducir que el aporte de éstos podría ser debido a vitaminas del complejo B, en especial la tiamina (B1) y niacina (B3), por lo que se seleccionaron para evaluar su efecto en el cultivo y producción.

Aminoácidos. Numerosos medios de cultivo definidos basados en las características metabólicas de *L. lactis* contienen desde 6 a 8 aminoácidos como fuente de nitrógeno. Como se detalló en la introducción, este microorganismo es incapaz de sintetizar arginina, metionina, glutamato (o glutamina), leucina, isoleucina, valina, histidina y aspartato (o asparragina) (Oliveira *et al* 2005). Por otro lado comparando con la composición en aminoácidos de la harina de soja utilizada (ver Anexo II) se puede considerar que los aminoácidos valina, metionina, isoleucina y leucina son aportados



C

Cultivo	Condición	DO600 nm	Nisina (mg/l)	Nisina/DO
1	min+vit+aa	3,83	0,4	0,1
2	min + vit	2,74	0,5	0,2
3	min +aa	3,06	0,3	0,1
4	vit + aa	4,43	0,4	0,1
5	vit	3,68	0,5	0,1
6	aa	3,82	0,4	0,1
7	min	3,03	0,3	0,1
8	control	3,16	0,2	0,1

Min: Mg, Mn; vit: tiamina, niacina; aa: arginina, glutamina

Figura 5.6
Efecto del agregado de micronutrientes sobre el crecimiento de L. lactis sub. lactis ATCC 11454: (A) evolución de la biomasa, (B) producción de nisina, (C) productividad

por esta fuente. En consecuencia se estudió el efecto de la adición de dos aminoácidos ausentes en el hidrolizado de soja: arginina y glutamina.

Se realizaron ensayos de crecimiento y producción de nisina con cultivos que poseen diferentes combinaciones de estos grupos de suplementos. Todos los cultivos se

realizaron con agitación suave y 5 mg/l de hemina. La Fig. 5.6 muestra los perfiles de crecimiento y producción de nisina.

Del estudio de estas tres variables que incluyen diferentes micronutrientes se puede observar un efecto positivo de los aminoácidos y las vitaminas sobre el crecimiento. La combinación de estos dos nutrientes tuvo un efecto sinérgico sobre el crecimiento. Sin embargo, no se observó que provoquen un efecto estimulatorio significativo en la productividad de nisina.

Trabajos que estudian el rol de los aminoácidos en la síntesis de nisina concuerdan con los resultados obtenidos en este experimento. En primer lugar, la suplementación con aminoácidos puros da como resultado menores rendimientos en biomasa y bacteriocina a los obtenidos con fuentes de nitrógeno complejas (Vazquez *et al* 2001). La adición de aminoácidos por grupos revela que no poseen un rol individual en la inducción de la síntesis de nisina. Por último, algunos autores encuentran efectos depresores de la síntesis de bacteriocina con el agregado de prolina y estimulantes con la suplementación de cisteína y triptofano (Vazquez *et al* 2004). Éstos aminoácidos están presentes en la harina de soja (ver Anexo II), por lo que pueden ser aportados por el hidrolizado.

Ensayo de adaptación en medios complejos. Con el propósito de evaluar el comportamiento de la cepa en estudio en los medios de laboratorio más extensamente utilizados, se realizó un experimento de crecimiento en MRS, M17 y CTS como con-

Tabla 5.2
Crecimiento y producción de L. lactis en medios complejos

	CTS			MRS			M17		
Repique	DO_{600nm}	Nisina (mg/l)	Productividad (mg nisina/DO)	DO_{600nm}	Nisina (mg/l)	Productividad (mg nisina/DO)	DO_{600nm}	Nisina (mg/l)	Productividad (mg nisina/DO)
1	2,3	1,3 ± 0,3	0,6	2,0	1,2 ± 0,1	0,6	3,5	1,0 ± 0,1	0,3
2	2,4	4,4 ± 0,5	1,8	1,6	0,7 ± 0,2	0,4	3,4	1,2 ± 0,15	0,3
3	2,3	3,3 ± 0,1	1,4	1,8	1,0 ± 0,05	0,5	3,7	0,9 ± 0,1	0,3
4	2,0	2,2 ± 0,05	1,1	1,6	0,9 ± 0,3	0,6	3,5	1,2 ± 0,1	0,3

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

trol. Para ello se evaluaron 4 repiques sucesivos en los medios complejos de laboratorio con agitación suave y adición de hemina. El ensayo de repiques secuenciales se realizó para evaluar la estabilidad de los cultivos de *L. lactis* dado que los experimentos informados en apartados previos muestran niveles bajos en producción de nisina en todas las condiciones estudiadas. Por lo tanto se buscó evaluar si es conveniente incorporar experimentalmente una etapa de acondicionamiento de los cultivos. Los resultados de biomasa y producción de nisina a tiempo final de cultivo se muestran en la Tabla 5.2.

El medio de cultivo M17 permite mayor nivel de crecimiento seguido por CTS y MRS. Esta diferencia en el patrón de crecimiento podría ser el producto de la diferente capacidad *buffer* de estos medios para amortiguar el aumento en la acidez producto de la generación de ácidos orgánicos durante el crecimiento. El pH final de los cultivos en CTS y MRS registran valores en el rango de 4,6-5,0, mientras que el medio M17 muestra mejor capacidad tampón dando valores finales mayores a 5,3. Con respecto a la capacidad de producción, los cultivos en MRS y M17 dan niveles comparables de concentración de nisina, siendo los cultivos realizados en CTS los que dan mayor título de bacteriocina, aunque los resultados entre repiques presentan cierta dispersión. Si se compara entre los repiques de este medio se observa que la producción de bacteriocina fue significativamente mayor en el segundo y tercer repique.

Crecimiento y producción en suero de ricota con distinto tratamiento. Este ensayo se realizó con el fin de evaluar el efecto de las variaciones en el suero de ricota y adicionalmente estudiar el efecto de un tratamiento de hidrólisis de lactosa en el suero. Para ello se realizaron repiques en medios basados en suero de ricota y digerido de harina de soja en iguales proporciones, con agitación y agregado de hemina. Como inóculo se utilizó un cultivo proveniente de dos repiques previos en medio CTS. La Tabla 5.3 muestra los resultados de crecimiento y producción de la cepa en estudio para los medios generados con dos sueros de ricota de distinto origen tratados según protocolo optimizado (LSH A y LSH B) y un tercero que se somete adicionalmente a un

pretratamiento con lactasa comercial (LSHGlu B) con el fin de analizar el efecto de la fuente de carbono, lactosa o glucosa, sobre el crecimiento y la producción.

El crecimiento de la cepa fue comparable en los medios ensayados, a pesar de que el medio CTS posee menor concentración de fuente de carbono y energía.

Tabla 5.3
Crecimiento y producción de L. lactis en diferentes sueros de ricota

	CTS	LSH B	LSHGlu B	LSH A
DO_{600nm}	2,1	2,4	2,5	2,4
Nisina máx. (mg/l)	6 ± 1	9,4 ± 0,5	11 ± 3	8,9±0,7
Tiempo de cultivo (h)	8,5	8,5	8,5	9,8
Productividad (mg nisina/DO_{600nm})	3,0	3,9	4,5	3,7
mg nisina/l suero		14,1	17,0	13,3

Con respecto a la producción de nisina se observó que los medios desarrollados en este trabajo producen una concentración de nisina significativamente mayor que en medio CTS. Los niveles de producción de nisina fueron comparables para los medios en estudio, por lo tanto las variaciones en las partidas de suero de ricota no afectaron el comportamiento del microorganismo en cultivo. Además, se observó que la hidrólisis de la lactosa presente en el suero aumentó la productividad, aunque no significativamente.

Tabla 5.4
Acostumbramiento al crecimiento y producción en lactosa

Nº Repique	DO_{600nm}	Nisina (mg/l)	Nisina/DO
1	2,25	6,2 ± 0,4	2,7
2	1,91	5,4 ± 0,3	2,8
3	1,52	7,5 ± 0,4	4,9
4	1,89	6,6 ± 0,6	3,5
5	1,91	8,0 ± 0,3	4,2
6	1,96	7,0	3,6
7	1,81	6,3	3,5
8	1,97	6,9 ± 0,25	3,5
9	1,84	8,7	4,7
10	1,97	8,7	4,4

Experimento de acostumbramiento a lactosa. De la comparación de las Tablas 5.2 y 5.3 se observa que la utilización de un inóculo proveniente de repiques en medio complejo como adaptación no resulta en una mejora en el crecimiento pero si

en una diferencia sustancial en la producción de nisina. Para corroborar estas observaciones se realizó un experimento de repiques sucesivos en medio CTS suplementado con lactosa como fuente de carbono y energía (CTS-lactosa). Los resultados de crecimiento y producción de nisina se muestran en la Tabla 5.4.

El crecimiento de los cultivos fue comparable en todos los repiques, resultado que coincide con los experimentos anteriores. Por otro lado, los niveles de nisina producida presentaron, aunque con cierta variabilidad, una tendencia a aumentar levemente. La producción fue mayor a la obtenida en los primeros experimentos de este capítulo, por lo tanto se decidió realizar adaptaciones en medios con lactosa y/o suero de ricota antes de iniciar la fermentación *batch*, buscando condiciones que permitan mejorar la reproducibilidad de los experimentos.

Tabla 5.5
Acostumbramiento al crecimiento y producción en suero de ricota

	CTS-lactosa			Suero		
Nº repique	DO_{600nm}	Nisina (mg/l)	Productividad (mg nis/DO)	DO_{600nm}	Nisina (mg/l)	Productividad (mg nis/DO)
1	1,7	5,5	3,2	1,8	4,0	2,2
2	2,0	5,5	2,7	1,9	4,5	2,3
3	1,9	6,1	3,3	1,8	5,5	3,1
4	1,9	5,5	2,9	2,0	6,5	3,3
5	1,7	6,7	3,9	2,7	6,9	2,6
6	2,1	8,8	3,7	2,0	6,2	3,1

Adaptación a medios basados en suero de ricota. Se realizaron repiques sucesivos en medio de cultivo basado en suero de ricota (LSH) para evaluar la adaptación que podría ser necesaria para los cultivos en fermentador. Las incubaciones se realizaron con agitación suave y agregado de hemina.

En estos ensayos se observó una tendencia a mejorar el nivel de producción de nisina con los repiques en medios basados en suero de ricota (Tabla 5.5). Con respecto al crecimiento se observó cierta variabilidad con una tendencia a estabilizarse en un valor cercano a las 2 unidades. Esta variabilidad podría deberse a que los sub-

cultivos en los dos últimos experimentos se realizaron con incubaciones de 10 a 12 horas, mientras que los experimentos anteriores se realizaron con incubaciones más prolongadas, de aproximadamente 18 horas. De estas diferencias podría inferirse que, al menos en cultivos en frascos agitados, es necesario un tiempo de incubación más prolongado para obtener condiciones estables para la cepa en estudio.

Fermentaciones en batch

Con la obtención de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *L. lactis*, se realizaron cultivos en *batch* de *L. lactis* con aireación para ajustar la composición del medio diseñado y evaluar otros parámetros operacionales que no pueden estudiarse en cultivos en frascos agitados. Para ello se utilizó un fermentador de 5 litros New Brunswick BioFlo III (Fig. 5.7). En estos procesos, a diferencia de los experimentos realizados en frascos de cultivo, se puede monitorear y controlar diferentes variables del cultivo como pH, consumo de oxígeno, agitación y temperatura.

En este trabajo se buscó que el suero de leche fuera el componente mayoritario del medio de cultivo que aporte la fuente de carbono y energía, parte de los oligo y microelementos, algunas vitaminas y aprovechar el agua. El resto de los componentes los complementa un extracto en base a harina de soja preparado según se detalló en el Capítulo 4. La proporción correcta de los dos componentes se puede visualizar a través de la determinación de la velocidad de crecimiento; cuanto más equilibrado sea el medio mayor será su velocidad específica de crecimiento (μ) y mayor la productividad de bacteriocina. En condiciones óptimas el microorganismo crecerá exponencialmente hasta que se agote algún nutriente esencial o por acumulación de ácidos orgánicos y registro de pH crítico. En el Anexo II se presentan las composiciones de las materias primas y en el Anexo III un

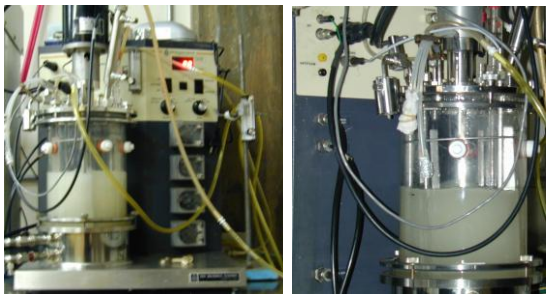


Figura 5.7
Fermentador New Brunswick Bioflo III de 5 L de capacidad

estudio *in silico* de las composiciones de los medios de cultivo utilizados relativas al CTS.

La acidificación del caldo de fermentación durante el crecimiento incrementa la actividad de nisina hasta que registra un valor inhibitorio, como se observa en los ensayos de crecimiento en frascos agitados y en trabajos de otros autores, tal como se mencionó en la Introducción del capítulo.

Usualmente, el pH óptimo para producción de bacteriocinas no coincide con el de crecimiento y producción de ácido láctico. El pH óptimo para producción de nisina se encuentra entre 5,5 y 6, mientras que el pH de crecimiento es ligeramente mayor (6-6,8) mostrando diferentes condiciones de producción y crecimiento (Parente *et al* 1994, 1999). Por lo tanto, en este trabajo los cultivos en modo *batch* se realizaron a

Tabla 5.6
Condiciones de cultivos ensayados en fermentador

	Ensayo	Relación suero/digerido soja	Número de experimentos	Agitación	Hemina	Suero	Tratamiento suero	Harina de soja	Tratamiento harina de soja
Diferente relación de suero y proteínas de soja									
1	LSH/HHS 2:1	2_1	3	SI	SI	Ricota	Optimizado	Si	Optimizado
2	LSH/HHS 1:1	1_1	1	SI	SI	Ricota	Optimizado	Si	Optimizado
3	LSH/HHS 3:1	3_1	1	SI	SI	Ricota	Optimizado	Si	Optimizado
4	LSH	-	1	SI	SI	Ricota	Optimizado	No	-
Efecto del tratamiento de los componentes del medio de cultivo									
5	LSG/HHS 1:1	1_1	1	SI	SI	Ricota	Estándar	Si	Optimizado
6	LSG/HSR 1:1	1_1	2	SI	SI	Ricota	Estándar	Si	Estándar
7*	LSG/HSR 1:1	1_1	1	SI	SI	Ricota	Estándar	Si	Estándar
8	LS/HS 2:1	2_1	1	SI	SI	Ricota	No	Si	No
9	LSH/HS 2:1	2_1	1	SI	SI	Ricota	Optimizado	Si	No
10	LS/HHS 2:1	2_1	1	SI	SI	Ricota	No	Si	Optimizado
Efecto del tipo de suero									
11	LSDH/HHS 1:1	1_1	2	SI	SI	Dulce	Optimizado	Si	Optimizado
12	LSDH/HHS 3:1	3_1	1	SI	SI	Dulce	Optimizado	Si	Optimizado
13	LSDH	-	1	SI	SI	Dulce	Optimizado	No	-
Cultivos en medios de referencia									
14	M17	-	1	SI	SI	Ricota	Optimizado	-	-
15	LSH/CTS 1:1	1_1	1	SI	SI	Ricota	Optimizado	No	-

* sin repiques previos

pH controlado en 5,5 por el agregado de una base fuerte.

Adicionalmente, los cultivos en fermentador se llevaron a cabo con aireación constante y agregado de hemina, para obtener mayores densidades celulares y

estabilidad. Además, como se explicará en el capítulo 6, la capacidad de desarrollar cultivos aireados permitirá diseñar un método de recuperación contínuo de la bacteriocina desde el medio de cultivo durante la fermentación.

Durante los cultivos se monitoreó la temperatura y el oxígeno disuelto *on line*, mientras que la base agregada, biomasa y concentración de nisina en el medio se realizaron *off line*, como se describió anteriormente. Se realizaron 19 fermentaciones *batch* y con los datos obtenidos se elaboraron los perfiles para cada condición de ensayo.

Tabla 5.7
Resultados generales de las condiciones de fermentación ensayadas

	Ensayo	Producción máxima nisina (mg/l suero)	Concentración final nisina en reactor (mg/l medio)	DO 600 final	Tiempo cultivo (h)	Consumo lactosa (%)
Diferente relación de Suero y proteínas de soja						
1#	LSH/HHS 2:1	15,0 ± 0,4	10,1 ± 0,33	6,9 ± 0,9	13 ± 2	84 ± 5
2	LSH/HHS 1:1	14,6 ± 0,8	7,3 ± 0,4	9,0	14,0	98 ± 1
3	LSH/HHS 3:1	1,0 ± 1	0,8 ± 0,1	7,9	8,7	40 ± 10
4	LSH	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0	12,0	45 ± 2
Efecto del tratamiento de los componentes del medio de cultivo						
5	LSG/HSS 1:1	13,0 ± 3,0	7,0 ± 2,0	9	14	99 ± 1
6#	LSG/HSR 1:1	6,2 ± 0,2	3,1 ± 0,1	4,4 ± 0,6	16,0	-
7	LSG/HSR 1:1	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	6,4	18,0	71 ± 4
8	LS/HS 2:1	3,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2	1,4	6,8	57 ± 10
9	LSH/HS 2:1	7,4 ± 0,3	5,0 ± 0,2	4,7	10,0	59 ± 5
10	LS/HHS 2:1	14,6	9,9	6,8	9,0	66 ± 6
Efecto del tipo de suero						
11#	LSDH/HHS 1:1	12,2 ± 1,5	5,4 ± 1	7,8 ± 0,1	10,4 ± 0,6	98 ± 1
12	LSDH/HHS 3:1	6,7 ± 0,5	5,0 ± 0,4	10,8	12,3	76 ± 4
13	LSDH	3,4 ± 0,8	3,4 ± 0,8	11,2	13,4	75 ± 3
Cultivos en medios de referencia						
14	M17	-	3,1	8,7	7,5	100 ± 1
15	LSH/CTS 1:1	7,6	3,8	3,8	12,0	98 ± 1

valores promedio

Se estudiaron diferentes condiciones de crecimiento y producción, las cuales se detallan en la Tabla 5.6. En los ensayos de efecto de los tratamientos en los

componentes del medio de cultivo, se estudió el efecto de los tratamientos reportados en literatura y los optimizados en este trabajo para el acondicionamiento del suero de ricota y la harina de soja. Adicionalmente, se realizaron cultivos con diferentes proporciones de suero de ricota e hidrolizado de harina de soja con el fin de determinar la composición más apropiada para el proceso en estudio. Teniendo en cuenta que las materias primas utilizadas pueden presentar importantes variaciones en cuanto a calidad nutricional se estudió el crecimiento y producción utilizando dos tipos de suero de ricota, y suero dulce de quesería.

Los resultados generales se muestran en la Tabla 5.7 y los perfiles completos de fermentación se presentan en el Anexo IV. A continuación se realizará un análisis detallado de los resultados.

Efecto del tratamiento del suero sobre la fermentación. La Fig. 5.8 muestra la producción de nisina y la biomasa final de dos procesos de fermentación con medio basados en suero. El denominado LSH se refiere al suero obtenido por el protocolo enzimático optimizado diseñado en el Capítulo 4. La otra condición, LSG, corresponde al suero tratado según Guerra 2001 y detallado en el Capítulo 4. En estos cultivos el medio de fermentación se reconstituyó con partes iguales de suero e hidrolizado de soja y los resultados corresponden a los cultivos 2 y 5 de la Tabla 5.7.

Los resultados indican que el tratamiento enzimático incorporado para digerir

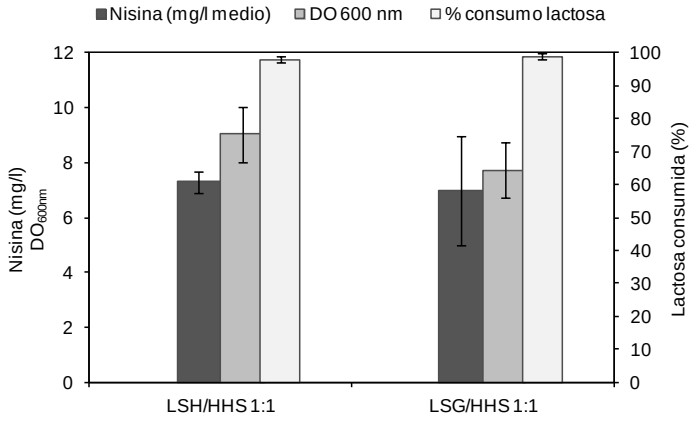


Figura 5.8
Efecto del tratamiento del suero sobre el crecimiento y producción de L. lactis sub. lactis ATCC 11454

y solubilizar las proteínas remanentes del suero permite obtener mayores valores en biomasa final. Una explicación es que al someterse a menos tratamientos térmicos, el suero retiene componentes lábiles importantes desde el punto de vista nutricional para el crecimiento de *L. lactis*. La digestión enzimática permite convertir al menos una parte de las proteínas del suero en péptidos solubles que no precipitan en el paso de esterilización.

Por otro lado, los niveles de producción de nisina fueron similares para las dos condiciones estudiadas, mostrando que el tratamiento optimizado del suero mejora la generación de biomasa y no afecta significativamente la síntesis de bacteriocina. Por

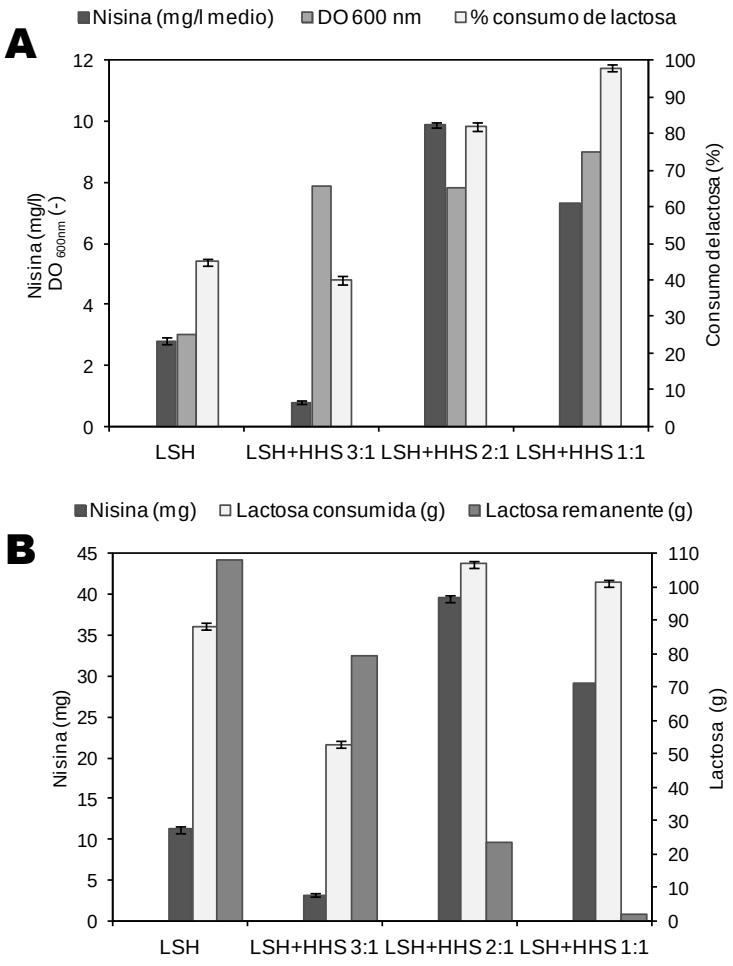


Figura 5.9
Efecto de la proporción de suero en el medio de fermentación de L. lactis sub. lactis ATCC 11454

último se observa que la lactosa se consumió completamente en ambos cultivos.

Efecto de la proporción de suero. Utilizando el lactosuero tratado por el protocolo optimizado en este trabajo (LSH), se compararon diferentes proporciones de éste en la formulación final del medio de crecimiento. El aumento en la proporción de HHS, desde LSH a LSH/HHS 1:1, dió como resultado un aumento en la concentración de nisina en el medio de cultivo con un máximo para la relación 2:1 (Fig. 5.9A y B). El consumo de lactosa resultó ligeramente menor para esta condición registrando un 20% de lactosa remanente (Fig. 5.9B). Si se calcula la concentración de nisina por litro de suero utilizado se obtiene que en ambos casos se produce la misma cantidad relativa (ver Tabla 5.7 fermentaciones 1 y 2). Sin embargo, en el cultivo con relación (2:1) se utilizó mayor cantidad de suero y, en consecuencia menor cantidad de digerido de harina de soja por unidad de cultivo y agua, derivando en mayor cantidad total de nisina producida por fermentación. Cuando se utilizó una mayor proporción de suero en el medio de fermentación (3:1), se obtuvieron menores niveles de nisina, resultado consistente con una composición desbalanceada que carece de suficiente fuente de nitrógeno. El crecimiento en esta condición fue similar a las proporciones (2:1) y (1:1) pero se observó un marcado descenso en la producción de nisina. La fermentación con suero como único componente del medio de cultivo dio bajos rendimientos tanto en biomasa como en concentración de nisina producida y muestran la importancia del agregado de proteínas de soja para suplementar el medio de cultivo. Trabajos de otros autores utilizando suero desproteneizado por ultrafiltración muestran también que el suero diluído promueve mayor crecimiento y producción de bacteriocinas, y proponen que podría reflejar un efecto de inhibición por sustrato (Guerra *et al* 2001).

Efecto del tratamiento del hidrolizado de soja. Utilizando la mejor proporción de suero y digerido de soja (2:1) se estudió a continuación el efecto de los tratamientos de digestión de los dos componentes en cultivos en fermentador (Fig. 5.10). El tratamiento enzimático de los componentes del medio de cultivo fueron determinantes para el rendimiento del proceso. Cuando se utilizó LSH el rendimiento en

biomasa incrementó más de 3 veces con niveles de consumo de lactosa comparables. Este resultado corrobora los descriptos anteriormente y muestran la importancia de los nutrientes presentes en el suero que pueden conservarse para su utilización cuando se aplica el tratamiento optimizado en este trabajo. Por otro lado, cuando el medio de crecimiento se suplementó con HSS se observó un incremento de 2,6 veces en la producción de nisina y cerca de 5 veces en biomasa. Como se observó en la comparación anterior, la mejora en los niveles de producción fue acompañada por un incremento en el consumo de lactosa, pero en niveles poco significativos. Se observó un marcado efecto sinérgico en los rendimientos para cultivos

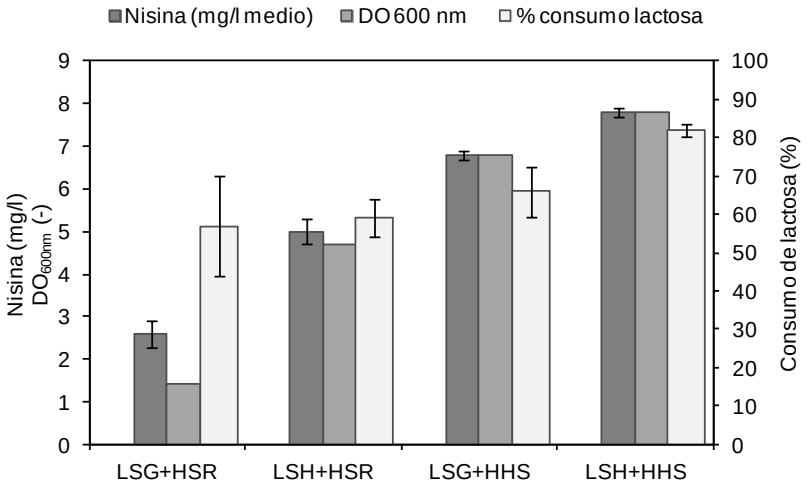


Figura 5.10
Efecto del tratamiento de los componentes del medio de fermentación de L. lactis sub. lactis ATCC 11454

con ambos componentes tratados mediante protocolos optimizados (LSH/HHS). Comparado con LSG/HSR, los cultivos realizados con LSH/HHS mostraron cerca de 4 veces más concentración de nisina, mientras que la biomasa se quintuplicó en estas condiciones. Estos resultados indican que el proceso de digestión enzimática de la harina de soja (HHS) permitió la disponibilidad de sustancias importantes para el desarrollo de *L. lactis,* como aminoácidos esenciales y vitaminas. La composición estimada del digerido de harina de soja se detalla en el Anexo II. Como es de esperarse, cuando se utilizaron los dos componentes sin tratamiento previo de digestión como medio de cultivo resultó en un proceso con muy bajos rendimientos.

Por último, la siguiente comparación corrobora los resultados obtenidos previamente. La Fig. 5.11 muestra dos perfiles de fermentación; el A corresponde a la fermentación en suero y digerido de harina de soja obtenidos por los tratamientos reportados en bibliografía (LSG y HSR, basados en los trabajos de Guerra y Rao respectivamente) y el B representa el perfil de crecimiento y producción utilizando los componentes tratados por los protocolos optimizados en este trabajo y descriptos en el Capítulo 4 (LSH y HHS). Ambos cultivos se realizaron con medios preparados en la misma proporción de suero y digerido de soja (2:1).

Los tratamientos enzimáticos de ambos componentes mejoraron notablemente la biomasa y producción de nisina. El hidrolizado enzimático de soja con menor

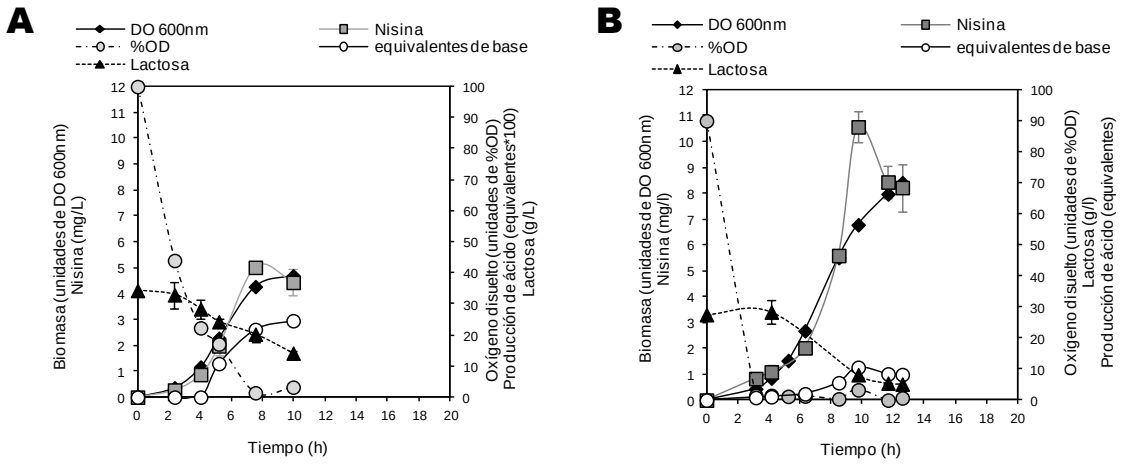


Figura 5.11
Efecto del tratamiento de los componentes del medio. A: LSG/HSR 2:1, B:LSH/HHS 2:1

procesamiento (protocolo optimizado) permitió mayor rendimiento en biomasa. La producción de nisina aumentó dramáticamente (en un factor de 2) por el cambio en el tratamiento de los componentes del medio.

Efecto del tipo de suero. El suero utilizado en este trabajo proviene de la fabricación de ricota, por lo que se espera posea una elevada concentración de sales y baja concentración de proteínas. La composición de este suero se detalla en el Anexo II. Para evaluar la incidencia de la calidad del suero en los rendimientos y optimizar la formulación del medio de cultivo se compararon fermentaciones con dos

tipos de suero: suero de ricota (LS) y suero dulce (LSD)(Fig. 5.12). Estos resultados corresponden a las fermentaciones 1-3 y 10-12 de la Tabla 5.7. Cabe destacar que el procesamiento del suero dulce presentó ciertos inconvenientes experimentales debido a la presencia de grasas.

Cuando se utilizó suero dulce hidrolizado como único componente (LSDH) se

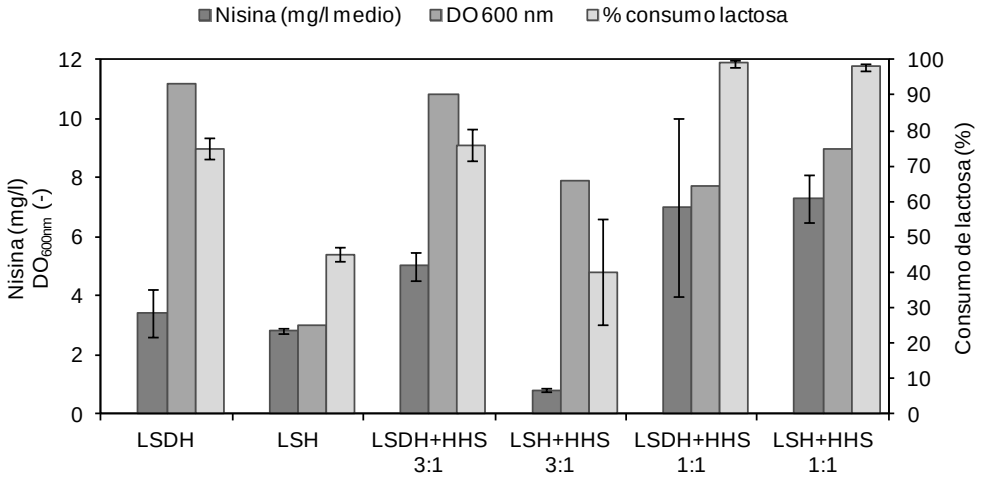


Figura 5.12
Efecto del tipo de suero en el medio de fermentación de L. lactis sub. lactis ATCC 11454

obtuvieron buenos rendimientos en biomasa y en consumo de lactosa pero concentraciones muy bajas de nisina. En proporciones con un 25 % de HHS (3:1) se observó una mejora en la producción de nisina sin modificación de las otras dos variables. Igualmente los rendimientos obtenidos con suero dulce son mayores para el caso de la proporción (3:1). Estas diferencias en los rendimientos en nisina con ambos tipos de suero reflejaron las diferentes calidades nutricionales de las materias primas utilizadas. Por otro lado, la fermentación utilizando suero dulce (LSDH) presentó un patrón similar al suero de ricota (LSH) para proporciones (1:1), siendo en ambos casos los que permitieron mayor producción de nisina.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que el suero de ricota (LSH), de menor calidad nutricional que el suero dulce utilizado en otros trabajos, puede ser utilizado como componente mayoritario de un medio de cultivo para *L. lactis*, complementado con el hidrolizado de harina de soja (HHS).

Análisis general de los cultivos batch. Como se explicó anteriormente, los

Tabla 5.8
Resultados de las principales composiciones de medio ensayadas

	Producción máxima de nisina (mg/l)	*DO_{600} final*	*Velocidad específica máxima de crecimiento (μ) (h^{-1})*	*Lactosa consumida (g/l)*	*$Y_{X/S}$*	*$Y_{P/S}$*
M17	3,13 +/- 0,02	8,7	0,1	25	0,35	0,125
LSG /HS 2:1	5,1 +/- 0,2	4,7	0,2	20	0,24	0,25
LSG /HS 1:1	0,45 +/- 0,06	6,4	0,2	19	0,34	0,05
LSH /HHS 3:1	0,76 +/- 0,03	7,9	0,2	13	0,61	0,08
LSH /HHS 2:1	10,6 +/- 0,6	6,8	0,2	23	0,30	0,46
LSH /HHS 1:1	7,3 +/- 0,4	9,0	0,3	25	0,36	0,29

cultivos *batch* ensayados en fermentador se realizaron con agitación suave y adición de hemina. El efecto de la agitación se observó en primer lugar en la biomasa generada, obteniendose valores entre 4,5 y 9 unidades para todas las condiciones. Estos valores fueron superiores a los obtenidos en los ensayos estáticos en frascos (Fig. 5.1-3) y los reportados por otros autores para cultivos *batch* estáticos con medios

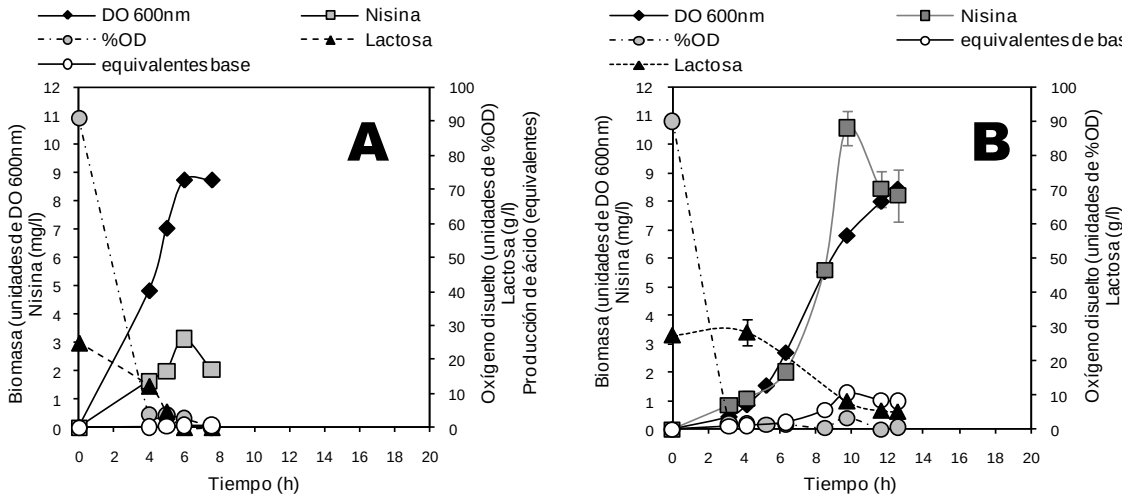


Figura 5.13
Perfiles de fermentación de L. lactis. A: medio M17; B: LSH/HHS 2:1

basados en suero desproteneizado, donde se obtuvieron densidades de biomasa de hasta 2 unidades de DO para la mejor condición ensayada (Liu *et al* 2005).

A partir de los datos de las curvas de crecimiento en fase exponencial se puede calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) las que se expresan en la Tabla 5.8 para las principales condiciones estudiadas. La μ fue menor para el caso de un medio de laboratorio como el M17 comparado con las obtenidas con cultivos realizados en medios basados en suero de ricota. La condición de partes iguales de suero de ricota y digerido de harina de soja (LSH/HHS 1:1) fue la de mayor tasa de crecimiento, siendo tres veces más alta que en el caso del M17. Los valores obtenidos coinciden con los informados por otros autores. Por ejemplo, se obtuvieron μ entre 0,23 y 0,3 h^{-1} para ensayos con medios definidos suplementados con aminoácidos puros (van Niel *et al* 1999). Estos resultados corroboran que los medios diseñados en este trabajo son comparables nutricionalmente con formulaciones complejas de laboratorio sensiblemente más costosas.

Para todas las proporciones ensayadas, los medios con los suero de ricota (LSH) y digerido de harina de soja (HHS) con tratamientos optimizados, dieron mayores rendimientos en biomasa y producto. El consumo de fuente de carbono fue prácticamente total (entre el 80 y el 98%) para los experimentos realizados con tratamientos optimizados. Estudios realizados por otros investigadores utilizando suero dulce reportaron consumos de entre el 50 y el 70 % de la lactosa presente (Liu *et al* 2005). Por lo tanto, los tratamientos optimizados para los componentes del medio de cultivo diseñado en este trabajo permitieron un mejor aprovechamiento de la fuente de carbono y energía.

En la Tabla 5.8 también se muestran los valores de rendimientos globales ($Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$) para las principales condiciones estudiadas. Los rendimientos en biomasa ($Y_{x/s}$) fueron en general comparables al obtenido con M17, salvo en el caso de LSH/HHS 3:1. En este caso, la presencia de mayor proporción de suero de ricota produce que el microorganismo genere mayor biomasa a costas de la producción de nisina,

probablemente por falta de nutrientes suplementados por el digerido de harina de soja.

Los rendimientos globales en producto ($Y_{P/S}$) para los cultivos con los medios desarrollados en este trabajo fueron superiores a los obtenidos con M17, obteniéndose valores 2 y 4 veces mayores a los de referencia.

Una comparación con un cultivo *batch* en un medio complejo de laboratorio muestra el comportamiento de los medios diseñados. El cultivo *batch* en medio M17 (cultivo 14 Tabla 5.7) con lactosa en concentración de 25 g/l como fuente de carbono y energía desarrolló valores de biomasa y concentración de nisina de cerca de 9 unidades y 3 mg/l respectivamente (Fig. 5.13A). Para el cultivo LSH/HHS 2:1 (Fig. 5.13B) se obtuvieron valores de biomasa ligeramente menores (6,8 unidades) pero los niveles de producción de nisina fueron muy superiores a los obtenidos con M17 (10,6 mg/l). El uso del medio de cultivo diseñado en este trabajo permitió obtener 3,5 veces mas bacteriocina que utilizando un medio de laboratorio de referencia, corroborado por un aumento significativo en el rendimiento global ($Y_{P/S}$) de nisina. Por otro lado, con el cultivo batch realizado con partes iguales de suero e hidrolizado de soja obtenidos por los protocolos optimizados (LSH/HHS 1:1, cultivo 2 Tabla 5.8) se obtuvieron valores superiores de biomasa (9 unidades) y 7,3 mg/l de nisina.

En todos los cultivos ensayados la nisina se sintetizó durante la fase de crecimiento activo y la concentración máxima coincidió con el máximo nivel de biomasa, mostrándose como un metabolito primario. Este comportamiento coincide con lo observado en otros trabajos (de Vuyst *et al* 1992, Guerra *et al* 2001). La condición óptima de producción de nisina (LSH/HHS 2:1) fue diferente a la que promueve mayor crecimiento (LSH/HHS 1:1), como se observó para la producción de otras bacteriocinas altamente relacionadas (Sonomoto *et al* 2000).

Como se mencionó en la Introducción, otros autores describieron la fermentación de *L. lactis* utilizando sueros de quesos con suplementación de fuentes de nitrógeno complejas con niveles de producción de nisina de 8 mg/l (Huggenholtz *et al*

1991). En el presente trabajo, la mejor condición ensayada (suero/soja 2:1) dió rendimientos mayores (10,6 mg/l) utilizando un suero de menor calidad nutricional.

CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se estudiaron las condiciones de crecimiento y producción de nisina de *L. lactis* sub. *lactis* en frascos estáticos y agitados y en fermentador utilizando un medio de cultivo basado en desechos de la industria láctea.

En primer lugar se corroboró la capacidad de *L. lactis* para metabolizar lactosa en un medio de laboratorio de referencia. Asimismo, esta capacidad se mantuvo en cultivos desarrollados en medios con suero de ricota como fuente de carbono y energía mayoritaria.

Se comprobó que la optimización de los tratamientos de los componentes del medio de cultivo (suero de ricota y harina de soja) no sólo simplificó los pasos del proceso global sino que además produjeron hidrolizados que fueron nutricionalmente superiores. La disminución en los tratamientos térmicos y la adición de pasos de digestión enzimática posibilitó que componentes importantes presentes en el suero y la harina de soja (como péptidos cortos, aminoácidos y vitaminas) se encuentren disponibles en el medio de crecimiento.

Se analizó el efecto de agregados de hierro hemínico para el establecimiento de cultivos aireados de *L. lactis*. El hierro hemínico, y derivados industriales relacionados (hemoglobina, harina de sangre) extendieron la sobrevida en cultivos con agitación, disminuyeron la acidificación durante la fermentación y promovieron la síntesis de biomasa y nisina.

Adicionalmente, se estudió el efecto de micronutrientes en el crecimiento y la producciónde nisina. De acuerdo a las caraterísticas metabólicas del microorganismo, se seleccionaron grupos de aminoácidos, vitaminas y minerales: (i) arginina y glutamina, (ii) tiamina y niacina, y (iii) magnesio y manganeso. De acuerdo a los resultados no se encontró un efecto significativo sobre la productividad en ninguno de los grupos ensayados, solos o en combinación.

Se realizaron cultivos aireados de *L. lactis* en fermentador de 5 litros para determinar la composición de medio mas adecuado para la producción de nisina. Para maximizar el crecimiento y la obtención de producto libre en solución se adicionó hemina al medio de cultivo y se controló el pH durante todo el proceso. Se ensayaron diferentes condiciones, como el efecto de los tratamientos optimizados del suero de ricota y la harina de soja, la proporción de los hidrolizados y el efecto de la calidad del suero de leche utilizado. Se determinó una formulación que promovió mayor tasa de crecimiento (LSH/HHS 1:1) y otra diferente que mejora la producción (LSH/HHS 2:1) en cultivos *batch*. Los niveles de crecimiento en los cultivos ensayados fueron sensiblemente mayores a los reportados por otros autores (9 vs 2 unidades), consecuente con lo observado para cultivos aireados. Adicionalmente, el nivel de producción de nisina fue mayor a los obtenidos tanto en medios basados en suero de leche suplementado como en medios de laboratorio de referencia. Ensayos con cultivos en medios de referencia (M17) dieron concentraciones de nisina de 3 mg/l, mientras que con los medios de cultivos basados en suero de ricota y digerido de harina de soja el nivel de bacteriocina superaron los 10 mg/l.

En conclusión, en este capítulo se diseñó y optimizó un medio de fermentación de factibilidad industrial basado en suero de ricota que promueve el crecimiento y la producción de nisina. Sus características, en cuanto a componentes y preparación, lo transforma en una opción factible para su aplicación en escala de producción.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

REFERENCIAS

Aasen I., Moretro T., Katla T., Axelsson L., Storro I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2000) 53: 159-166.

Akerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentration on the kinetics of lactic acid production by *L. lactis* ssp. ATCC 19435 in whole wheat flour. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1998) 49: 682-690.

Amiali M., Lacroix C., Simard R. High nisin Z production by *L. lactis* UL719 in whey permeate with aeration. World J. Microbiol. Biotechnol. (1998) 14: 887-894.

Barefoot S., Klaenhammer T. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *L. acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. (1984) 45: 1808-1815.

Burin L., Buera M. B-galactosidase activity as affected by apparent pH and physical properties of reduced moisture systems. Enzyme and Microbial Technology (2002) 30: 367-373.

Cabo M., Murado M., Gonzalez M., Pastoriza L. Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. Enzy. Microb. Technol. (2001) 29: 264-273.

Cheigh C., Park H., Choi H., Pyun Y. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *L. lactis* subsp. lactis A164. Biotechnology Letters (2005) 27: 155-160.

Cheigh C., Pyun Y. Nisin biosynthesis and its properties. Biotechnology Letters (2005) 27: 1641-1648.

Chinachoti N., Zaima T., Matsusaki H., Sonomoto K., Ishisaki A. Relationship between fermentative production and aeration condition using *L. lactis* IO-1. J. Faculty of Agriculture, Kyushu University (1997) 43: 421-436.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Novak L., Lindley N., Loubiere P. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *L. lactis*. J. Appl. Bacteriol. (1995) 79: 108-116.

Curry B., Crow V. Lactobacillus spp.: General Characteristic. In Roginski H., Fuquay J., Fox P. (eds.) Encyclopedia of dairy sciences. London Academic Press (2003) 3: 1479-1484.

De Giori G., Valdez G., Ruiz Holgado A., Oliver G. Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. (1985) 68: 2160-2164.

De Jonge B., Chang Y., Xu N., Gage D. Effect of exogenous glycine on peptidoglycan composition and resistance in a methilicin-resistant *S. aureus* strain. Antimicrob. Agents Chemother. (1996) 40: 1498-1503.

De Vuyst L., Vandamme E. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic and Professional, London (1994) 151-221.

De Vuyst L., Vandamme E. Influence of the carbon source on nisin production in *L. lactis* subsp. lactis batch fermentations. J. Gen. Microbiol. (1992) 138: 571-578.

De Vuyst L., Vandamme E. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *L. lactis* subsp. lactis batch fermentations using a complex medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) 40: 17-22.

Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet B., Vido K., Gaudu P. Positive effects of heme and oxygen on growth and survival of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. (2001) 183 : 4509-4516.

Duwat P., Sourice S., Gruss A. Process for preparing starter cultures of lactic acid bacteria (1999) WO 00/05342.

Guerra N., Rua M., Pastrana L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. J. Food Microbiol. (2001) 70: 267-281

Hansson L., Häggström M. Effects of growth conditions on the activities of superoxide dismutase and NADH-oxidase/NADH-peroxidase in *Streptococcus lactis*. Curr. Microbiol. (1984) 10: 345-352.

Huggenholtz J., De Veer G. Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. In: Nisin and novel lantibiotics. Jung G,. Sahl H. (eds) ESCOM Science Publishers (1991).

Hurst A. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. (1981) 27: 85-123.

Jensen P., Hammer K. Minimal requeriments for exponential growth of L. lactis. Appl. Environ. Microbiol. (1993) 59: 4363-4366.

Klaenhammer T., Barrangou R., Buck B., Azcarate-Peril M, Altermann E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiolgy Reviews (2005) 29: 393-409.

Konings W., Poolman B., Driessen A. Bioenergetics and solute transport in lactococci. CRC Crit. Rev. Microbiol. (1989) 16: 419-476.

Kuipers O., Beerthuyzen M., De Ruyter G., Luesink E., De Vos W. Autorregulation of nisin biosynthesis in *L. lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem. (1995) 270: 27299-27304.

Law B., Kolstad J. proteolytic systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuweenhoek (1983) 49: 225-245.

Ledesma O., Ruiz Holgado A., Oliver G., Giori S., Raibaud P., Galpin J. A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. (1977) 42: 123-133.

Liao C., Yousef A., Richter E., Chism G. Pediococcus acidilactici PO2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in foods. J. Food Sci. (1993) 58: 430-434.

Liu X., Chung Y., Yang S. Yousef A. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *L. lactis*. Process Biochemistry (2005) 40: 13-24.

Loubiere P., Cocaign-Bousquet M., Matos J., Goma G., Lindley N. Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *L. lactis* subsp. lactis. J. Appl. Microbiol. (1997) 82:95-100.

Lv W., Cong W., Cai Z. Nisin production by L. lactis subsp. lactis under nutritional limitation in fed-batch culture. Biotechnol. Lett. (2004) 26: 235-238.

Matsusaki H., Endo N., Sonomoto K., Ishizaki A. Lanthibiotic nisin Z fermentative production by *L. lactis* IO-1: relationship between production of the lanthiobitic and lactate and cell growth. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1996) 45: 36-40.

Mercade M., Lindley N., Loubiere P. Metabolism of *L. lactis* subsp. cremoris MG 1363 in acid stress conditions. Int. J. Food Microbiol. (2000) 55: 161-165.

Miserendino T., Demirci A., Pongtharangkul T. Nisin Production by Immobilized Cell Culture during Batch and Fed-Batch Fermentations with Various pH Profiles. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal (2008).

Monnet V., Gripon J. Métabolisme azoté des bactéries lactiques. In: de Roissart H., Luquet F. (eds.) Bactéries lactiques. Lorica (1994).

Nagayasu M.,Krisna Wardani A., Nagahisa K., Shimizu H.,Shioya S. Analysis Of Hemin Effect On Lactate Reduction In *Lactococcus lactis*. Journal of Bioscience and Bioengineering (2007) 103: 6; 529-534.

Novak L., Loubiere P. The metabolic network of *L. lactis*: distribution of (14)C-labeled substrates betwen catabolic and anabolic pathways. J. Bacteriol. (2000) 182: 1136-1143.

Oliveira A., Nielsen J., Förster J. Modelling *L. lactis* using a genome-scale flux model. BMC Microbiology (2005) 5: 39.

Pandey A., Bringel F., Meyer J. Iron requeriment and search for siderophores in lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1994) 40: 735-739.

Parente E., Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 628-638.

Parente E., Ricciardi A. The influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. Lett. Appl. Microbiol. (1994) 19: 12-15.

Pongtharangkul T., Demirci A. Effects of fed-batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 73: 73-79.

Pongtharangkul T., Demirci A. Effects on pH profiles on nisin production in biofilm reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 71: 804-811.

Poolman B., Konings W. Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to aminoacids transport. J. Bacteriol. (1988) 170: 700-707.

Porubcan R., Sellars R. Lactic starter culture concentrates. In: Peppler H., Perlman D. Microbial Technology (1979) Academics Press, New York vol. 1: 59-92.

Rao A., et al. Process for preparation of protein-hydrolysate from soy flour. US6.896.917 (2005)

Ray B. Pediocins of *Pediococcus acidilactici* as a food biopreservatives. In: Ray B., Daeschel M. (eds.) Food biopreservatives of microbial origin. CRC (1992) 265-322.

Shimizu H., Mizuguchi T., Tanaka E., Shioya S. Nisin production by a mixed-culture system consisting of *L. lactis* and *K. marxianus*. Applied Environ. Microbiol. (1999) 65: 3134-3141.

Siezen R., Rollema H., Kuipers O., De Vos W. Homology modelling of the *L. lactis* leader peptidase NisP and its interaction with the precursor of the lantibiotic nisin. Protein Eng. (1995) 8: 117-125.

Sonomoto K., Chinachoti N., Endo N., Ishizaki A. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *L. lactis* IO-1. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic (2000) 10: 325-334.

Taniguchi M., Hoshino K., Urasaki H., Fujii M. Continuous production of an antibiotic polypeptide (nisin) by *L. lactis* using a bioreactor coupled to a microfiltration module. J. Ferment. Bioeng. (1994) 77: 704-708.

van Niel E., Hahn-Hagerdal B. Nutrient requeriments of lactococci in defined growth media. Applied Microb. And Biotechnol. (1999) 52: 617-627.

Vázquez J. Lactobacterias como probiontes e productoras de bacteriocinas. Modelos de crecemento e actividade. Aplicacións á acuicultura. Ph. D. Thesis, Universidad de Santiago de Compostela (2001).

Vazquez J., Cabo M., Gonzalez M., Murado M. The role of amino acids and pediocin production by two lactic acid bacteria. A factorial study. Enzyme and Microbial Technology (2004) 34: 319-325.

Vignolo G., De Kairuz M., De Ruiz Holgado A., Oliver G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lb. casei* CRL 705. J. Appl. Bacteriol. (1995) 78: 5-10.

Yu P., Dunn N., Kim W. Lactate removal by anionic-exchange resin improves nisin production by *L. lactis*. Biotechnol. Lett. (2002) 24: 59-64.

Zhang G., Mills D., Block D. Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of *Lactococci, Enterococci,* and *Streptococci*. Appl. Environ. Microbiol. (2009) 75:4; 1080-1087.

RECUPERACIÓN DE PRODUCTO Y CULTIVO CONTINUO

En este capítulo se describe el diseño e implementación de un proceso de fermentación y recuperación integrado en continuo, con *L. lactis* inmovilizado en fibras de celulosa cationizada (Cel-TMA). Para ello se desarrolló un proceso de recuperación de nisina *in situ* por extracción de espuma.

INTRODUCCIÓN

La producción de nisina es afectada tanto por factores del cultivo (cepa productora, composición del medio, pH, temperatura, agitación y aireación), como por características únicas de este producto, como la inhibición por sustrato y producto, la adsorción sobre la célula productora y la degradación enzimática (Parente *et al* 1999).

El descenso en el nivel de nisina luego de registrar un máximo de concentración durante la fermentación se considera como el resultado de la degradación proteolítica y/o la adsorción a la superficie del microorganismo productor. Estudios preliminares sobre degradación enzimática confirmaron la presencia de una enzima inactivadora de nisina del tipo metaloproteasa en el sobrenadante de cultivos de *L. lactis* NIZO 22186 (Pongtharangkul 2006).

La adsorción de nisina a las células productoras parece ser dependiente del pH del medio de cultivo. La nisina madura se produce durante todos los estadios de crecimiento, pero se adsorbe sobre la superficie celular cuando el pH del medio de cultivo es mayor a 5,5. A valores inferiores de pH se registra la liberación mayoritaria de la bacteriocina adsorbida debido principalmente al marcado incremento en su solubilidad a pH ácido (Ra *et al* 1996). Estudios *in vitro* muestran que el pH óptimo para la adsorción de la nisina a la superficie celular se encuentra entre 5,5 y 6,5 (Yang *et al* 1992).

Como se explicó en el Capítulo 1, la nisina se sintetiza por medio de un mecanismo de autorregulación, donde actúa como molécula inductora o feromona (Kuipers *et al* 1995). Cuando la bacteriocina registra una concentración límite en el medio

de fermentación, que varía con la cepa, la célula detiene la síntesis, a pesar de que puede seguir creciendo sin dificultad (Kim *et al* 1998). Esta autoinhibición se corrobora al demostrar que la remoción de nisina durante la fermentación aumenta el rendimiento de producción (Tolonen *et al* 2004).

Por lo tanto, la remoción de nisina durante la fermentación puede reducir la degradación proteolítica y/o la adsorción, y evitar la inhibición de su propia síntesis, incrementando la recuperación de producto.

Recuperación de nisina

El proceso industrial actual de recuperación de nisina del medio de fermentación involucra numerosas operaciones, entre las que se incluyen precipitación con cloruro de sodio, centrifugación o ultrafiltración y secado por *spray* (Kelly *et al* 2000). Como resultado, se obtiene una preparación de nisina con alto contenido en cloruro de sodio.

Por otro lado, varios autores reportaron estrategias de recuperación y purificación de nisina a escala laboratorio, entre las que se pueden citar como ejemplos precipitación con sulfato de amonio seguido por varios pasos de cromatografía de intercambio iónico e interacción hidrofóbica con un paso final de HPLC reversa (Parente *et al* 1999) y purificación en un paso con un anticuerpo monoclonal antinisina (Suarez *et al* 1997, Prioult *et al* 2000). A pesar de que todas reportaron altos valores de recuperación y purificación, en general no son apropiadas para su aplicación industrial, debido al elevado costo de las matrices cromatográficas y de los anticuerpos altamente específicos.

Existen varios métodos basados en adsorción/desorción o de partición que poseen potencial para aplicarse a escala industrial. Una de las estrategias consiste en la recuperación de nisina por adsorción a células productoras seguido por un tratamiento de desorción por reducción del pH y alta fuerza iónica (Yang *et al* 1992). Por otro lado, otros autores propusieron un sistema de purificación en dos pasos basado en la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

partición en detergente Triton X-114 y la adsorción/desorción a una resina de intercambio iónico (Boyaval *et al* 1998).

En este mismo sentido, la sílica muestra buena adsorción de nisina y alta compatibilidad con el crecimiento de células productoras, y se utiliza para la recuperación de la bacteriocina ya sea en un paso posterior o incorporado en el reactor (Chinachoti *et al* 1997, Wan *et al* 1996, Tolonen *et al* 2004).

La recuperación de proteínas por extracción en espuma es una técnica simple que puede aplicarse a numerosas proteínas. La nisina es una de las sustancias que puede separarse por este método, ya que no es afectada por las condiciones de operación, presumiblemente por su pequeño tamaño y las características químicas de sus aminoácidos componentes (Hawley *et al* 1960).

Recuperación de compuestos por fraccionamiento en espuma. El fraccionamiento con espuma es un método suave, compatible ambientalmente, económico y selectivo para la separación efectiva de compuestos desde soluciones acuosas diluidas. A pesar de ser un proceso antiguo (patentado en 1920), sólo en años recientes recibió un renovado interés para la separación de materiales biológicos, tales como proteínas, microorganismos, sólidos en suspensión, sustancias aromáticas y pigmentos (Linke *et al* 2007).

En esta operación las proteínas se recuperan de acuerdo a su comportamiento en la interfase gas-líquido, denominado actividad de superficie. La actividad de superficie de una proteína depende de sus características fisicoquímicas, como tamaño, carga e hidrofobicidad; y de condiciones ambientales como fuerza iónica, pH y presencia de detergentes, sales, azúcares y otros aditivos (Noble *et al* 1998).

Dos fenómenos físicos son los principales responsables de la separación y concentración de moléculas con actividad de superficie en la espuma: la adsorción de la molécula sobre la superficie de la burbuja y el drenaje del líquido que rodea a la burbuja de aire en la espuma (Bhattacharjee *et al* 2001).

La espuma consiste en una capa de líquido delgado, una interfase líquido-gas y una fase gaseosa (Fig. 6.1). Los compuestos con actividad de superficie se absorben a la interfase estabilizando la dispersión de la fase gaseosa por auto orientación. Mientras que las partes hidrofóbicas de las proteínas con actividad de superficie interaccionan con la fase gaseosa, las partes hidrofílicas se orientan hacia la fase líquida. Varios parámetros, como pH y concentración, influyen en la adsorción, eficiencia de separación y formación de espuma (Linke *et al* 2007).

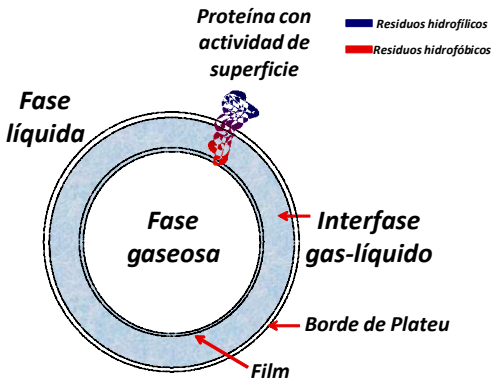


Figura 6.1
Estructura de la espuma e interacción de proteínas

Las burbujas de espuma tienen forma de polihedro. El líquido contenido en la espuma está dividido en dos zonas definidas denominadas film y bordes de *Plateau*. El film es la capa más externa de líquido en contacto con el aire y se encuentra a mayor presión que el líquido contenido en el borde de *Plateau*. Durante el drenaje de la espuma, el líquido en el film drena rápidamente hacia el borde de *Plateau*. Debido a que el volumen de líquido presente en la espuma es muy pequeño, se asume que la adsorción ocurre sólo cuando las burbujas están aún en el líquido por debajo de la espuma.

La transferencia de masa de la proteína desde el líquido a la interfase gas-líquido es rápida debido a la convección, y se considera que la adsorción a la superficie de la interfase es el paso limitante de velocidad. En algunos casos, como en proteínas que poseen muchos residuos hidrofílicos e hidrofóbicos, existe además una etapa de reorientación de las moléculas que cambia la morfología de la superficie de la burbuja. Adicionalmente, mezclas de proteínas interaccionan de manera dependiente durante la adsorción, ya sea cooperativa o competitivamente, dependiendo del tipo de proteínas que componen la mezcla (Bhattacharjee *et al* 2001).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La capacidad de la interfase gas-líquido para la absorción de proteínas es limitada y altas concentraciones de proteínas en el medio líquido pueden saturar la espuma (Linke *et al* 2007) reduciendo el rendimiento de la recuperación. Como la secreción de enzimas extracelulares consiste en un proceso dinámico, donde la concentración de enzima en el medio de cultivo varia significativamente con el tiempo de fermentación, es necesario ensayar para cada sistema las mejores condiciones de recuperación por este método.

El equipamiento para separación por espuma típicamente consiste en un contenedor de líquido con un aireador donde un gas, como aire o nitrógeno, se inyecta en el líquido para producir burbujas e inducir la formación de espuma. Entre las variables a controlar en este proceso se pueden citar el volumen de espuma, la concentración de proteínas en el medio líquido y el tamaño de las burbujas (Chan *et al* 2007).

Cultivo continuo con células inmovilizadas

El nivel de biomasa y producto alcanzados durante cultivos *batch* de BAL alcanzan un valor máximo, definido principalmente por la acumulación de productos metabólicos inhibitorios como el ácido láctico. Los cultivos continuos pueden sobrellevar esta limitación por reemplazo permanente del medio de crecimiento (Desjardins *et al* 2001).

Por otro lado, como se mencionó en el Capítulo 1, la posibilidad de obtener altas densidades celulares evitando el lavado (*wash out*) a altas velocidades de dilución (D) es una de las muchas ventajas de los sistemas inmovilizados, además de la protección frente a ambientes turbulentos con altas fuerzas de corte, y mayores velocidades de fermentación observadas en estos sistemas (Champagne *et al* 1992).

Sin embargo, unos pocos parámetros críticos como el costo de la inmovilización, limitaciones en el transporte de masa y aplicabilidad para el producto final, entre otros, hace necesario examinar previamente la metodología de inmovilización y el tipo de soporte a utilizar.

Numerosos trabajos reportan la inmovilización de *L. lactis* para la producción de ácido láctico o de nisina. La mayoría de ellos realizan inmovilizaciones por atrapamiento en geles de alginato (Wan *et al* 1995, Klinkenberg *et al* 2001) o carragenano (Desjardins *et al* 2001). Sin embargo, a pesar de que se logran inmovilizar por estos métodos altas densidades celulares, estos biocatalizadores sufren importantes pérdidas de actividad durante los procesos de producción debido a la liberación de las células al medio de reacción (Audet *et al* 1989, Champagne *et al* 1992). Las bacterias inmovilizadas en geles se encuentran rodeadas por una red polimérica que limita fuertemente su movimiento. Durante el crecimiento las bacterias empujan la matriz del gel y se forman colonias empaquetadas densamente. A medida que la colonia se expande pueden eventualmente llegar hasta la superficie de la bolilla, dando como resultado la erupción de la colonia y la liberación al medio (Hüsken *et al* 1996). Diferentes estrategias, como recubrimiento con polilisina o quitosano, se propusieron para reducir la liberación de las bacterias de las bolillas. Adicionalmente, la acumulación de lactato dentro de las bolillas del gel produce un complejo patrón de inhibición del crecimiento complejo durante el cultivo, por lo que las células tienden a reproducirse en las zonas cercanas a la superficie (Zhou *et al* 1998).

En contraste a los procesos con células inmovilizadas por atrapamiento, que usualmente sufren pérdidas de productividad durante la operación, las fermentaciones con microorganismos inmovilizados por adsorción mantienen una producción estable de larga duración por su capacidad regenerativa. Las células viejas se desprenden continuamente y son reemplazadas con células nuevas (Chang *et al* 1995). Fermentaciones de *L. lactis* inmovilizados por adsorción a quitosano (Sonomoto *et al* 2000), membranas cerámicas (Kamoshita *et al* 1998) o fibras de celulosa (Yang *et al* 1995, Cho *et al* 1996) mostraron ser efectivos aunque ninguno de ellos en condiciones aeróbicas.

En este capítulo se estudia la producción de nisina utilizando microorganismos inmovilizados mediante un proceso aireado en continuo con un medio de cultivo en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

base a suero de ricota (LSH) e hidrolizado de harina de soja (HHS) desarrollado en el Capítulo 5.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio de cultivo. Las soluciones de suero de ricota y digerido de harina de soja se trataron como se detalló en el Capítulo 4. Las reconstituciones de los medios de cultivo se realizaron en esterilidad en el momento de uso.

Fermentación batch. Los cultivos *batch* con y sin recuperación de nisina se realizaron en medio con suero de ricota (LSH), digerido de harina de soja (HHS) y hemina como se detalla en el Capítulo 5.

Protocolo de inmovilización en fibras de celulosa cationizadas. Sobre 30 g de celulosa cationizada (Cel-TMA) preparada como se describió en el Capítulo 2, y compactada dentro de un reactor tubular, se recircularon 3 l de un cultivo saturado de *L. lactis* obtenido en una fermentación *batch* en medio compuesto por LSH y HHS. Posteriormente se realizaron lavados con BP 30 mM pH 6,5 hasta no detectar células libres en el líquido de lavado. El reactor tubular con las células inmovilizadas se conectó al equipo de fermentación en continuo para su uso.

Características y condiciones experimentales de la fermentación contínua. Volumen del reactor de mezclado 2 l, volumen del reactor tubular 0,5 l, volumen de soporte de inmovilización 0,150 l. Equipamiento: electrodos de pH y oxígeno disuelto *Hach* con interfase RS-232, adquisidor analógico digital y controlador de bombas peristálticas. Control de pH: control *on-off* con solución de NaOH 0,1 N. Control de temperatura: baño termostatizado con recirculación externa. Los componentes del sistema de fermentación se esterilizaron por separado y se ensamblaron en esterilidad. Valores de control: temperatura 30 ºC, pH 5,5, agitación 100 rpm, aireación variable, flujo de recirculación 0,2 l/min, flujo de alimentación variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación de nisina in situ en cultivos batch

La posibilidad de recuperar la nisina directamente del medio de reacción simplificaría los pasos del proceso productivo, y reduciría los costos de producción por ahorro de equipamiento y consumo energético. Los primeros registros de recuperación de nisina por extracción con espuma (Hawley *et al* 1960) involucran la inducción de espuma mediante el agregado de detergentes y la recolección en una etapa post-fermentación. Trabajos posteriores (Liu *et al* 2010) reportaron un sistema de recolección intermitente de espuma durante la fermentación, pero su diseño no es adaptable para su uso en un fermentador. En este trabajo se diseñó un dispositivo para extraer direc-

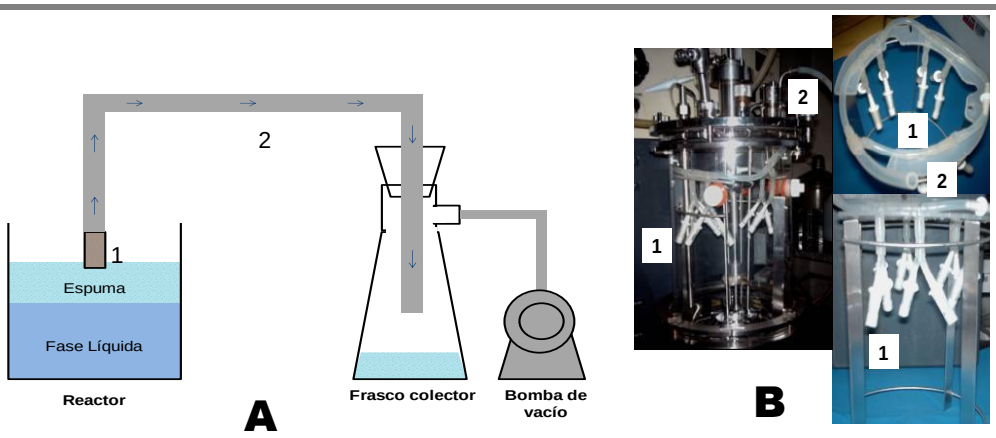


Figura 6.2
Detalles del sistema de recuperación de nisina por espuma para cultivos batch. A: esquema del sistema, B: detalles del sistema en el reactor. Referencias: 1- filtro poroso, 2- salida de espuma conectada a bomba de vacío

tamente la nisina durante el proceso de fermentación a través de la recolección de la espuma producida sin el agregado de detergentes, aprovechando las características espumantes del medio de cultivo. El cultivo se realizó en condiciones aireadas y con agregado de hemina, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo.

La Fig. 6.2 muestra el dispositivo y su ubicación dentro del frasco del reactor. La extracción procede por conexión a una fuente de vacío para colectar la espuma en

un recipiente complementario. La espuma se transforma en líquido espontáneamente al salir al colector. Si la velocidad de colección es más alta que la coalescencia de la espuma, se agregan pequeñas cantidades de etanol para aumentar esta última. La extracción puede realizarse por etapas o en continuo durante todo el proceso.

La Fig. 6.3 muestra los perfiles de fermentación de *L. lactis* con y sin extracción de espuma utilizando como medio de cultivo LSH/HHS en partes iguales (1:1).

En estos ensayos, realizados con el mismo medio de crecimiento, se muestra

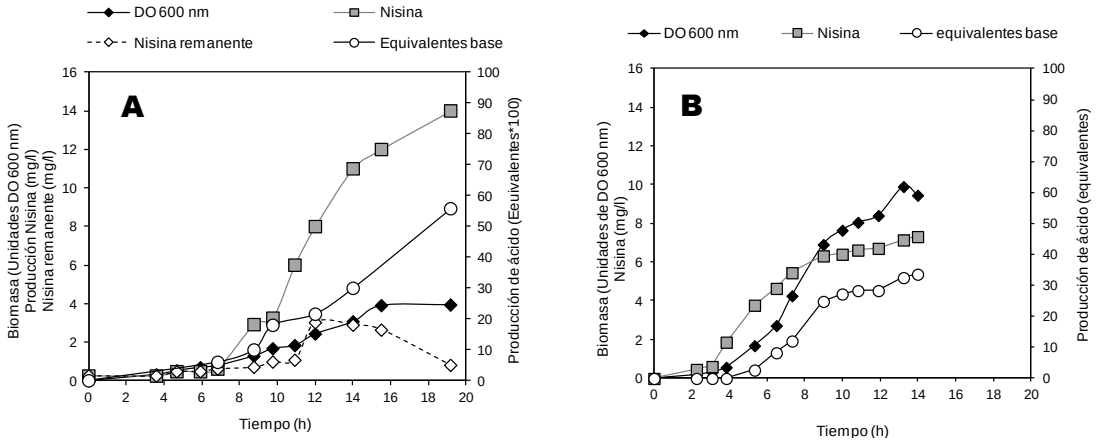


Figura 6.3
Cinética de crecimiento y producción de L. lactis A: con extracción de nisina, B: sin extracción

que es posible recuperar la nisina durante el crecimiento en *batch*. Asimismo, se observaron diferencias entre los dos ensayos. La producción de nisina en el cultivo con extracción de producto aumentó notablemente (7,3 mg/l sin extracción vs 16,7 mg/l para cultivo con extracción), dando indicios de control de síntesis de nisina por producto, coincidente con trabajos de literatura. El aumento de la producción dió como consecuencia una disminución en la velocidad de crecimiento y del valor final de biomasa, indicando que la maquinaria celular se utilizó primordialmente para la síntesis de nisina. La espuma enriquecida en nisina se retiró en fracciones y se observó un mayor enriquecimiento durante las primeras extracciones, que comienzaron a partir de la 10 h, momento a partir del cual se observó un aumento significativo en la producción.

El aumento en el título de nisina al extraer el producto durante la fermentación está reportado para el caso de produción de nisina Z por un proceso de adsorción (Tolonen *et al* 2004, Pongtharangkul *et al* 2007). A pesar de que en estos trabajos se consiguieron diferencias de hasta 4 veces en la producción de bacteriocina, los procesos requieren la recirculación del caldo de cultivo a través de columnas accesorias, que involucran mayor costo en equipamiento y material adsorbente que la operación propuesta en el presente trabajo. Por otro lado, y como se mencionó en la Introducción, los trabajos sobre recuperación de nisina por espuma también reportan mejoras en la producción pero con adición de detergentes y utilizando diseños que no pueden implementarse en un reactor convencional, requiriendo un frasco de fermentación adaptado a tal fin (Liu *et al* 2010). Por lo tanto en este trabajo se diseñó un dispositivo simple y esterilizable que permite la extracción de nisina durante la fermentación. Utilizando esta metodología se consiguió duplicar la producción de bacteriocina.

Fermentación continua de L. lactis

Selección del soporte de inmovilización. El cultivo en contínuo con células inmovilizadas permite trabajar con altas densidades celulares, y al estar el microorganismo inmovilizado, se puede operar a altas velocidades de dilución evitando el lavado del fermentador. Los materiales desarrollados en el Capítulo 2 (HDPE-GMA, Cel-GMA, Cel-TMA) mostraron buenas características como soportes para inmovilización de células. Debido a que todos se basan en mecanismos de adsorción, poseen la ventaja adicional de poder reutilizarse una vez desactivada la biomasa inmovilizada. El tipo de material a utilizar y la metodología de modificación superficial influyen en el diseño del reactor a utilizar. Para desarrollar un reactor con células inmovilizadas se seleccionó como material soporte Cel-TMA. La elección se basó en varias consideraciones que se describen a continuación. En primer lugar, la utilización de

fibras de celulosa como material base permite el diseño de diferentes geometrías de reactor, desde implementar adaptaciones a reactores de tanque agitado convencionales (Yang *et al* 1998) a reactores tubulares con recirculación. Adicionalmente, las fibras de celulosa resultan muy convenientes debido a que es un material económico y que se encuentra disponible en grandes cantidades.

Por otro lado, la cationización química de las fibras de celulosa es una metodología que puede realizarse dentro del mismo reactor, reduciendo la posibilidad de contaminación del soporte. En el caso de la modificación por injerto el material se debe modificar previamente, debido a que el material del reactor puede ser afectado por la radiación ionizante y a que es necesario un paso de lavado posterior para retirar el homopolímero formado como producto secundario. Además la cationización química no requiere equipamiento especial y los reactivos químicos necesarios están disponibles a nivel industrial. Por último, no se observaron en este trabajo diferencias significativas en los rendimientos entre los soportes estudiados.

En este apartado se describe el diseño y preparación de un fermentador contínuo para un proceso de producción de nisina con células inmovilizadas El mismo consta de tres partes principales: i) un reactor tubular y ii) un reactor de mezclado convencional y iii) un módulo de recuperación de producto.

Reactor tubular. El reactor tubular contiene la celulosa cationizada (Cel-TMA) como soporte de inmovilización de microorganismos. Este diseño permite minimizar posibles obstrucciones derivadas del uso de un medio de fermentación particulado, como es el caso del derivado de suero de ricota e hidrolizado de harina de soja. En la Fig. 6.4 se muestra el esquema del reactor tubular. El

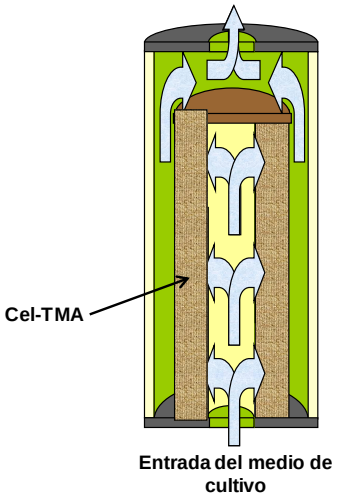


Figura 6.4
Esquema del reactor tubular

reactor (de 500 ml de volumen efectivo) consiste en un cartucho de polipropileno donde la celulosa (150 ml de volumen húmedo) se encuentra empacada alrededor de una malla de acero inoxidable. El medio de cultivo entra por la parte inferior del reactor en la zona central definida por la malla metálica, fluye a través de la celulosa y sale por el extremo superior. Este diseño permite además la modificación de las fibras de celulosa e inmovilización de *L. lactis in situ,* como se describe en *Materiales y Métodos.* Mediante esta estrategia se consigue que el soporte de inmovilización esté completamente empacado y que todo el proceso se pueda realizar en condiciones asépticas.

Por otro lado, el uso de este tipo de reactores facilita el cambio de escala productiva, dado que simplemente se pueden utilizar varios de ellos en paralelo en cantidad proporcional al factor de escalado.

Inmovilización de L. lactis en el reactor tubular. La inmovilización de las células en el soporte contenido en el reactor se consigue por la recirculación de un cultivo saturado de *L. lactis* a temperatura ambiente. Ensayos preliminares mostraron que una incubación *ON* produjo una disminución cercana al 90 % en la densidad celular en el líquido sobrenadante, indicando la inmovilización casi completa de los microorganismos al soporte. Con este dato, se realizó la inmovilización de *L. lactis* en el soporte contenido en el reactor tubular. Para ello se recircularon 3 litros de un cultivo saturado a temperatura ambiente ON. Por estimación de la biomasa libre en el sobrenadante se determinó que se inmovilizaron 2,5 x 10^{11} células por gramo seco de soporte. Por lo tanto, en los 30 gramos de soporte contenido en el reactor tubular se inmovilizó la población bateriana contenida en un cultivo saturado de 3 l de volumen. El uso de celulosa cationizada (Cel-TMA) redujo significativamente el tiempo de inmovilización comparado con trabajos previos de inmovilización en celulosa neutra, que requiere de tiempos de incubación del orden de días-semanas (Liu *et al* 2005).

Módulo de extracción del producto. En este capítulo se demostró la posibilidad de recuperar la nisina del medio de fermentación y se diseñó un dispositivo para reactores tipo tanque agitado para este fin. Sin embargo este dispositivo no es de utilidad para un proceso continuo, dado que el diseño requeriría de un tanque complementario para realizar la extracción. Por lo tanto se diseñó un módulo especial basado en el trabajo de otros autores (Noble *et al* 1998) para la extracción en forma contínua de producto. Dicho dispositivo consiste en tubo de vidrio en forma de U invertida donde por una de las ramas de la U se genera espuma que es recolectada por la otra rama, permitiendo que el líquido continúe su paso hacia el fermentador. En la Fig. 6.5 se muestra el esquema del dispositivo diseñado.

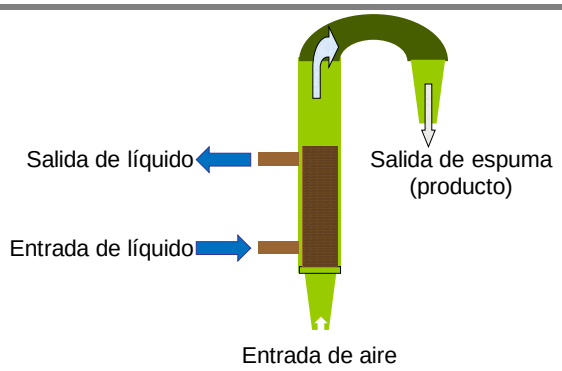


Figura 6.5
Esquema del dispositivo para la extracción de espuma en contínuo

Como es necesario inyectar aire desde la entrada inferior para generar espuma, con este dispositivo se logra un doble propósito: oxigenar el medio de cultivo y generar espuma que se colecta en un recipiente externo, dado que el medio de cultivo reingresa al tanque de mezclado y posteriormente al reactor tubular.

Esquema del proceso. El reactor tubular se conecta a un tanque agitado en el cual se realiza el mezclado, alimentación y extracción de medio de cultivo, ajuste de pH y temperatura. En la Fig. 6.6 se muestra el esquema del proceso y una fotografía del equipo.

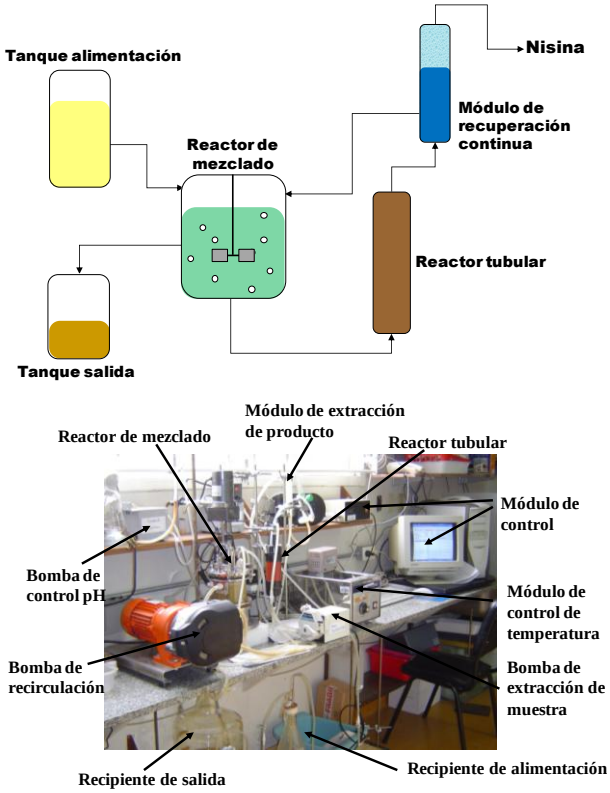


Figura 6.6
Esquema del reactor y proceso para operación en continuo

El medio de cultivo fresco se incorpora en el reactor de mezclado a una velocidad de alimentación determinada por medio de una bomba peristáltica y pasa luego de ajustar su pH y temperatura al reactor tubular por medio de una segunda bomba peristáltica que opera a un flujo en todos los casos mayor al de alimentación. Una vez que sale del reactor entra en la unidad de extracción, donde se inyecta aire estéril para inducir la formación de espuma y vuelve nuevamente al reactor de mezclado. El volumen del reactor de mezclado permanece constante (2 l) por rebalse hacia el recipiente de salida.

Perfil de la fermentación. La fermentación en continuo con *L. lactis* ATCC 11454 inmovilizado en fibras de celulosa cationizadas se realizó durante 560 horas ininterrumpidas bajo las condiciones experimentales que se detallaron en *Materiales y Métodos*. En la Fig. 6.7 se puede observar el comportamiento de las diferentes variables durante el proceso. En cada gráfico se indican los cambios en el flujo de alimentación.

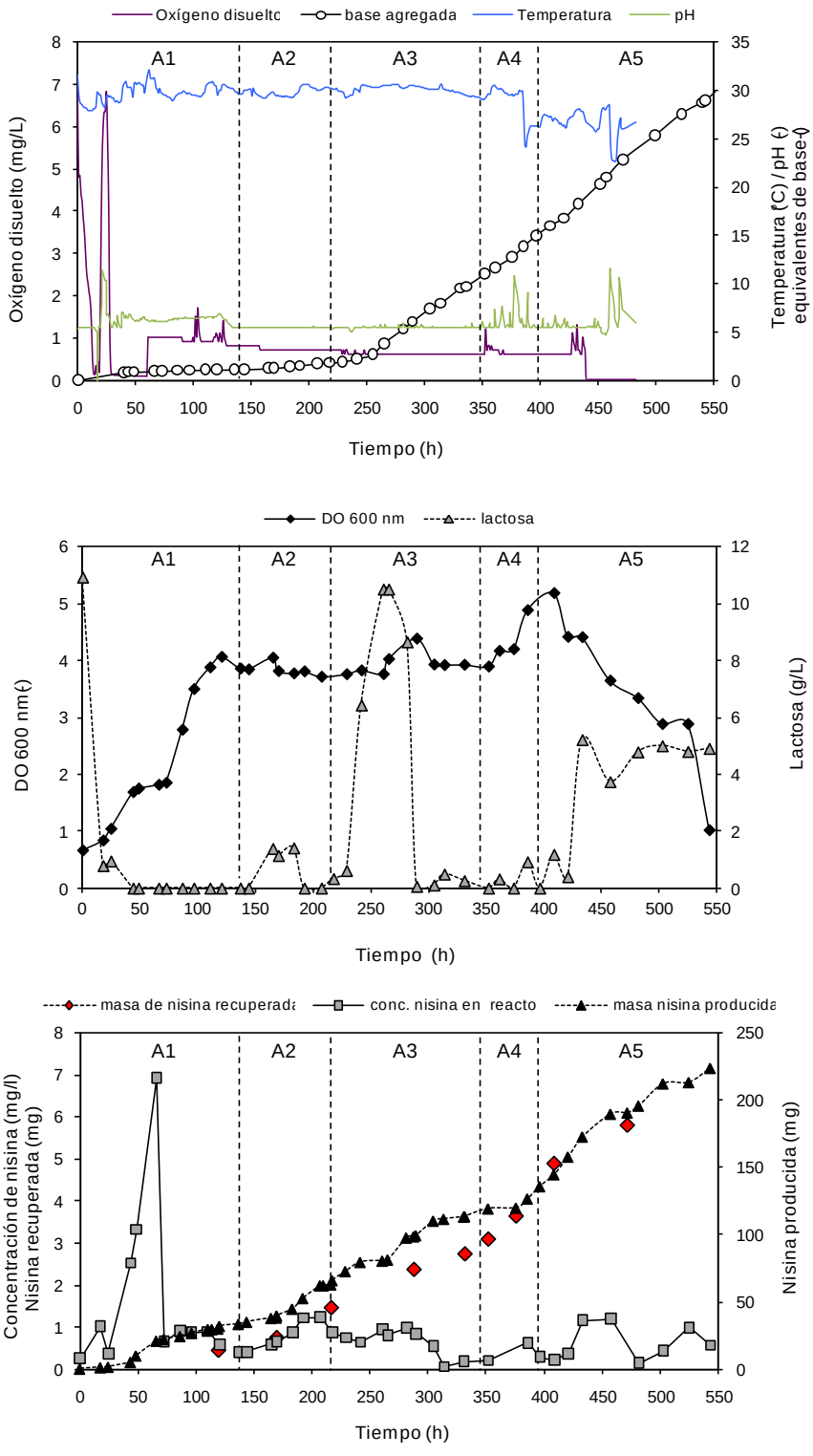


Figura 6.7

Perfil de la fermentación continua con células inmovilizadas. Se indican las diferentes velocidades de alimentación ensayadas (en l/día): A1 0,5; A2 1,0; A3 2;0; A4 2,4; A5 4,0

La figura muestra la variación en densidad celular y concentración de lactosa durante el proceso. Durante las primeras 120 h se observó un aumento progresivo de la biomasa libre en el reactor y una disminución de la lactosa en el reactor. En este período la lactosa se consumió totalmente. Luego de cada cambio de alimentación se observó un aumento de la concentración de lactosa en el reactor, luego de 30 a 50 h disminuye a valores muy bajos, excepto en A5 donde sólo disminuye hasta 5 g/L (aproximadamente un 40% de la concentración inicial), indicando que este flujo de alimentación es mayor a la velocidad de consumo.

Como se detalló en *Materiales y Métodos* la temperatura se mantuvo constante por recirculación de agua desde un baño termostático hacia el reactor de mezclado. Las pequeñas variaciones en la temperatura hacia el final de la fermentación se debieron a problemas temporarios con el termostatizador. Con respecto al contenido de oxígeno se observó una ligera disminución, que se correspondió con el aumento en el flujo de alimentación, aunque no represente un dato significativo. En el mismo gráfico se muestra la variación de pH y la cantidad de base agregada. Como puede observarse para las primeras alimentaciones la velocidad (pendiente) de agregado de base aumentó con la velocidad de alimentación. Sin embargo para A3 y A4 la velocidad de agregado de base se mantuvo constante (iguales pendientes) coincidente con la disminución en la velocidad de crecimiento y consumo de lactosa.

Durante el proceso se produjeron variaciones significativas en el pH producto de fallas en el sistema de control utilizado. Estas fluctuaciones pudieron influir en el rendimiento final de nisina.

Por último se presentan los datos de producción de nisina sobre muestras obtenidas del fermentador y de la recolección de espuma realizada en forma continua. La curva muestra la masa de nisina producida en cada etapa (independiente del volumen de cultivo). Como puede observarse en los últimos tiempos de cultivo (desde A3) la velocidad de producción de nisina se mantuvo constante de la misma manera que el agregado de base.

En la Fig. 6.8 se muestra un corte del material de inmovilización y la imagen de una SEM del mismo con *L. lactis* inmovilizado. Este material fue sometido a fermentación continua en el reactor tubular durante 560 horas.

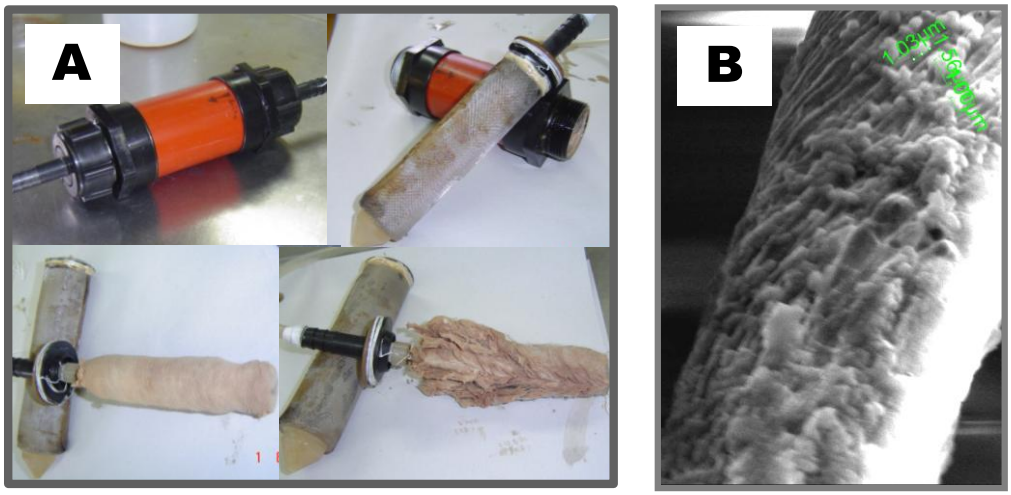


Figura 6.8
A. Vista del material inmovilizado posterior a la fermentación. B. Microfotografía SEM del material inmovilizado

El material inmovilizado luego de 560 horas de proceso mantuvo su integridad física y se detectaron células inmovilizadas, como se observa en la fotografía SEM. Análisis durante las diferentes etapas de la fermentación corroboraron ausencia de contaminantes en las condiciones de trabajo, mostrando que el proceso se operó en condiciones asépticas. Por lo tanto se comprobó que el reactor tubular y el material soporte utilizado son adecuados para el tipo de proceso y características del medio de fermentación. En la tabla 6.1 se muestra la velocidad de producción de nisina y la

Tabla 6.1
Parámetros de la producción de nisina en cultivo continuo

Alimentación	Flujo alimentación (l/día)	Velocidad de dilución D ($día^{-1}$)	Tiempo (h)	Volumen de medio (l)	Nisina producida (mg)	Nisina recuperada (mg)	Concentración de nisina (mg/l)	Productividad (mg nisina/l*día)
A1	0,5	1,0	96,0	1,3	2,0	0,4	1,6	0,4
A2	1,0	2,0	74,5	2,9	4,5	1,0	1,5	0,5
A3	2,0	4,0	147,7	13,1	17,7	2,2	1,3	0,2
A4	2,4	4,8	32,0	3,7	3,2	1,3	0,9	n.d.
A5	4,0	8,0	145,2	24,3	32,3	0,9	1,3	0,2

productividad para las diferentes etapas de alimentación.

La recuperación de la nisina en la espuma es de aproximadamente el 15 % del total producido. Este valor resultó muy bajo y el uso de un agente tensioactivo podría mejorar la recuperación de espuma.

La concentración de nisina producida por litro de medio corresponde a 1,3 mg/l para la mejor condición de velocidad de alimentación (condición A3). Sin embargo la productividad resulta mayor para menores flujos de alimentación (condición A2). Trabajos de otros autores indican que la producción de bacteriocinas en fermentaciones continuas, tanto con células libres como inmovilizadas, desciende cuando aumenta la velocidad de dilución D (Desjardins *et al* 2001).

Comparado con los mejores resultados obtenidos en apartados anteriores, la producción de nisina en cultivo continuo fue significativamente menor a la obtenida en *batch* (entre 7,3 y 15,7 mg/l) y en batch con extracción de espuma (16,7 mg/l).

En general en los datos reportados en la literatura la producción de bacteriocinas con células inmovilizadas es menor que la obtenida con células en suspensión en alimentado o continuo. En algunos trabajos se mejoró la productividad utilizando muy bajas velocidades de dilución (Cho *et al* 1996, Sonomoto *et al* 2000).

Diferentes factores podrían explicar la menor producción de nisina en sistemas inmovilizados: i) limitación de la difusión de la bacteriocina en el medio, ii) incremento en la adsorción de la bacteriocina a la superficie de la célula inmovilizada, iii) inhibición de la producción del prepéptido, del transporte o de su maduración en el ambiente local, ya sea por bajo pH, alta concentración de sustrato o de ácido láctico (Desjardins *et al* 2001) y iv) inactivación de la bacteriocina por proteasas presentes en el sobrenadante del medio de fermentación.

Un análisis ELISA de la nisina Z presente en cultivos con células inmovilizadas muestra que durante la fermentación cerca del 50% de la bacteriocina se encuentra en la forma de prepéptido (Desjardins *et al* 2002). Por lo tanto, los pasos de madura-

ción y/o transporte pueden ser limitantes y producir bajos rendimientos en producción. Además, también puede explicar que a menores valores de D la productividad sea mayor.

Como se mencionó en la *Introducción* existen evidencias de la existencia de proteasas que podrían inactivar la bacteriocina una vez que es liberada al medio de fermentación, por lo que el agregado de inhibidores podría mejorar el rendimiento final. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios para corroborar la presencia e identificar el tipo de proteasa involucrada. Fue reportado que el agregado de inhibidores o el tratamiento térmico posterior a la fermentación mejoró el rendimiento de recuperación de nisina Z (Tolonen *et al* 2004).

Como se mencionó anteriormente, el pH del cultivo también puede afectar la concentración de nisina presente en el medio. A valores de pH superiores a 5.5 la nisina puede adsorberse a la superficie de la célula productora, y como durante la fermentación en continuo se observaron variaciones significativas en este parámetro por problemas operativos, podría ser una de las razones por la cual el rendimiento en nisina es bajo. Adicionalmente, el agregado de detergentes podría reducir también la fracción de nisina adsorbida y aumentar el rendimiento final (Vignolo *et al* 1995, Amiali *et al* 1998).

Trabajos sobre producción de nisina Z (Sonomoto *et al* 2000, Bertrand *et al* 2001, Kamoshita *et al* 1998) y brevicina (Wan *et al* 1995) proponen la fermentación con células inmovilizadas operadas en *batch* secuenciales. En esta estrategia, el soporte inmovilizado se incuba con medio fresco en condiciones de fermentación y una vez llegado al punto final del cultivo, se cambia el medio de cultivo por uno fresco. En estos trabajos se reportan mejoras significativas en la producción y podría ser una opción para mejorar el proceso estudiado.

Conclusiones Parciales

En este capítulo se estudió la producción y recuperación de nisina en sistemas *batch* y contínuo integrados. Para ello se realizó en primer lugar un cultivo en tanque agitado adaptado con una unidad de extracción de espuma.

La extracción en espuma no afectó la actividad de la nisina y esta operación realizada *in situ* durante la fermentación permitió simplificar el proceso de obtención de la bacteriocina.

La producción de nisina aumentó significativamente en los cultivos con extracción de espuma. El rendimiento en producto fue más del doble comparado con una fermentación equivalente sin extracción (16,7 mg/l vs 7,3 mg/l). Este resultado fue consistente con reportes sobre inhibición de síntesis por producto.

Adicionalmente se diseñó un proceso de obtención de nisina por fermentación en continuo utilizando células inmovilizadas en celulosa cationizada (Cel-TMA) y recuperación *on line* del producto por generación y recolección de espuma. Para ello se utilizó un medio de cultivo basado en LSH y HHS, diseñado en el Capítulo 5.

Cel-TMA se empacó en un reactor tubular especialmente diseñado que permite realizar la modificación química del soporte y la inmovilización *in situ*. Esta característica permitió minimizar las posibles contaminaciones y lograr un perfecto empacado del material soporte.

Asimismo, se diseñó una unidad para la generación y colección de espuma. La espuma se generó por inyección de aire al medio de cultivo que sale del reactor de células inmovilizadas y fue posible obtener por este método una solución enriquecida en nisina.

El cultivo contínuo se ensayó a diferentes velocidades de alimentación, encontrándose un valor límite a partir del cual se redujo la producción de bacteriocina. Se determinó que se deben utilizar valores bajos de alimentación (1 l/día), correspondiente a una velocidad de dilución (D) de 2 día^{-1}, para obtener mayores títulos de producto y valores de productividad adecuados.

El soporte inmovilizado presentó gran estabilidad física y biológica para largos tiempos de proceso. Una microfotografía SEM mostró la presencia de células de *L. lactis* adheridas a la superficie de la fibra de celulosa luego de 560 h de fermentación.

La recuperación *on line* de nisina dió bajos rendimientos, por lo que presumiblemente sea necesario realizar este paso en forma discontinua para lograr mayor enriquecimiento en la espuma generada.

La producción de nisina en sistemas continuos resultó muy inferior a sistemas *batch* con y sin recuperación de producto. Este comportamiento también fue reportado por otros autores en sistemas similares para BAL.

REFERENCIAS

Amiali M., Lacroix C., Simard R. High nisin Z production by *L. lactis* UL719 in whey permeate with aeration. World J. Microbiol. Biotechnol. (1998) 14: 887-894.

Audet P., Paquin C., Lacroix C. Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. lactis* in a whey permeate medium. Appl. Envirom. Microbiol. (1989) 55: 185-189.

Bertrand N., Fliss I., Lacroix C. High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *L. lactis* UL719. Int. Dairy J. (2001) 11: 953-960.

Bhattacharjee S., Kumar R., Gandhi K. Modelling of protein mixture separation in a batch foam column. Chem. Engin. Sci. (2001) 56: 5499-5510.

Boyaval P., Bhugaloo-Vial P., Duffes F., Metivier A., Dousset X., Marion D. Reacteurs a haute densites cellulaires pur la production de solutions concentrees de bacteriocines. Lait (1998) 78: 129-133.

Champagne C., Gaudy C., Poncelet D., Neufeld R. *L. lactis* release from calcium alginate beads. Appl. Envirom. Microbiol. (1992) 58: 5; 1429-1434.

Chan N., Hossain M., Brooks M. A preliminary study of protein recovery from mussel blanching water by a foaming process. Chem. Eng. Proc. (2007) 46: 501-504.

Chinachoti N., Endo N., Sonomoto K., Ishizaki A. Bioreactor systems for efficient production and separation of nisin Z using *L. lactis* IO-1. J. Fac. Agric. Kyushu Univ. (1997) 43: 421-436.

Cho H., Yousef A., Yang S. Continuous production of pediocin by immobilized *P. acidilactici* PO2 in a packed-bed bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1996) 45: 589-594.

Desjardins P., Meghrous J., Lacroix C. Effect of aeration and dilution rate on nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *L. lactis* UL719 in supplemented whey permeate. Int. Dairy J. (2001) 11: 943-951.

Hawley H., Hall R. Production of nisin. US Patent 2.935.503 (1960).

Hüsken L., Tramper J., Wijffels R. Growth and eruption of gel-entrapped microcolonies. In Immobilized Cells: Basics and Applications ed. Wijffels R., Buitelaar R., Bucke C., Tramper J. pp. 336-340. Amsterdam, Elsevier Science (1996).

Kamoshita Y., Ohashi R., Suzuki T. Improvement of filtration performance of stirred ceramic membrane reactor and its application to rapid fermentation of lactic acid by dense cell culture of *L. lactis*. J. Fermentation and Bioengineering (1998) 85:4; 422-427.

Kelly N., Reuben B., Rhoades J., Roller S. Solvent extraction of bacteriocins from model solutions and fermentation. J. Chem. Technol. Biotechnol. (2000) 75: 777-784.

Kim W., Hall R., Dunn N. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism L. lactis. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1998) 50: 429-433.

Klinkenberg G., Lystad K., Levine D., Dyrset N. pH-controlled cell release and biomass distribution of alginate-immobilized *L. lactis* subsp. *lactis*. Journal of Appl. Microbiology (2001) 91: 705-714.

Kuipers O., Beerthuyzen M., De Ruyter G., Luesink E., De Vos W. Autorregulation of nisin biosynthesis in L. lactis by signal transduction. J. Biol. Chem. (1995) 270: 27299-27304.

Linke D., Zorn H., Gerken B., Parlar H., Berger R. Laccase isolation by foam fractionation-New prospects of an old process. Enzyme and Microbial Technology (2007) 40: 273-277.

Liu X., Chung Y., Yang S. Yousef A. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *L. lactis*. Process Biochemistry (2005) 40: 13-24.

Liu W., Zheng H., Wu Z., Wang Y. Effects of pH profiles on nisin fermentation coupling with foam separation. Biotechnological products and process engineering (2010) 85: 1401-1407.

Noble M., Brown A., Jauregui P., Kaul A., Varley J. Protein recovery using gas-liquid dispersions. J. Cromatography B (1998) 711: 31-43.

Parente E., Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 628-638.

Pongtharangkul T. Enhanced nisin production in a biofilm reactor and separation of nisin. Pennsylvania State University (2006).

Pongtharangkul T., Demirci A. Effects of fed-batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 73: 73-79.

Pongtharangkul T., Demirci A. Effects on pH profiles on nisin production in biofilm reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 71: 804-811.

Pongtharangkul T., Demirci A. Online recovery of nisin during fermentation and its effects on nisin production in biofilm reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 74: 555-562.

Prioult G., Turcotte C., Labarre L., Lacroix C., Fliss I. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. Int. Dairy J. (2000) 10: 627-633.

Ra S., Qiao M., Immonen T., Pujana I., Saris P. Genes responsable for nisin synthesis, regulation and immunity from a regulon of two operons and are induced by nisin in *L. lactis* N8. Microbiology (1996) 142: 1281-1288.

Sonomoto K., Chinachoti N., Endo N., Ishizaki A. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *L. lactis* IO-1. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic (2000) 10: 325-334.

Suarez A., Azcona J., Rodriguez J., Sanz B., Hernandez P. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. Appl. Environ. Microbiol. (1997) 63: 4990-4992.

Tolonen M., Saris P., Silka-aho M. Production of nisin with continuous adsorption to Amberlite XAD-4 resin using *L. lactis* N8 and *L. lactis* LAC48. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2004) 63: 659-665.

Vignolo G., De Kairuz M., De Ruiz Holgado A., Oliver G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lb. casei* CRL 705. J. Appl. Bacteriol. (1995) 78: 5-10.

Wan J., Gordon J., Hickey M., Mawson R., Coventry M. Adsorption of bacteriocins by ingestible silica compounds. J. Appl. Bacteriol. (1996) 81:2; 167-173.

Wan J., Hickey M., Coventry M. Continuous production of bateriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria. J. Appl. Bacteriol. (1995) 79: 671-676.

Yang R., Johnson M., Ray B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from acid lactic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. (1992) 58: 3355-3359.

Yang S., Huang Y, Hong G. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. Biotechnology and Bioengineering (1995) 45: 379-386.

Yang S., Lo Y., Chattopadhyay D. Production of cell-free xanthan fermentation broth by cell adsorption on fibers. Ohio State Univ, Columbus, OH, USA (1998).

Zhou Y., Martins E., Groboillot A., Champagne C., Neufeld R. Spectrophotometric quantifcation and control of cell release with chitosan coating. Journal of Applied Microbiology (1998) 84: 342-348.

Conclusiones generales

Para que un proceso de bioconversión industrial basado en el uso de microorganismos sea efectivo es necesario utilizar alta densidad celular. El uso de biocatalizadores heterogéneos estables por tiempos prolongados y con altas actividades catalíticas puede satisfacer este requerimiento.

Uno de los aspectos a analizar para garantizar el éxito del biocatalizador es el soporte. Idealmente, este último debe poseer gran área superficial, poseer características físicas o químicas que promuevan la adhesión celular, ser fácil de manipular y regenerar y poseer buena estabilidad mecánica, química, térmica y biológica. Además debe ser económico, accesible y fácil de escalar, inerte e inocuo.

A estos fines, en este trabajo se elaboraron soportes en base a polietileno y fibras de celulosa con características adecuadas para la inmovilización de microorganismos. En primer lugar se desarrolló un soporte basado en HDPE macroporoso modificado superficialmente por la técnica de injerto radioinducido. En este material se caracterizó y estudió la presencia de microorganismos inmovilizados por análisis IR y microscopía SEM. Asimismo el soporte se utilizó para inmovilizar *E. coli* y el biocatalizador obtenido se caracterizó por medio de una reacción biológica testigo de hidrólisis de nucleósidos. Con este material se obtuvo una inmovilización de *E. coli* equivalente a $2{,}25 \times 10^{10}$ células/g soporte. Adicionalmente, la carga de biomasa pudo optimizarse utilizando distintas estrategias como ser múltiples re-inmovilizaciones (valor óptimo: 4 re-inmovilizaciones) y/o favoreciendo el crecimiento de la biomasa inmovilizada. Esta última opción posibilitó la regeneración *in situ* de la biomasa sin necesidad de un nuevo paso de inmovilización una vez que el catalizador pierde parcialmente su actividad.

También fue posible regenerar el soporte a través de un proceso de lavado. Los tratamientos en condiciones suaves con detergentes y/o productos de limpieza en-

zimáticos mostraron los mejores resultados. La optimización del proceso con este último permitió obtener una recuperación total del soporte hasta 9 veces, lo cual mejora sustancialmente su vida útil.

Se determinó el tiempo de inmovilización óptimo, permitiendo acortar los tiempos del proceso (de 16 a 4 horas) y se reutilizó hasta 7 veces para mostrar la estabilidad del inmovilizado.

También se estudiaron inmovilizaciones en un soporte fibroso. Las fibras de celulosa presentan características que pueden ser ventajosas para su uso en fermentaciones. Ofrecen la posibilidad de diseñar dispositivos con geometrías diferentes, buscando sortear problemas de resistencia a altos flujos de trabajo y obstrucciones por sólidos presentes en medios de reacción crudos como los de uso industrial.

Dado que las fibras de celulosa no absorben naturalmente microorganismos con eficiencia se estudiaron dos tipos de modificaciones para mejorar sus características superficiales: injerto radioinducido (Cel-EDA) y cationización química (Cel-TMA). Ambas rindieron soportes con características adecuadas para la adhesión microbiana, con valores de inmovilización de $2{,}5 \times 10^{10}$ y $2{,}1 \times 10^{10}$ células/g soporte respectivamente utilizando como microorganismo testigo *E. coli*.

Se comprobó que los soportes obtenidos (HDPE-EDA, Cel-EDA y Cel-TMA) son adecuados tanto para la inmovilización de *E. coli* como de un microorganismo Gram positivo como *L. lactis.*

Estos resultados permitieron establecer una estrategia general para optimizar el uso de biocatalizadores. La posibilidad de aumentar la carga bacteriana en el material mejora los rendimientos del proceso. Los reusos, y en particular la reutilización del soporte, disminuyen los costos de producción relacionados con la obtención y preparación del biocatalizador. Es importante destacar que no es posible reutilizar otros soportes utilizados en bioconversiones, como son los hidrogeles de alginato, agar y agarosa.

La estabilidad en condiciones de operación de las fibras de celulosa cationizadas (Cel-TMA) se estudiaron posteriormente en un cultivo en continuo con células inmovilizadas para la producción de un compuesto de interés industrial como la nisina.

Como base del medio de crecimiento y producción se utilizó suero de leche obtenido luego de la fabricación de ricota. Este desecho industrial posee un alto poder contaminante y se genera en grandes volúmenes, por lo que es una materia prima disponible en cantidad y precio para utilizarla en un proceso productivo. El suero de ricota está constituido principalmente por lactosa, sales y bajas cantidades de proteínas. Debido a los altos requerimientos nutricionales de *L. lactis*, fue necesario incorporar aditivos al medio, en especial aminoácidos y vitaminas. Para ello, se diseñó un protocolo de tratamiento de suero de ricota por hidrólisis enzimática y uno para la obtención de un digerido de proteínas de soja a partir de una harina comercial. Estos tratamientos se optimizaron reduciendo significativamente el tiempo, volúmenes de agua y reactivos químicos necesarios.

Para caracterizar *L. lactis* desde el punto de vista microbiológico (medio de cultivo, cinética y condiciones de crecimiento) se diseñaron y/o adaptaron las metodologías analíticas para el seguimiento de las fermentaciones de *L. lactis* y la producción de nisina.

Antes de evaluar el comportamiento de *L. lactis* en procesos fermentativos, se ensayó su supervivencia en tiempos de fermentación prolongados por el uso de hierro hemínico como aditivo al medio de cultivo. Se corroboró un aumento en la sobrevida del microorganismo en condiciones de cultivo, una mayor generación de biomasa y se estudió la producción de nisina en cultivos en frascos agitados.

Se realizaron fermentaciones en *batch* de 3 l para analizar la generación de biomasa y producción de nisina con diferentes formulaciones de medio de cultivo basado en suero de leche y proteínas de soja hidrolizados en condiciones aireadas utilizando hemina como aditivo. Un medio de cultivo industrial en base a partes iguales de estos componentes resultó en un máximo aprovechamiento de la lactosa presente en

el suero de leche, reduciéndola a valores menores a 0.25% y altos niveles de biomasa (9 unidades de DO_{600nm}). Estos datos superan a los presentados por otros autores para cultivos en sueros lácteos de mayor calidad nutricional que el utilizado en este trabajo.

Además se ensayó la producción de nisina en cultivos aireados mediante el agregado de hemina, no reportado en la literatura. Se determinó que la formulación con dos partes de LSH y una de HHS promovió mayor rendimiento de nisina que la formulación 1:1 (10,6 vs 7,3 mg/l), a pesar de un menor nivel de biomasa final (6,8 unidades de DO_{600nm}). Se concluye que para el diseño de un proceso continuo con células inmovilizadas, la formulación de partes iguales de suero de ricota y soja sería apropiada para la obtención de la biomasa a inmovilizar, mientras que la formulación enriquecida en suero para la producción continua de nisina. Sorprendentemente estos resultados indicarían que la producción de nisina no está completamente ligada al crecimiento.

Los métodos de producción de nisina reportadas por otros autores son en base a leche y/o medios de cultivo muy enriquecidos y de alto costo para ser utilizados a escala industrial. La patente original de producción de nisina a partir de leche reporta una producción de 20 mg/l de cultivo y estudios de fermentaciones mixtas en medios complejos llegan a 100 mg/l de nisina. Utilizando medios de cultivo más pobres en nutrientes los niveles de producción descienden significativamente. La producción de nisina en este trabajo fue del orden de los 11 mg/l utilizando medios de cultivo basados en un desecho industrial de muy bajo costo.

Utilizando la capacidad de este microorganismo para crecer y generar producto en aerobiosis con agregado de hemo, se diseñó adicionalmente una estrategia de recuperación simultánea de producto en base a la espuma. La inyección de aire en el reactor produjo espuma enriquecida en nisina, la cual fue colectada por aspiración. El diseño del dispositivo de extracción permitió la recuperación del producto durante la fermentación desde el mismo recipiente de cultivo, a diferencia de trabajos de otros autores que extraen bacteriocinas en una etapa posterior en tanques accesorios. De

esta manera se reduce el tiempo del proceso y los costos en equipamiento. La fermentación en estas condiciones produjo como resultado un aumento significativo en la producción de nisina comparado con el mismo proceso sin recuperación de producto (16,7 vs 7,3 mg/l). Estos resultados, además de conseguir una mejora sustancial en el perfil del proceso, corroboraron el mecanismo de inhibición de síntesis por producto propuesto por otros autores.

Por último se diseñó un proceso para fermentación en continuo con células inmovilizadas y recuperación *in situ* del producto. La fermentación continua se llevó a cabo durante 560 h y se ensayaron diferentes velocidades de dilución. Se determinaron condiciones donde la lactosa se consume en su totalidad y se produce nisina (1,5 mg/l para D= 2 día^{-1}). Si bien se logró tener un proceso continuo estable los valores de producción obtenidos fueron sensiblemente menores a los obtenidos en cultivos *batch,* coincidente con lo observado por otros autores para cultivos en condiciones anaeróbicas.

Los resultados demostraron que el biocatalizador con células inmovilizadas resistió las condiciones de operación. Las fotografías SEM del material inmovilizado luego del ensayo de fermentación continua mostraron que las células permanecieron asociadas al soporte. No se observaron durante la operación problemas de obstrucciones por los sólidos en suspensión presentes en el medio de fermentación, por lo que el diseño del reactor tubular empacado fue apropiado para este tipo de procesos.

El desarrollo de un proceso basado en suero para la producción de un compuesto de alto valor agregado mediante células inmovilizadas constituye un ejemplo de un proceso sustentable, donde se logra disminuir el poder contaminante de un desecho y la obtención de un producto de manera continua.

La gran estabilidad del inmovilizado de *L. lactis* desarrollado lo convierte en una opción para la obtención de numerosos productos no ligados al crecimiento, como la producción de vitaminas u otras moléculas orgánicas de valor comercial, que sean excretadas al medio de fermentación.