

Trabajos originales

Las células inmovilizadas. Técnicas de la ingeniería bioquímica ⁽¹⁾

Ph. THONART, M. PAQUOT, B. BAIJOT, D. DALEMANS

Departamento de Tecnología Agroalimentaria y Forestal
Facultad de Ciencias Agronómicas, Gembloux

RESUMEN

Los autores describen las técnicas de inmovilización de células y presentan las ventajas que dichas técnicas tienen. Ellos ubican a esta técnica dentro de la evolución de la biotecnología. En el trabajo se exponen las aplicaciones industriales, especialmente las agroalimentarias, y el ejemplo de la producción del etanol y del ácido málico es de gran ayuda para la discusión.

SUMMARY

The authors describe the cells immobilizing techniques and present their advantages. They place this technique within the development of biotechnology. The industrial applications, particularly for the agri-food industry are presented here and the example of ethanol and malic acid production backs up the discussion.

INTRODUCCION

La biotecnología consiste en la explotación industrial de las potencialidades de los microorganismos, de las células animales y vegetales, así como de las fracciones subcelulares que de ellas se derivan. En esencia, es un conjunto de técnicas que utiliza la biología en una u otra fase.

Entre las técnicas utilizadas, las células inmovilizadas tienen actualmente un desarrollo importante. Esta técnica consiste en inmovilizar células, vivas o muertas, en un reactor, y en permitir, de esta forma, su utilización en un proceso continuo. Constituye una prolongación de la técnica de las enzimas inmovilizadas (Thonart *et al.*, 1977) y presenta, en relación con esta tecnología, diversas ventajas. El uso de células inmovilizadas permite la realización de reactores con reacciones múltiples y consecutivas, con regeneración de cofactores o sin ella.

Gracias a las células inmovilizadas, es relativamente fácil transformar la glucosa en etanol; este conjunto de reacciones sería difícil de realizar por medio de enzimas inmovilizadas. Además, esta tecnología es en general menos costosa que la de las enzimas inmovilizadas.

La célula sólo recibe un ligero tratamiento antes de realizarse la inmovilización, con excepción de un tratamiento de permeabilización o desnaturalización de algunas actividades secundarias. El tiempo de vida promedio de estos reactores puede llegar a varios meses.

En la conducción de los reactores de células inmovilizadas, es fundamental diferenciar dos tipos de células inmovilizadas. En el primero se utilizan células vivas fijadas o aprisionadas, las que mantendrán su capacidad para multiplicarse, y en el segundo se utiliza la envoltura celular como matriz para apresar algunas enzimas celulares y realizar bioconversiones.

Teniendo en cuenta estas observaciones, abordaremos sucesivamente las técnicas de inmovilización de células, los reactores de células inmovilizadas y las aplicaciones industriales, y terminaremos analizando el futuro de estas técnicas. Remitimos al lector a que consulte diversas revistas (Abbat, 1977; Chibata y Rosa, 1977; Jack y Zajic, 1977; Durand y Navarro, 1978; Lebesque y Dubreuil, 1983).

TECNICAS DE INMOVILIZACION

Las técnicas de inmovilización se agrupan en cuatro clases: la inmovilización por adsorción, por unión covalente, por inclusión en un gel y por aglomeración sin soporte (*cross - linking*).

Inmovilización por adsorción

La experiencia demuestra que la adhesión de los microorganismos se produce espontáneamente en las superficies en contacto con una suspensión de células. En la industria, la técnica de inmovilización por adsorción ha sido utilizada en la fabricación del vinagre y en el empleo de lechos bacterianos de descontaminación. Se han realizado diversos estudios en las industrias alimentarias: fermentación continua de un mosto de cerveza, producción continua de etanol, producción de ácido acético y desacidificación continua de los mostos de uva.

La optimización de la cantidad de células fijadas y la determinación de la afinidad entre un microorganismo y un soporte fueron objeto de diversos estudios (Messing y Oppermann, 1979; Messing *et al.*, 1979; Navarro, 1981; Michaux *et al.*, 1982; Thonart *et al.*, 1982).

El tamaño de los poros del soporte tiene una importancia apreciable; el diámetro de un poro en un rango entre una vez el tamaño menor de las células y cinco veces su mayor tamaño, constituye la óptima condición para inmovilizar grandes cantidades de los microorganismos que se dividen por fisiparidad. En lo referente a las levaduras, Navarro (1981), demostró que la retención tiene lugar preferentemente en los poros, cuyo diámetro promedio se asemeja al tamaño de las células. Las propiedades de superficie del organismo y del soporte son parámetros fundamentales en el proceso de inmovilización por adsorción. Existe una relación entre la carga global que contienen las células y el soporte y su afinidad. Para estudiar la carga de una partícula se han investigado y descrito diversas técnicas (Paquot *et al.*, 1977). Para los sistemas biológicos en los que la densidad de carga es pequeña, se obtuvo un buen estimado del potencial de superficie a través de la medición de la movilidad electroforética (Thonart *et al.*, 1982). Por medio de esta técnica se mide el potencial zeta, que representa una carga electrocinética en la interfase sólido-líquido de la partícula.

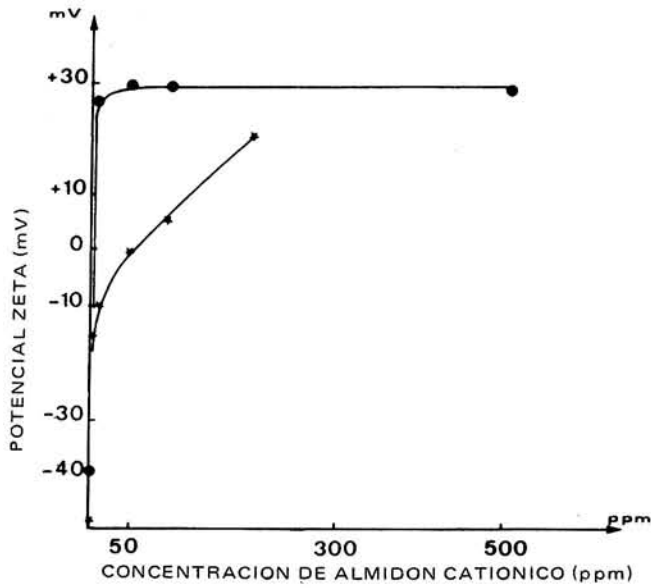


FIG. 1. Influencia del almidón catiónico en el potencial zeta de células y de aserrín en el agua destilada.

- cepa diploide
- * aserrín de madera

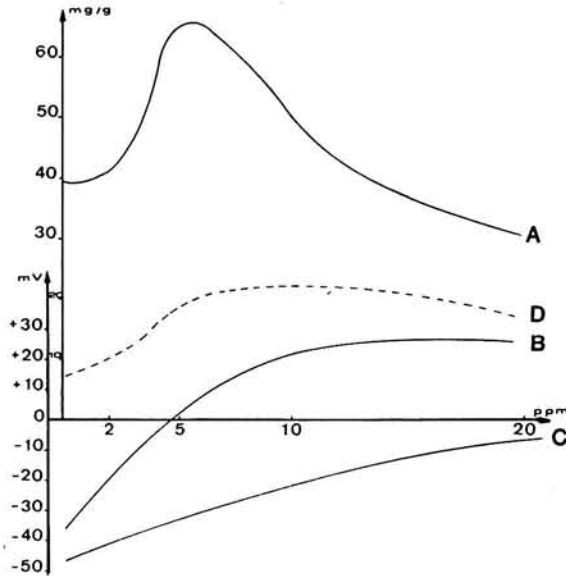


FIG. 2. Influencia del potencial zeta en la cantidad de células inmovilizadas.

- A= cantidad de células inmovilizadas (mg de células/g de soporte)
- B= potencial zeta de *Cándida*
- C= potencial zeta del aserrín en el agua destilada
- D= diferencia entre el potencial zeta de las células y de las partículas de aserrín

Mientras mayor sea la diferencia en los potenciales electrocinéticos del soporte y de las células, más importante será su afinidad. Thonart *et al.*, 1982 y Michaux *et al.*, 1982 demostraron que es posible modificar el potencial zeta de las células y de su soporte mediante la adición de polímeros naturales o de iones específicos. La figura 1, tomada de Thonart *et al.* 1982, demuestra que la adición de almidón catiónico cambia profundamente los valores del potencial zeta.

Además, la figura 2 muestra que cuando el potencial zeta de las células es positivo y el del soporte es negativo (se trata de partículas de aserrín en este caso), la cantidad de células fijadas y la velocidad de fijación aumentan.

El efecto del pH en la fijación (Navarro, 1981), y la influencia de la edad del cultivo (Hattori *et al.*, 1972; Fletcher, 1977), pueden explicarse por modificaciones del potencial electrocinético de la célula. Dagulis *et al.*, 1981, utilizan diversas resinas intercambiadoras de iones y tienen en cuenta la carga negativa de las células para optimizar su fijación.

La tabla 1 muestra la cantidad de células inmovilizadas (expresada en mg/g de soporte) obtenidas por diversos autores, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 1
CANTIDAD DE CELULAS DE LEVADURA (*SACCHAROMYCES*)
INMOVILIZADAS POR GRAMO DE SOPORTE

Organismo	Tipo de soporte	mg de células adsorbidas/ g de soporte	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Partícula de madera	188	Moo-Young <i>et al.</i> (1980)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Resina XE 352	130-140	Daugulis <i>et al.</i> (1981)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aserrín + almidón catiónico	145	Michaux <i>et al.</i> (1982)

Tabla 2
SOPORTES UTILIZADOS PARA INMOVILIZAR LAS CELULAS POR ADSORCION

Tipo de soporte	Organismo	Referencia
Viruta de madera	<i>Saccharomyces</i>	Michaux <i>et al.</i> (1982)
Resinas intercambiadoras de iones	<i>Saccharomyces</i>	Daugulis <i>et al.</i> (1981)
Poliestireno	<i>Pseudomonas</i>	Fletcher (1977)
Aserrín	<i>Saccharomyces</i>	Thonart <i>et al.</i> (1982)
Cerámica	<i>Saccharomyces</i>	Daugulis <i>et al.</i> (1981)
Bolitas de sílice	<i>Saccharomyces</i>	Navarro y Durand (1981)
Bolitas de vidrio	<i>Acetobacter</i>	Ghommidh <i>et al.</i> (1981)
Dualite AIOID (en forma de acetato)	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Navarro (1981)
Spherosil XOB 015	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Navarro (1981)

El tipo de soporte utilizado en estas inmovilizaciones (tabla 2) influye grandemente en el comportamiento mecánico de los reactores así como en la cantidad de células inmovilizadas.

Esta técnica de inmobilización es simple y poco costosa, evita los productos químicos tóxicos o las condiciones no fisiológicas. Se utiliza particularmente para la inmobilización de células vivas que se dividen durante el funcionamiento del reactor pues el exceso de células se elimina fácilmente.

Inmobilización por inclusión en un gel

Esta técnica consiste en apresar células vivas o muertas en un gel. La red que forma este gel puede crearse por diversos procedimientos: por simple precipitación, por medio de la formación de complejos iónicos, por policondensación o por polimerización (tabla 3).

Tabla 3

EJEMPLOS DE POLIMEROS UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION POR INCLUSION Y TIPO DE RED FORMADA (SEGUN LA TABLA (p. 145) DE KLEIN Y WAGNER, 1978)

<i>Tipo de red formada</i>	<i>Naturaleza de la unión en el gel</i>	<i>Ejemplos</i>
Precipitación	no específica	colágeno, poliestireno, agar triacetato de celulosa
Formación de complejos iónicos	iónica	alginato
Policondensación	covalente	resina epóxido, poliuretano
Polimerización	covalente	poliacrilamida

La selección del tipo de polímero dependerá de las propiedades mecánicas del gel (compresión, fuerza de cizalladura), de las propiedades químicas (toxicidad, condiciones de estabilidad en función del pH y de la composición iónica) y de las propiedades físicas (permeabilidad del gel).

Por ejemplo, los alginatos son considerados no tóxicos y pueden ser utilizados en las industrias alimentarias, sin embargo, su estabilidad dependerá de la composición del medio que no podrá contener agentes acomplejantes de calcio. Además, el pH de funcionamiento deberá ser ácido. Por el contrario, los geles obtenidos por polimerización y condensación son más estables en función de la composición iónica del medio, pero pueden liberar monómeros y no siempre son aceptados en la industria alimentaria.

Las propiedades mecánicas de estos geles pueden ser mejoradas por medio del aumento de la concentración del polímero, en detrimento de la permeabilidad del gel. Recordemos que el producto que es necesario transformar deberá atravesar el gel para alcanzar la célula y el producto transformado deberá recorrer el camino inverso. Estos fenómenos de transferencia son uno de los inconvenientes de esta técnica.

Esta técnica puede adaptarse muy fácilmente a las células muertas o vivas. Contrariamente a lo que pueda creerse, el crecimiento celular se realiza en el gel como lo demostró Wada *et al.* (1980), y el número de células es diez veces superior al logrado en el cultivo tradicional.

En lo referente a las aplicaciones industriales, observemos que la producción de ácido aspártico (Chibata, 1978) y de ácido málico (Chibata y Tosa, 1977), así como la isomerización de la glucosa en fructosa pueden ser realizadas actualmente por medio de células aprisionadas.

En la tabla 4 se indican las aplicaciones recientes de esta técnica de inmobilización y se demuestra la grandísima diversidad de posibilidades que existen.

Tabla 4
 APLICACIONES RECIENTES DE LA TECNICA DE INMOVILIZACION DE CELULAS

Organismos	Bioconversión	Polímeros	Referencia
<i>Arthrobacter simplex</i>	deshidrogenación	Prepolímero de uretano	Tanaka <i>et al.</i> , 1979
<i>Nocardia rhodocrus</i>	deshidrogenación	Prepolímero de uretano	Tanaka <i>et al.</i> , 1979
<i>Trichoderma</i>	celobiosa → glucosa	Alginato	Matteau y Saddler, 1982
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	glucosa → etanol	Kappa carragenano	Wada <i>et al.</i> , 1980
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glucosa → etanol	Alginato	Williams y Munnecke, 1981
<i>Methanosarcina barkeri</i>	metanol → metano	Alginato	Scherer <i>et al.</i> , 1981
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glucosa → etanol	Alginato	Gyo Meon Cho <i>et al.</i> , 1981
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	producción de antibióticos	Poliacrilamida hidrazida + glutaraldehído	Freeman y Aharonowitz, 1981
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sacarosa → glucosa + fructosa	Gelatina	Parascandola y Scardi, 1982
<i>E. coli</i>	biconversión de antibiótico	Poliuretano	Klein y Kludge, 1981

Inmovilización por unión covalente

Las células pueden ser inmovilizadas por medio de uniones covalentes entre la célula y el soporte. Hay que destacar que esta técnica está relativamente poco desarrollada, lo que se debe a la toxicidad de los reactivos. Además, este sistema de inmovilización se utiliza generalmente con células muertas que tienen una actividad de interés industrial. La inmovilización se realiza generalmente por medio de reactivos bifuncionales como el glutaraldehído.

Inmovilización por aglomeración sin soporte (*Cross-linking*)

La aglomeración de las células entre sí puede ser realizada por medio de dos técnicas diferentes: por unión química o por unión física. La aglomeración química de las células se efectúa por medio de agentes bifuncionales como los dialdehídos. Es de destacar que la toxicidad de estos agentes limita fuertemente su utilización.

En lo referente a la aglomeración por unión física, ésta se relaciona directamente con la carga de las partículas y especialmente el potencial zeta que describimos anteriormente (Paquot *et al.*, 1977). En este caso, un potencial zeta nulo permite una aglomeración más fácil de las células. En general se añaden agentes floculantes como los iones calcio o Al^{+++} , pero también pueden utilizarse polímeros como el quitosano o los polielectrólitos. Observemos que el potencial zeta puede ser modificado de igual forma por vía genética y este trabajo está en vías de realización en nuestro laboratorio con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que Lee *et al.* (1982) sugieren que se haga con *Zymomonas mobilis*.

Esta aglomeración por unión física tiene una gran importancia en algunas fermentaciones continuas. En este tipo de reactor se llega a aumentar fuertemente el tiempo de permanencia de las células, evitando así un reciclaje externo de la biomasa.

Los reactores de células inmovilizadas

Las técnicas de células inmovilizadas forman parte de la ingeniería bioquímica; esencialmente, el objetivo es el de obtener reactores cuya actividad y estabilidad sean superiores a los que utilizan las células libres. Estas técnicas deben mejorar la rentabilidad económica de los procesos de bioconversiones.

En la discusión de estos reactores, distinguiremos los reactores de células vivas que realizan generalmente varias reacciones enzimáticas consecutivas (R.C.V.) y los de células muertas en las que se realiza una sola reacción (R.C.M.). Además, trataremos de ilustrar nuestras palabras utilizando los ejemplos de la producción de etanol (R.C.V.) y de ácido málico (R.C.M.).

Actividad de las células inmovilizadas

En el caso de los reactores de células muertas (R.C.M.), la actividad depende principalmente de los problemas de difusión. Por otra parte, hay que velar por que las reacciones secundarias sean cada vez menores. El caso de la producción de ácido málico es un buen ejemplo de ello.

Tabla 5

INFLUENCIA DE LA CEPA, DEL SISTEMA DE INMOVILIZACION (A) Y DE CIERTOS TRATAMIENTOS DE PERMEABILIZACION (B) EN LA PRODUCCION DE ACIDO MALICO POR BIOCONVERSION DEL ACIDO FUMARICO

(A) Cepa	Inmovilización	Actividad fumarasa $\mu \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$	Referencia
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	poliacrilamida	5800	Isao Takata <i>et al.</i> , 1980
<i>Brevibacterium flavum</i>	poliacrilamida	6680	idem
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	carragenano	5800	idem
<i>Brevibacterium flavum</i>	carragenano	9920	idem

(B) Cepa	Tratamiento	Acido L-málico $\mu \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de células	Acido succínico mol% de ácido málico	Referencia
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	Control	990	2,5 - 5	Kozo Yamamoto <i>et al.</i> , 1976
	Tritón X	5300	> 5,0	idem
	Extracto de bilis	7500	< 0,2	idem

El ácido málico puede producirse especialmente por bioconversión del ácido fumárico; esta bioconversión es realizada por especies del género *Brevibacterium* y se ve obstaculizada por una reacción secundaria: la producción de ácido succínico. La tabla 5 muestra los tratamientos

efectuados en las células de *Brevibacterium* para aumentar la permeabilidad celular y su influencia en la producción de ácido succínico. Diversos estudios (Van Keulen *et al.*, 1981) muestran que la actividad de las células inmovilizadas puede ser aumentada por tratamiento con calor o por iones específicos, detergentes o solventes orgánicos.

El análisis de las actividades de los reactores de células vivas (R.C.V.) es más delicado. Marcipar *et al.* (1980) inmovilizaron las células de levadura por adsorción en un soporte de cerámica y pudieron observar un aumento en el índice de respiración de las células inmovilizadas de un factor comprendido entre 1,4 y 6,7. Estos hechos pueden explicarse por un aumento de los nutrientes accesibles, un medio ambiente que protege mejor a la célula o una modificación de la permeabilidad de la membrana.

Vijayalakshmi *et al.* (1979) obtuvieron resultados similares con células de levadura aprisionadas en un gel de ácido péctico y Holeberg y Margali (1982) con diversos sistemas de inclusión. Igualmente, Navarro y Durand (1977) notaron un aumento de la capacidad de fermentación con células adsorbidas en bolitas de vidrio poroso con pequeñas concentraciones de azúcar y períodos de fermentación cortos.

Comportamiento de reactores con células inmovilizadas

El resultado de este tipo de reactor se estima frecuentemente en tiempo de vida media de funcionamiento. La tabla 6 demuestra que el tiempo de vida media es algunas veces de varias semanas aproximadamente; sin embargo, podemos encontrar en la literatura duraciones mucho mayores, por ejemplo, 636 días para *E. coli* inmovilizada en carragenano acoplado con un glutaraldehído.

Este tiempo de vida media depende del modo de inmovilización escogido y de los tratamientos de las células durante esta inmovilización (ver tabla 6). Sin embargo, actualmente es imposible prever la eficacia de los tratamientos.

La eficacia de este tipo de reactor puede medirse igualmente en relación con un reactor de células no inmovilizadas. En comparación con un reactor de células no inmovilizadas, la primera ventaja de esta técnica de inmovilización es una fácil realización de un proceso continuo. Es bien conocido que un proceso continuo tiene como promedio de 1 a 5 veces más resultados que otro discontinuo; algunos autores citan incluso un factor 9 en lo que se refiere a la producción de alcohol (Aiba *et al.*, 1973).

Además, el mantenimiento de la actividad de las células inmovilizadas es mayor que el de las células libres, como se demuestra en la tabla 7.

Pudiéramos preguntarnos cuáles son las razones fundamentales de esta longevidad de las células inmovilizadas. La inmovilización crea un ambiente diferente; cambian los fenómenos de transferencia y todo esto parece favorecer la viabilidad celular.

En definitiva, la productividad de un reactor se mide en g de producto bioconvertido por ml de reactor, por unidad de tiempo. La tabla 8 muestra la influencia de las técnicas utilizadas en la productividad de un reactor de producción de etanol por medio de células inmovilizadas. El perfeccionamiento de la técnica de inmovilización permite alcanzar productividades particularmente altas y reduce los gastos de mantenimiento en comparación con los reactores de células libres. Esta tecnología logra entonces su objetivo: disminuir el precio de costo de la bioconversión.

Tabla 6
TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LOS REACTORES DE CELULAS INMOVILIZADAS

Organismo	Procesos de inmovilización	Tiempo de vida media	Referencia
<i>E. coli</i> (producción de ácido aspártico)	K. carragenano	50 días	Chibata, 1979
<i>E. coli</i> (producción de ácido aspártico)	K. carragenano + glutaraldehído	686 días	Chibata, 1979
<i>Streptomyces</i> sp. (isomerización de glucosa en fructosa)	Adsorción DEAE Sephadex	± 40 días	Snell, 1976
<i>Streptomyces</i> (isomerización de glucosa en fructosa)	Aglomeración por el glutaraldehído	± 40 días	Shigesada, 1975
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Inmovilización en un gel de carragenano	90 días	Wada <i>et al.</i> , 1980
<i>Brevibacterium flavum</i>	Bioconversión del ácido fumárico en ácido málico	± 50 días	Isao Takata <i>et al.</i> , 1980

Tabla 7
COMPARACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS CELULAS INMOVILIZADAS Y NO INMOVILIZADAS
(EXTRAIDO PARCIALMENTE DE KLEIN Y WAGNER, 1978)

Organismo	Actividad enzimática	Tiempo de vida media (en días)	
		Células libres	Células inmovilizadas
<i>E. coli</i>	aspartasa	11	120
<i>Brevibacterium</i>	fumarasa	6	53
<i>Candida tropicalis</i>	degradación del fenol	1	21

Sin embargo, además del sustrato hay dos factores que tienen una gran importancia económica en la producción de etanol; la productividad del reactor que acabamos de estudiar y la concentración de etanol del efluente. Este último factor permite reducir el costo de la operación de separación. La operación de bioconversión nunca debe estar disociada del proceso general, y con el fin de evaluar esta objeción, Shiatani y Yamane (1981) proponen comparar la productividad (en $g\ l^{-1}\ h^{-1}$ al 95% de bioconversión) con la concentración de etanol del efluente (ver figura 3). Muchas veces resulta difícil obtener estas cifras, pero la figura 3 demuestra una gran diversidad de resultados.

Tabla 8
PRODUCTIVIDAD DE DIFERENTES REACTORES,
UTILIZANDO DIVERSAS TECNICAS DE INMOVILIZACION

Organismo	Técnicas de inmovilización	Productividad	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 24858)	Células no inmovilizadas	1,75 g l ⁻¹ h ⁻¹	Sitton y Gaddy, 1980
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Células inmovilizadas (procedimiento no descrito)	24,90 g l ⁻¹ h ⁻¹	Ghose y Bandyo-Padhyay, 1980
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Células inmovilizadas en un gel	± 23 g l ⁻¹ h ⁻¹	Williams y Munecke, 1981
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Células inmovilizadas en un gel	21 g l ⁻¹ h ⁻¹	Gyo Heon Cho <i>et al.</i> , 1981
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Células adsorbidas en virutas de madera	4,8 g l ⁻¹ h ⁻¹	Rya <i>et al.</i> , 1982
<i>Zymomonas mobilis</i>	Adsorcion en vermiculita φ 0,3 mn	23 g l ⁻¹ h ⁻¹	Bland <i>et al.</i> , 1982
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Mezcla de alginato-gelatina	43 g l ⁻¹ h ⁻¹	Sivaraman <i>et al.</i> , 1982

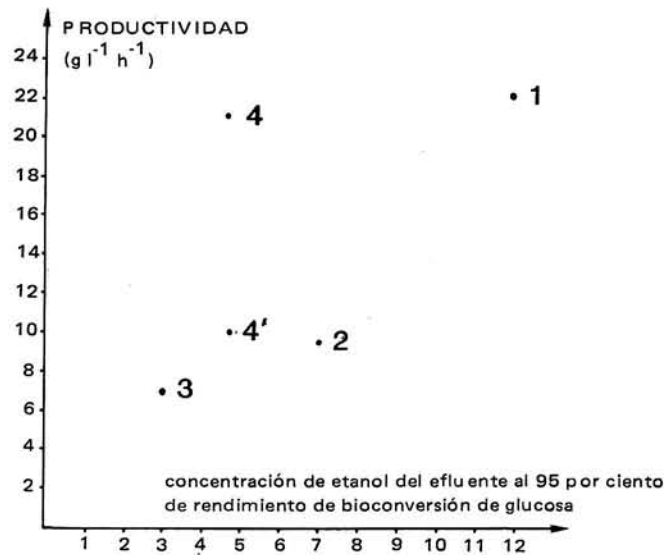


FIG. 3. Comparación de diversos procesos de fermentación alcohólica continua al 95% de rendimiento de conversión glucosa-etanol.

1. Wada *et al.*, 1981. Células inmovilizadas.
2. Ghose y Bandyopadhyay, 1980. Células inmovilizadas.
3. Greenshields y Smith, 1971. Levaduras floculantes en un reactor de lecho fluidizado.
4. Gyo Heon Cho *et al.*, 1981. Células inmovilizadas en un reactor de lecho fluidizado.
- 4'. Gyo Heon Cho *et al.*, 1981. Células inmovilizadas en un reactor en columna.

Aplicaciones industriales

La producción de ácido aspártico, de ácido málico, de etanol, de ácido acético, la isomeración de la glucosa y la hidrólisis de la rafinosa, se realizan actualmente por células inmovilizadas.

Tabla 9

APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS CELULAS INMOVILIZADAS

<i>Productos</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Biocatalizador</i>
Acido aspártico	Fumarato de Na	<i>E. coli</i>
Acido málico	Fumarato de Na	<i>Brevibacterium</i>
Fructosa	Glucosa	<i>Streptomyces</i>
Sucrosa + galactosa	Rafinosa	<i>Mortierella</i>
Etanol	Glucosa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Perspectivas y Conclusiones

En muchas aplicaciones, en realidad la célula es sólo un instrumento y no el producto terminado. Para permitir la integración de los procesos biotecnológicos a los esquemas de producción en los que el valor añadido del producto es pequeño, es fundamental permitir un reciclaje de la biomasa. Las técnicas de reciclaje de la biomasa recurren a las células inmovilizadas.

La inclusión en geles, la adsorción en soportes, la inmovilización en recipientes por unión covalente y las aglomeraciones celulares son las técnicas de inmovilización utilizadas con mayor frecuencia. Si el proceso sólo exige una simple bioconversión (por ejemplo, el caso de la conversión de ácido málico en fumárico), un reactor de células muertas aprisionadas o inmovilizadas por unión covalente podrá brindar ventajas económicas comparativas a las enzimas inmovilizadas. Por el contrario un reactor de células vivas aprisionadas o adsorbidas llevará a cabo una bioconversión de reacciones múltiples que requiera energía o cofactores.

Mediante estas técnicas, la producción de metabolitos de peso molecular poco elevado es objeto de realizaciones industriales y de investigaciones intensas.

En el futuro, la realización de reactores de células inmovilizadas para la producción de enzimas o de metabolitos elaborados no será ilusoria. En algunas publicaciones se exponen las tentativas realizadas en este sentido. Esta tecnología permitirá entonces que el material de fermentación evolucione: del clásico fermentador hacia el reactor de células inmovilizadas. Los problemas de transferencia de masa y especialmente las transferencias gaseosas plantearán importantes problemas tecnológicos.

Si la biotecnología pretende penetrar en sectores económicos de menor valor añadido (el agroalimentario, el sector energético y el químico, por oposición al farmacéutico), es imprescindible lograr un gran desarrollo de estas técnicas de la ingeniería bioquímica.

REFERENCIAS

- ABBOT, B. J. (1977). *Immobilized cells*, en: *Annual reports on fermentation*. Perlman, Ed. Academic Press, New York, vol. 1, 205-233.

- AIBA, S.; A. E. HUMPHREY y N. F. MILLIS (1973). *Biochemical Engineering*. 2da. ed. (Academic, New York).
- BLAND R. R.; H. C. CHEN; W. J. JEWELL; W. D. BELLAMY y R. R. ZALL (1982). *Continuous high rate production of ethanol by Zymomonas mobilis in an attached film expanded bed fermentor*. *Biotechnol. Letters*, **4**, (5), 323-388.
- CHIBATA, I. y T. TOSA (1977). *Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells*. *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 1-27.
- CHIBATA, I. (1978). *Paper M10 in Enzyme Engineering*. Vol. 4, ed. G. B. Brown et al., Plenum Press, New York.
- CHIBATA, I. (1979). *In immobilized microbial cells*. ACS Symposium Series, p. 187.
- DAUGULIS, A. J.; N. M. BROWN; W. R. CLUETT y D. B. DUNLOP (1982). *Production of ethanol by adsorbed yeast cells*. *Biotechnol. Letter*, **3** (11), 651-656.
- DURAND, G. y J. M. NAVARRO (1978). *Immobilized microbial cells*. *Process Biochem.*, septiembre, 14-23.
- FLETCHER, M. (1977). *The effects of culture concentration and age time and temperature on bacterial attachment to polystyrene*. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1-16.
- FREEMAN, A. y Y. AHARONOWITZ (1981). *Immobilization of Microbial Cells in cross linked, prepolymerised, linear polyacrylamide gels. Antibiotic production by immobilized Streptomyces clavuligerus Cells*. *Biotechnol. and Bioeng.*, **23**, 2747-2759.
- GHOMMIDH, C.; J. M. NAVARRO y G. DURAND (1981). *Acetic acid production by immobilized Acetobacter cells*. *Biotechnol. Letters*, **3**, 93-98.
- GHOSE, T. K. y K. K. BANDYOPADHYAY (1980). *Rapid ethanol fermentation in immobilized yeast cell reactor*. *Biotechnol. and Bioeng.*, **22**, 1489-1496.
- GREENSHIELDS, R. N. y E. L. SMITH (1971). *Tower fermentation systems and their applications*. *The chem. Engr.*, mayo, 1982-190.
- GYO HEON CHO; CHA YONG CHOI; YANG DO CHOI y MOON H. HAN (1981). *Continuous ethanol production by immobilized yeasts in a fluidized reactor*. *Biotechnol. Letters*, **3** (1), 667-671.
- HATTORI, R.; T. HATTORI y D. FURUSAKA (1972). *Growth of bacteria on the surface of anion exchange resin I: Experiment with batch culture*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 271-283.
- HOLCBERG, I. B. y P. MARGALITH (1981). *Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 133-140.
- TAKATA, I.; K. YAMAMOTO; T. TOSA e I. CHIBATA (1980). *Immobilization of Brevibacterium flavum with carrageenan and its application for continuous of L-malic acid*. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 30-36.
- JACK, T. R. y J. E. ZAJIC (1977). *The immobilization of whole cells*. *Adv. Biochem. Eng.*, **5**, 125-145.
- KLEIN, J. y F. WAGNER (1978). *Immobilized whole cells*. *Biotechnology-Proceeding First European Congress on Biotechnology 1978*. *Dechema Band*, **82**, No. 1693-1703, 142-162.
- KLEIN, J. y M. KLUDGE (1981). *Immobilization of microbial cells in polyurethane matrices*. *Biotechnol. Letters*, **3**, 65-70.
- YAMAMOTO, K.; T. TOSA; K. YAMASHITA e I. CHIBATA (1976). *Continuous production of L-malic acid by immobilized Brevibacterium ammoniagenes cells*. *European J. Appl. Microbiol.*, **3**, 169-183.
- LEBESQUE, Y. y P. DUBREUIL (1983). *Cellules immobilisées*. *Bio-Sciences*, **2** (7), 107-113.

- LEE, J. M.; M. L. SKOTNICKI y P. J. ROGERS (1982). *Kinetic studies on a flocculent strain of Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Letters, **4**, 615-620.
- MARCIPAR, A.; N. CLOCHET; L. BRACKENBRIDGE y J. M. LEBEULT (1980). *Immobilization of yeasts on ceramic supports*. Biotechnol. Letters, **1**, 65-70.
- MATTEAU, P. R. y J. N. SADDLER (1982). *Glucose production using immobilized mycelial associated α -glucosidase of Trichoderma E 58*. Biotechnol. Letters, **4** (8), 513-518.
- MESSING, R. A. y R. A. OPPERMAN (1979). *Pore dimensions for accumulating biomass I. Microbes that reproduce by fission or by budding*. Biotechnol. Bioeng., **21**, 49-58.
- MESSING, R. A.; R. A. OPPERMAN y F. B. KOLOT (1979). *Pore dimension for accumulating biomass II. Microbes that form spores and exhibit mycelial growth*. Biotechnol. Bioeng., **21**, 59-67.
- MICHAUX, M.; M. PAQUOT; B. BAIJOT y Ph. THONART (1982). *Continuous fermentation: Improvement of cell immobilization by zeta potential measurement*. Biotechnol. Bioeng. Symp., **12**, 475-484.
- NAVARRO, J. M. y G. DURAND (1977). *Modification of Yeast metabolism by immobilization onto porous glass*. Eur. J. Appl. Microbiol., **4**, 243-254.
- NAVARRO, J. M. (1981). *Immobilization de Saccharomyces uvarum par adsorption sur des granulés de brique*. Sciences des Aliments, **1** (4), 513-528.
- NAVARRO, J. M. y G. DURAND (1981). *Immobilization de Saccharomyces uvarum sur des billes de silice par liaison covalente*. Sciences des Aliments, **1** (4), 529-540.
- PAQUOT, M.; Ph. THONART; C. FLAMBERT; C. DEROANNE; L. FRAIPONT; R. COPPENS y A. MOTTET (1977). *Le potentiel Zeta: Possibilité d'application en industrie papetière et techniques de mesure*. Ann. Gembloux, **83**, 253-275.
- PARASCANDOLA, P. y V. SCARDI (1982). *Sucrose inversion by gelatin - Entrapped cells of yeast*. Biotechnol. Letters, **4**, 753-758.
- SCHERER, P.; M. KLUDGE y J. KLEIN (1981). *Immobilization of the methanogenic Bacterium ethanosarcina barkeri*. Biotechnol. and Bioeng., **23**, 1057-1065.
- SHIGESADA, S.; Y. ISHIMATSU y S. KIMURA (1975). Jap. Patent, **75**, 160475.
- SHIOTANI, T. y T. YAMANE (1981). *A horizontal packed. Bed reactor to reduce CO₂ gas holdup in the continuous production of ethanol by immobilized yeast cells*. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **13**, 96-101.
- SIVARAMAN, H.; B. SEETARAMA RAO; A. PUNDLE y C. SIVARAMAN (1982). *Continuous EtOH production by yeast cell immobilized in openpore gelation matrice*. Biotechnol. Letters, **4** (6), 359-364.
- SITTON, O. C. y J. L. GADDY (1980). *Ethanol production in an immobilized cells reactor*. Biotechnol. and Bioeng., **22**, 1735-1748.
- SNELL, R. L. (1976). U.S. Patent **3**, 974, 036.
- TANAKA, A.; I. JIN; S. KAWAMOTO y S. FUJUI (1979). *Entrapment of microbial cells and organelles with hydrophilic urethane prepolymers*. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **7**, 351-354.
- THONART, Ph.; C. DEROANNE; M. PAQUOT; B. BAIJOT y R. COPPENS (1977). *Les enzymes immobilisées: un avenir dans l'industrie agro-alimentaire*. Ann. Gembloux, **83**, 81-96.
- THONART, Ph.; M. CUSTINNE y M. PAQUOT (1982). *Zeta potential of yeast cells: Application in cell immobilization*. Enzyme Microb. Technol., **4**, 191-194.
- VAN KEULEN, M. A.; K. VELLENGA y G. E. JOOSTEN (1981). *Kinetics of the isomerization*

- of D-glucose into D-fructose catalysed by glucose isomerase containing Arthrobacter. Cells in immobilized and noimmobilized form.* Biotechnol. and Bioeng., **23**, 1437-1448.
- VIJAYALAKSHMI, M.; A. MARCIPAR; E. SEGARD y G. B. BROUN (1979). *Matrix-bound transition metal for continuous fermentation tower packing.* Ann NY Acad. Sci., **308**, 249-254.
- WADA, M.; J. KATO e I. CHIBATA (1980). *Continuous production of ethanol using immobilized growing yeast cells.* European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **10**, 275-287.
- WILLIAMS, D. y D. M. MUNNECKE (1981). *The production of ethanol by immobilized yeast cells.* Biotechnol. and Bioeng., **23**, 1813-1825.