

Biotecnología Tema 4: Nutrición de los microorganismos

A- La energía de los sistemas bioquímicos. Microorganismo y metabolismo energético.

Aerobiosis y anaerobiosis. Variación de energía libre reacciones bioquímicas en los seres vivos. Ligaduras ricas en energía.

B- Reacciones metabólicas de los microorganismos. Anabolismo y catabolismo. Concepto de carga de energía. Conceptos y ejemplos de vías metabólicas. Utilización de las mismas en el diseño de procesos fermentativos. Aplicaciones

C- Requerimientos nutricionales de los microorganismos. Concepto de medio de cultivo: costo, rendimiento en producto, optimización. Substratos para las fermentaciones industriales.

D- Factores ambientales que afectan el desarrollo de los microorganismos: efectos de la temperatura, pH, presión, salinidad, radiación, etc. Inmovilización de los microorganismos.

Nociones sobre el metabolismo

Cada célula desarrolla miles de reacciones químicas que pueden ser exergónicas (con liberación de energía) o endergónicas (con consumo de energía), que en su conjunto constituyen el METABOLISMO CELULAR. Si las reacciones químicas dentro de una célula están regidas por las mismas leyes termodinámicas ... entonces cómo se desarrollan las vías metabólicas?

1. Las células asocian las reacciones: las reacciones endergónicas se llevan a cabo con la energía liberada por las reacciones exergónicas.
2. Las células sintetizan moléculas portadoras de energía que son capaces de capturar la energía de las reacciones exergónicas y las llevan a las reacciones endergónicas.
3. Las células regulan las reacciones químicas por medio de catalizadores biológicos: ENZIMAS.

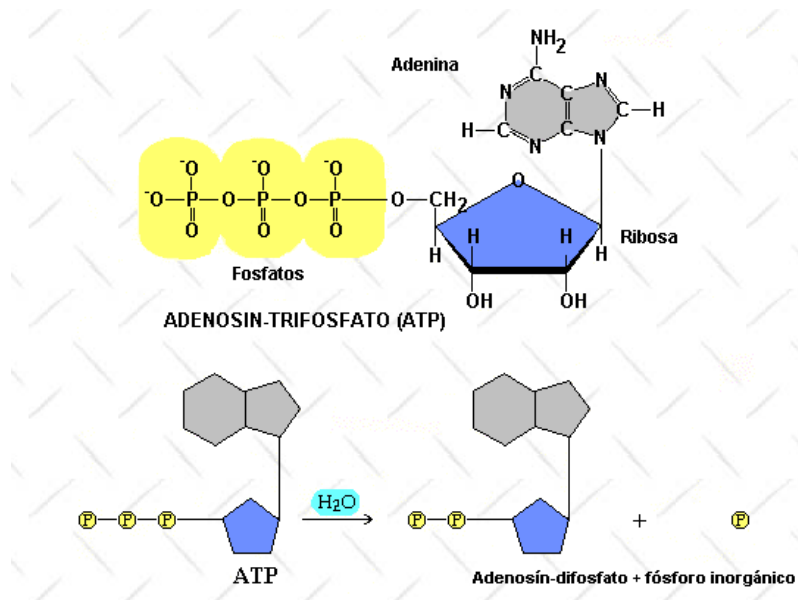
ATP: Reacciones acopladas y transferencia de energía

Las células acostumbran a guardar la energía necesaria para sus reacciones en ciertas moléculas, la principal es el: ATP, trifosfato de adenosina. Las células lo usan para capturar, transferir y almacenar energía libre necesaria para realizar el trabajo químico. Funciona como una MONEDA ENERGÉTICA.

La función del ATP es suministrar energía hidrolizándose a ADP y P_i . Esta energía puede usarse para:

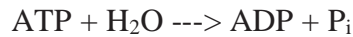
- obtener energía química: por ejemplo para la síntesis de macromoléculas;
- transporte a través de las membranas
- trabajo mecánico: por ejemplo la contracción muscular, movimiento de cilios y flagelos, movimiento de los cromosomas, etc.

Estructura del ATP: es un nucleótido compuesto por la adenina (base nitrogenada), un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfato.



Note que las cargas altamente ionizables de los grupos fosfatos hacen que se repelan unos de otros; por lo tanto resulta fácil separar uno o dos P_i (fosfatos inorgánicos, forma corta del HPO₄²⁻) del resto de la molécula.

La hidrólisis del ATP da:



El cambio de Energía libre. $\Delta G o' = -7,3 \text{ Kcal/mol} \rightarrow$ muy exergónica (el ΔG de una célula viva está en -12 Kcal/mol)

2. La hidrólisis del adenosín difosfato da: $\text{ADP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + \text{P}_i$

$\Delta G o' = -7,2 \text{ Kcal/mol} \rightarrow$ muy exergónica

Para sintetizar ATP (adenosín-trifosfato) a partir de ADP (adenosín-difosfato) se debe suministrar por lo menos una energía superior a 7,3 Kcal. Las reacciones que, típicamente suministran dicha energía son las reacciones de oxidación.



Síntesis del ATP

Las células requieren energía para múltiples trabajos:

- Sintetizar y degradar compuestos
- Transporte a través de las membranas (activo, contra el gradiente de concentración).
- Endocitosis y exocitosis.
- Movimientos celulares.
- División celular
- Transporte de señales entre el exterior e interior celular

Esta energía se encuentra en las moléculas de ATP, en las uniones químicas de alta energía de los fosfatos. Las moléculas de ATP se ensamblan en las mitocondrias a partir del ADP y los P_i con la energía tomada de la ruptura de moléculas complejas como la glucosa, que a su vez deriva de los alimentos ingeridos.

La Glucosa ($C_6 H_{12} O_6$) es el combustible básico para la obtención de energía, muchos otros compuestos sirven como alimento, pero casi todos son transformados a glucosa mediante una serie de numerosísimas oxidaciones graduales, reguladas enzimáticamente, al cabo de las cuales el oxígeno atmosférico (ingresado por respiración pulmonar) se une a los átomos de hidrógeno de las citadas moléculas para formar H_2O . En cada oxidación se liberan gradualmente pequeñas porciones de energía que son capturadas para formar el ATP. Si las oxidaciones son fueran graduales, la energía se liberaría de manera violenta y se dispersaría como calor.

En el proceso de obtener energía a partir de la glucosa hay tres procesos metabólicos:

GLUCÓLISIS: ocurre en el citosol, donde cada molécula de glucosa, con sus 6 átomos de Carbono, da lugar a dos moléculas de piruvato (de 3 átomos de Carbono). Se invierten dos ATP pero se generan cuatro.

RESPIRACIÓN CELULAR: ocurre cuando el ambiente es aerobio (contiene O_2) y el piruvato se transforma en dióxido de Carbono (CO_2) liberando la energía almacenada en los enlaces piruvato y atrapándola en el ATP.

FERMENTACIÓN: cuando el O_2 está ausente, ambiente anaerobio, en lugar de producir CO_2 se producen otras moléculas como el ác. láctico o el etanol.

REDOX

Cuando los grupos fosfatos se transfieren al ADP para formar ATP, se está almacenando energía. Otra forma es transferir electrones (e^-), las reacciones se denominan de oxidorreducción o reacciones redox.

La ganancia de uno o más e^- por un átomo, ión o molécula --> REDUCCIÓN

la pérdida de uno o más e^- por un átomo, ión o molécula --> OXIDACIÓN

Hay que tener en cuenta que una molécula se oxida o se reduce no solamente cuando intercambia e^- , sino también cuando intercambia átomos de Hidrógeno (no iones H), ya que involucra transferencia de electrones: $H = H^+ + e^-$.

Por ello una oxidación siempre ocurre simultáneamente con una reducción. Cuando un material se oxida, los e^- perdidos se transfieren a otro material, reduciéndolo.

Parte de la energía presente en el agente reductor (cuando dona e^-), se asocia con el producto reducido, por lo que las reacciones redox son otra forma de transferencia de energía.

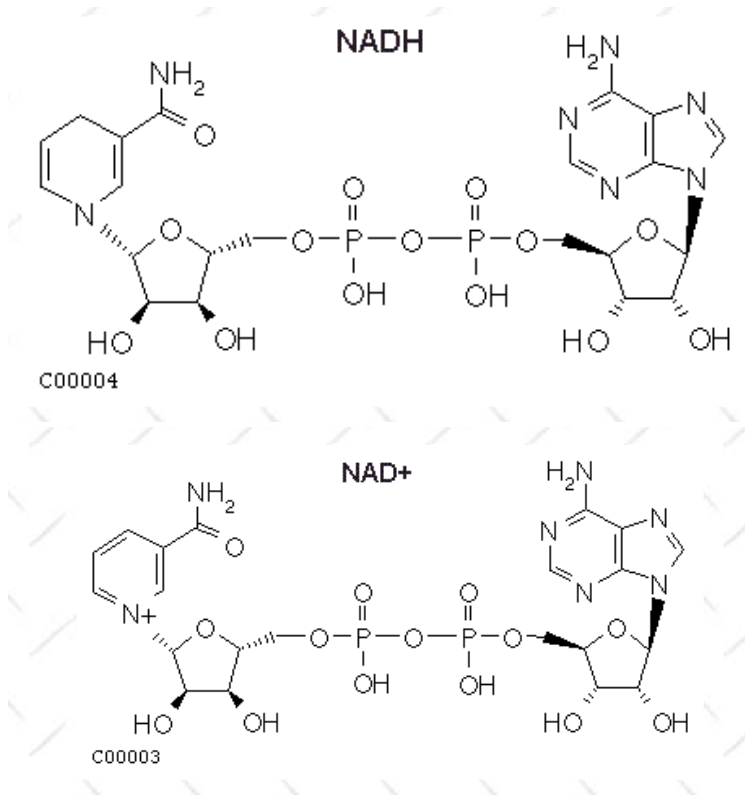
Cofactores Redox

Durante las principales reacciones redox del catabolismo de la glucosa intervienen dos moléculas intermediarias: NAD y FAD. Se denominan cofactores Redox: alternativamente se reducen y luego se oxidan.

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido. NAD^+ en su forma oxidada y $NADH + H^+$ cuando está reducido.

La concentración de NAD^+ en la célula es pequeña; por lo tanto debe reciclarse continuamente de la forma oxidada a la reducida y viceversa.

NAD^+ (oxi) + $2H^+$ + $2e^-$ ----> $NADH$ (red) + H^+



Estructura del NAD

FAD: flavina adenina dinucleótido. Transporta 2H, por lo que es FAD en su forma oxidada y FADH₂ cuando está reducido.

Otros cofactores Redox:

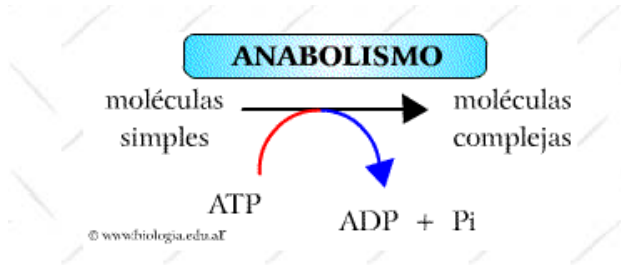
- Ubiquinona (Coenzima Q) -- transporta 2H
- Grupo Hemo (en los citocromos) -- transporta un electrón

Anabolismo y catabolismo

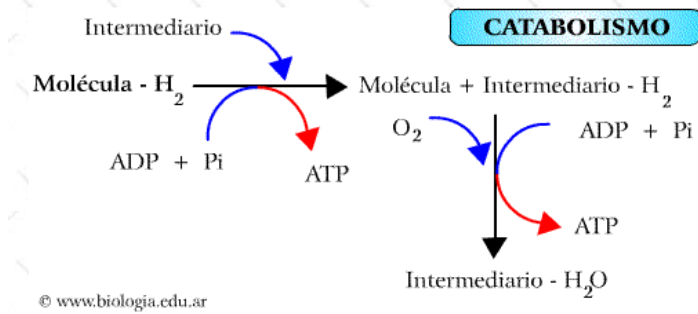
Denominamos metabolismo al conjunto de reacciones químicas de degradación (catabolismo) y de síntesis (anabolismo) de sustancias en un organismo. Las primeras liberan energía, las otras la consumen.

La actividad vital se manifiesta a través del metabolismo, las reacciones pueden ser de dos tipos:

Reacciones anabólicas: destinadas a formar moléculas propias, por lo general son reacciones de síntesis de moléculas complejas a partir de moléculas simples. Esta reacción requiere energía.



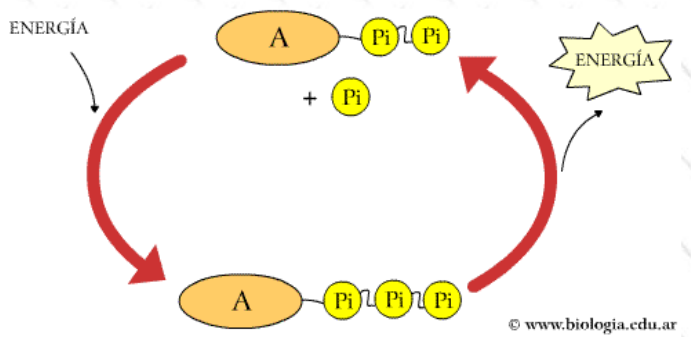
Reacciones catabólicas: implican la disgregación y oxidación de las biomoléculas, con su consecuente destrucción, obteniéndose energía en forma de ATP en el proceso. Esta energía es la usada en las reacciones anabólicas.



La mayor parte de los usos de la energía en las células vivas comprenden pares de reacciones asociadas con enlaces ATP. En la primera reacción la energía liberada por medio de una reacción exergónica produce la síntesis de ATP, en la segunda, la hidrólisis del ATP produce una reacción endergónica que requiere energía.

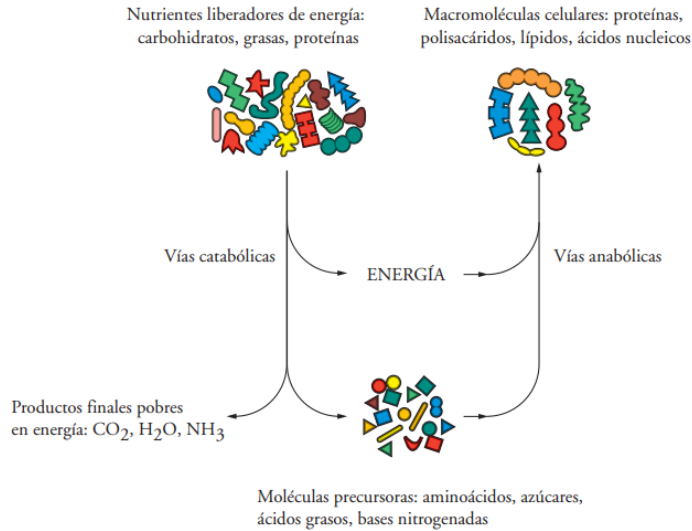
Cada reacción acoplada es catalizada por una enzima específica que coloca a las moléculas a los canales de energía de ATP de manera adecuada.

El ATP es usado como donante de energía en muchas reacciones anabólicas (de síntesis) acoplándose a las mismas en manera tal que el ΔG sea negativo y la reacción se produzca espontáneamente.



Las células y la mayoría de los microorganismos extraen de los compuestos orgánicos la energía que precisan para el mantenimiento de sus estructuras y funciones. En las vías catabólicas, la degradación de compuestos orgánicos en moléculas más pequeñas libera energía; una parte será almacenada en la forma de ATP (trifosfato de adenosina), y la restante se disipará como calor.

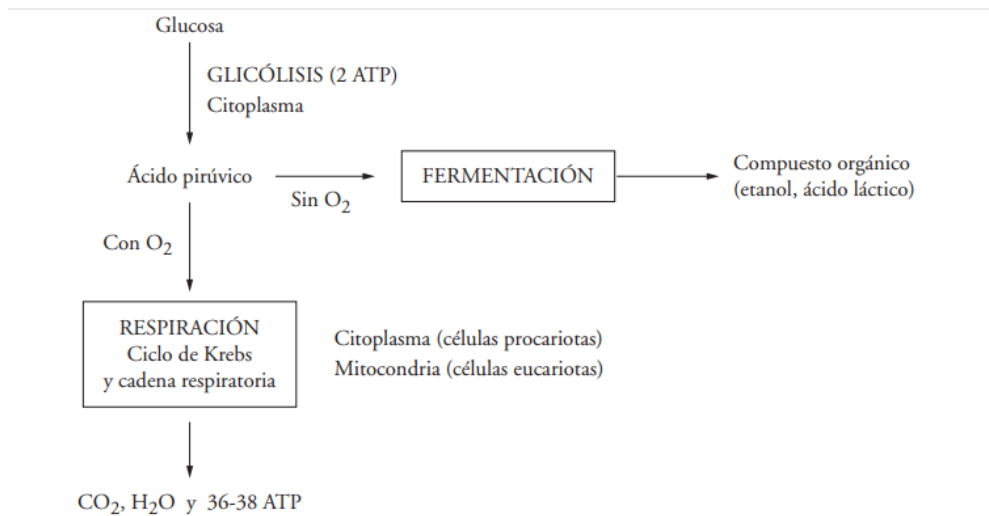
FIGURA 2. Anabolismo y catabolismo



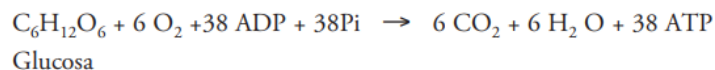
Las principales vías catabólicas son la respiración y la fermentación (Figura 3). Tanto la cantidad de energía liberada como los productos finales difieren si la oxidación del compuesto orgánico es total o parcial. En la glicólisis, la glucosa es degradada hasta una molécula de tres carbonos, el piruvato. En presencia de oxígeno, la entrada del piruvato en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa permiten la transformación total de la glucosa en CO_2 y H_2O , liberando una gran cantidad de energía como ATP (respiración aerobia).

A través de la reducción del piruvato o de alguno de sus derivados (fermentación), varios microorganismos generan otras sustancias orgánicas: acetona, butanol, etanol, ácido láctico, ácido acético, glicerol, etc. Estas reacciones ocurren generalmente en ambientes donde el sustrato es abundante, obteniéndose una pequeña cantidad de energía. Dependiendo de las condiciones ambientales, es decir, de la presencia o ausencia de oxígeno, algunas levaduras y bacterias (así como las células musculares) pueden respirar o fermentar.

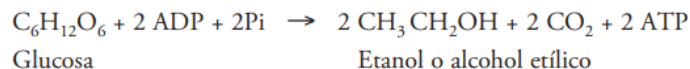
La respiración y algunas fermentaciones se representan mediante ecuaciones, como las siguientes:



Respiración aerobia:



Fermentación alcohólica (levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas bacterias):



Fermentación láctica (bacterias como *Streptococcus* y *Lactobacillus*):

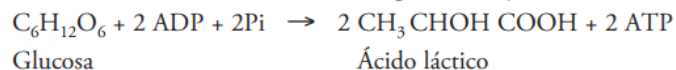


FIGURA 3. Respiración y fermentación

En la respiración, donde el último aceptor de electrones es el oxígeno, la oxidación de la glucosa se completa hasta llegar a CO₂ y H₂O, produciendo 36 a 38 moléculas de ATP. En la fermentación, el último aceptor de electrones es el piruvato o algún otro derivado, produciendo 2 ATP.

En el metabolismo los caminos de degradación se cruzan con los de síntesis.

Hay otras moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) que pueden entrar en determinados puntos de la vía catabólica de la glucosa, convergiendo para la producción de energía y de pequeñas moléculas simples (CO₂, H₂O y NH₃).

Inversamente, algunos de los compuestos intermediarios del catabolismo son los puntos de partida de vías anabólicas.

Sin embargo, las vías metabólicas no son reversibles: el camino seguido en la degradación de una sustancia es parcial o totalmente diferente al camino de síntesis correspondiente, pudiendo inclusive ocurrir en compartimientos celulares diferentes. Esta separación facilita la regulación enzimática del metabolismo, que ocurre con el menor desperdicio de materia y energía.

Metabolismo primario y secundario

Además de las vías metabólicas primarias, que son comunes a todos los microorganismos, existen vías metabólicas secundarias específicas. La activación de unas u otras depende del microorganismo y de las condiciones en que crece, sea en su ambiente natural o de cultivo. Los metabolitos primarios están relacionados con el crecimiento de los microorganismos y la transformación de los nutrientes en biomasa; los principales ejemplos son el etanol, el ácido láctico y los aminoácidos. Los metabolitos secundarios no son necesarios para el metabolismo microbiano, pero permiten la supervivencia en ambientes extremadamente competitivos, donde los nutrientes son escasos. Son metabolitos secundarios los antibióticos, los alcaloides, los pigmentos y algunas enzimas y toxinas. Cuando los microorganismos se multiplican en un medio con una cantidad limitada de nutrientes, la población pasa por diversas fases (estas se representan en la Figura 4, A).

- Fase lag o de latencia: período de adaptación en el que, a pesar de no dividirse, los microorganismos sintetizan enzimas y otros compuestos celulares.
- Fase log o logarítmica: la población crece de manera exponencial, sintetizando numerosos metabolitos primarios.
- Fase estacionaria: debido al agotamiento de los nutrientes y a la acumulación de productos de excreción, algunas células mueren mientras que otras logran dividirse. Hacia el final de la fase log y el inicio de la fase estacionaria comienzan a sintetizarse los metabolitos secundarios.
- Fase de declinación o muerte: sin la renovación de los nutrientes, las células mueren en un tiempo variable.

Para desarrollar un bioproceso se deberá elegir al microorganismo en función de sus vías metabólicas, y las condiciones de cultivo dependerán de si el producto deseado es un metabolito primario o un metabolito secundario.

LOS PROCESOS FERMENTATIVOS Y LA INDUSTRIA

El primer proceso fermentativo industrial fue el de la producción de vinos y cervezas. En el transcurso del siglo XX, la expansión de la microbiología industrial y el desarrollo de procesos basados en el metabolismo microbiano posibilitaron la producción de diversas sustancias (acetona, butanol, etanol, ácido cítrico, antibióticos, etc.). Actualmente, las fermentaciones se aplican tanto en la producción de alimentos y aditivos, productos químicos y medicamentos, como en el tratamiento ambiental.

Por motivos históricos, el término “procesos fermentativos” aún se usa en biotecnología para referirse a cualquier proceso microbiano realizado a gran escala, sea este una fermentación o no. Y el término fermentador se usa como sinónimo de biorreactor, refiriéndose al recipiente donde ocurre el proceso. Ya sean tradicionales o renovados por las posibilidades de la manipulación genética, los bioprocesos o fermentaciones” persiguen uno de los siguientes objetivos: multiplicación de microorganismos para la obtención de biomasa (levaduras,

rizobios, proteína unicelular); obtención de productos microbianos (antibióticos, aditivos, alcohol, enzimas, etcétera); conversión de una sustancia en otra por acción de microorganismos o enzimas (transformación de esteroides, isomerización de glucosa a fructosa, etcétera); limpieza de un solvente (tratamiento de efluentes, transformación de un contaminante en alguna sustancia fácilmente degradable, etcétera)

Un proceso fermentativo comienza con la elección del agente biológico adecuado (microorganismo o enzima), continúa con la transformación de la materia prima, en condiciones que pueden exigir esterilización, aireación y control del proceso (pH, temperatura, etc.), y finaliza con la separación y purificación del producto final (Figura 1). Cabe destacar que las células animales y vegetales también pueden cultivarse en gran escala, como se verá en el próximo capítulo, junto con las técnicas de cultivo de tejidos.

Para que el proceso sea económicamente viable, se debe contar con una materia prima barata, un procedimiento que pueda ser controlado y una forma de recuperar el producto que simplifique al máximo su purificación

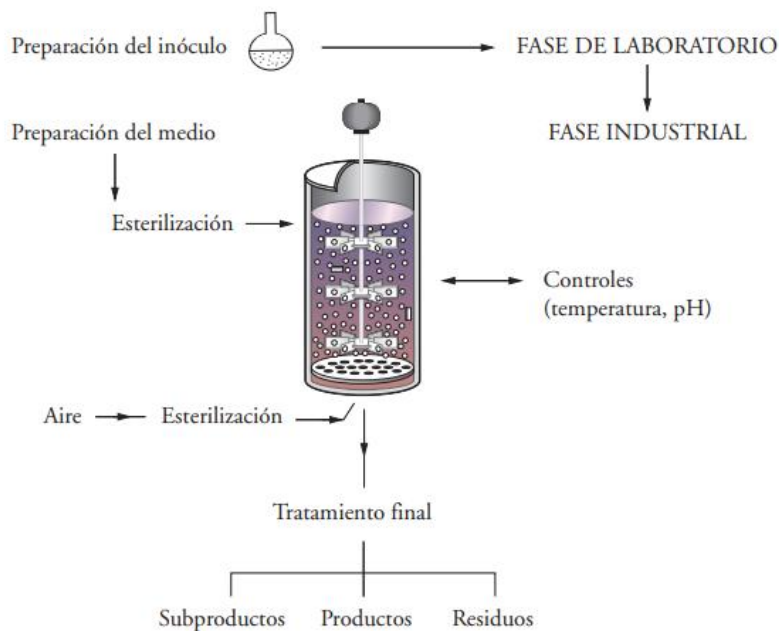


FIGURA 1. El proceso fermentativo

El origen de las cepas industriales

Para que el cultivo en un fermentador resulte económicamente viable, el microorganismo debe ser capaz de multiplicarse rápidamente, sintetizando una gran cantidad de productos a partir de una materia prima barata. Existen bancos y colecciones de cultivos especializados que venden cultivos puros de microorganismos, genéticamente estables y aptos para el cultivo en gran escala.

A pesar de haber sido aisladas del medioambiente, las cepas industriales difieren sustancialmente de las cepas originales, en virtud de una serie de alteraciones genéticas

(mutaciones, recombinaciones) obtenidas en el laboratorio. Algunas vías metabólicas, especialmente las del metabolismo secundario, pueden haber sido alteradas, con la intención de aumentar al máximo la síntesis del producto deseado y de evitar la producción de algunas sustancias innecesarias o indeseables. Debido a esas alteraciones genéticas y metabólicas, las cepas industriales sobreviven poco tiempo en el medioambiente.

La producción de medicamentos y vacunas, así como la de ingredientes de alimentos y cosmética, exigen medidas de seguridad muy estrictas. Las cepas utilizadas no deben ser patógenas ni producir toxinas. Como los microorganismos constituyen un grupo biológico muy diverso y aún poco conocido, existen muchas expectativas en relación a la prospección de cepas en ambientes extremos o poco usuales. No es necesario desarrollar un proceso nuevo para cada microorganismo que presente alguna característica comercial interesante; la tendencia actual es transferir los genes correspondientes a alguno de los microorganismos conocidos y adaptados a las condiciones industriales.

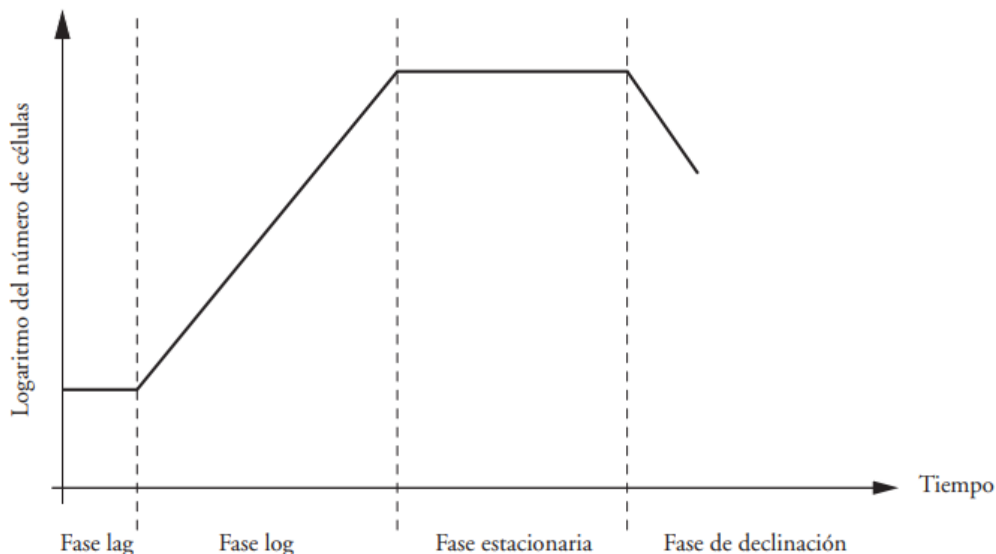
Medios de cultivo y materia prima

Si se quiere cultivar un microorganismo, habrá que incluir en el medio a todos los nutrientes necesarios, en concentraciones adecuadas. El diseño varía en función del microorganismo y del objetivo del proceso pero, en general, la composición de un medio de cultivo de uso en el laboratorio incluye: agua; una fuente de energía y de carbono: glucosa, almidón, etc.; una fuente de nitrógeno inorgánica (sulfato de amonio, nitrato de potasio, etc.), orgánica (asparagina, succinato de amonio, glutamato, urea, etc.)

La producción de metabolitos

A. Las fases de crecimiento de una población

Las células y los metabolitos primarios se producen a lo largo de la fase log; los metabolitos secundarios, hacia el final de la fase log e inicio de la fase estacionaria



B. La producción de metabolitos primarios y secundarios

Los nutrientes del medio permiten la multiplicación celular y la formación de metabolitos primarios, que pueden ser utilizados por las células para sintetizar metabolitos secundarios. Estos pueden sintetizarse también directamente a partir de alguna sustancia del medio compleja (harina de soja, peptona, etc.); sales minerales, tales como fosfato de potasio (K_2HPO_4 o KH_2PO_4), sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cloruro de calcio ($CaCl_2$), etc.; micronutrientes: hierro, zinc, manganeso, cobre, cobalto, molibdeno.

Para una explotación comercial, los medios definidos son sustituidos en la industria por materias primas de bajo costo, como por ejemplo, suero de leche, melaza de caña o de remolacha, almidón de maíz, etc. En algunos casos, la materia prima se trata previamente con métodos físicos o químicos. En un proceso enzimático, el medio deberá llevar, además del sustrato adecuado, los elementos necesarios para que la enzima pueda ejercer su actividad catalítica (precursores, co-factores, etcétera).

LOS DIFERENTES TIPOS DE BIOPROCESOS

Los procesos tradicionales

Algunas fermentaciones se realizan sobre residuos agroindustriales o forestales, como granos, paja, bagazo, aserrín, etc. Este tipo de fermentación en medio sólido humedecido se utiliza en la producción de alimentos, como por ejemplo, el levado de la masa en la panificación, la maduración de quesos por acción de hongos (roquefort, gorgonzola), el cultivo de hongos, la fermentación del cacao, del café, del té, etc. En Asia, estos procesos son la base, a través de la preparación del koji, de alimentos tradicionales como el tofu, el miso, el shoyu y el sake.

En algunos lugares estas fermentaciones se hacen artesanalmente dentro de hojas de plátano, cestas de bambú, o “montones”, pero actualmente también hay equipos sofisticados con bandejas, columnas, frascos y tambores rotativos, algunos totalmente automatizados (Figura 5).

Una variante interesante del proceso fermentativo es la producción tradicional del vinagre (proceso francés o de Orleáns) en barriles de roble.

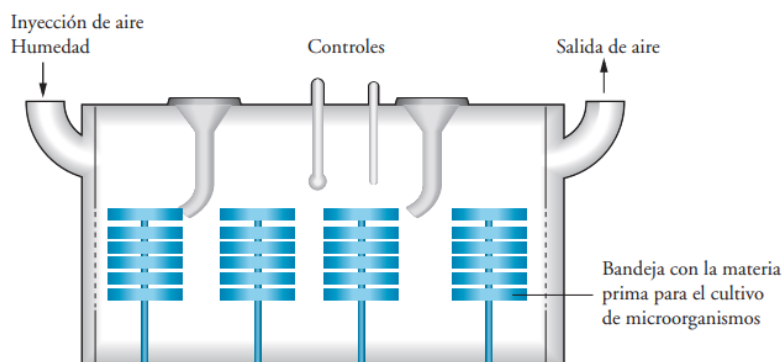


FIGURA 5. Modelo de biorreactor para fermentaciones en fase sólida

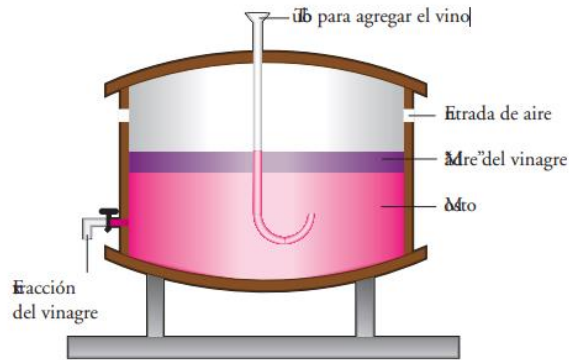


FIGURA 6. Un proceso tradicional, la producción de vinagre (Método de Orleans)

El vino se inocula con bacterias del género *Acetobacter*, que forman en la superficie la “madre del vinagre”, una película que flota, sostenida por una cuadrícula de madera que impide que se hunda. Así, el microorganismo crece en la superficie, donde se encuentra en contacto, al mismo tiempo, con el medio nutriente líquido y con el aire. Este proceso brinda excelentes vinagres, pero es lento y requiere mucho espacio, porque la capacidad de cada barril solo llega a 200 litros (Figura 6). Existen otros procesos similares, llevados a cabo por hongos y que forman una película de micelio en la superficie del líquido.

Los procesos sumergidos

Actualmente, la mayoría de los procesos industriales se desarrollan en cubas de vidrio o acero. El medio de cultivo ocupa aproximadamente el 75% de la cuba, ya que a veces es necesario inyectar aire, y en muchas fermentaciones se forma espuma. Los agentes biológicos se encuentran sumergidos en el medio.

El diseño del biorreactor debe adecuarse al objetivo del proceso, teniendo en cuenta la esterilización del sistema, la aireación y homogenización del medio, el agregado de nutrientes y de aditivos antiespuma, el mantenimiento del pH, etc. Los modelos de fermentadores más utilizados con microorganismos son los que cuentan con aireación y agitación mecánica, porque facilitan la distribución de los nutrientes en la cuba. Tienen el inconveniente de generar calor, y este debe ser eliminado mediante la circulación de agua fría (Figura 7).

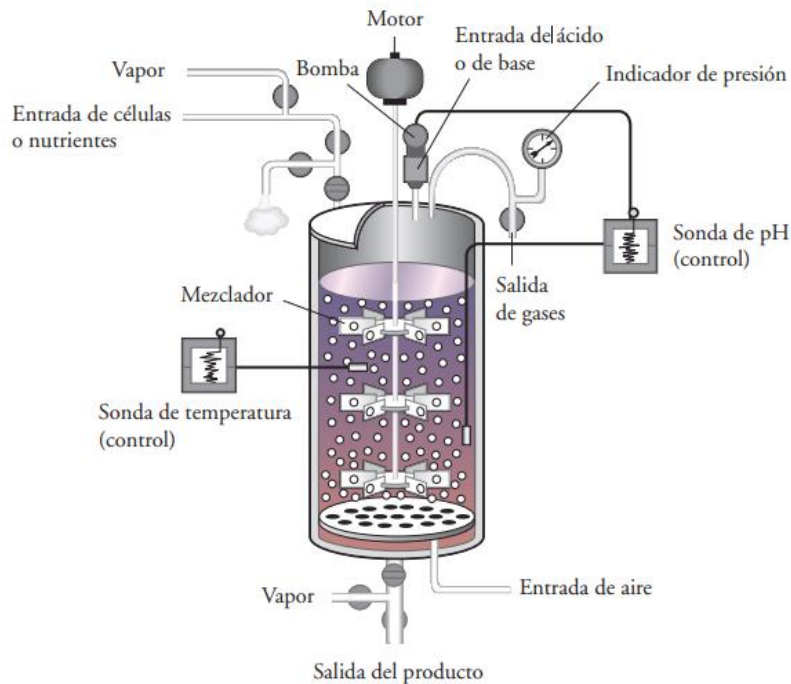


FIGURA 7. Modelo de biorreactor para fermentaciones sumergidas. El crecimiento de la población microbiana y la cantidad de producto formado son monitoreados a partir de muestras extraídas durante el proceso.

En algunos biorreactores la homogenización depende de la inyección de aire. Los modelos en columna o torre pueden llegar a tener una gran capacidad. Es el caso de los fermentadores donde se produjo durante un tiempo la proteína unicelular (o SCP, por sus siglas en inglés, *Single Cell Protein*), de la Imperial Chemical Industries (ICI) del Reino Unido, o el de los biorreactores utilizados en la producción de etanol.

Los sistemas sumergidos son apropiados para el cultivo de microorganismos libres, pero resultan poco económicos cuando se trabaja con células o enzimas caras. Estas pueden ser inmovilizadas por unión a un soporte inerte o por inclusión dentro de un polímero que permita el contacto con el medio de cultivo (Figura 8). Además de simplificar la purificación del producto, la inmovilización posibilita la reutilización de las células o de las enzimas, que permanecen dentro del biorreactor, generalmente pequeño.

Si el proceso exige asepsia, esta puede conseguirse mediante: la esterilización del medio (dentro o fuera del fermentador); la desinfección o esterilización del equipamiento por inyección de vapor o mediante el calor generado por serpentinas. Esta última medida se aplica también a todos los conductos de entrada y de salida de las válvulas correspondientes; la esterilización del aire con filtros adecuados.

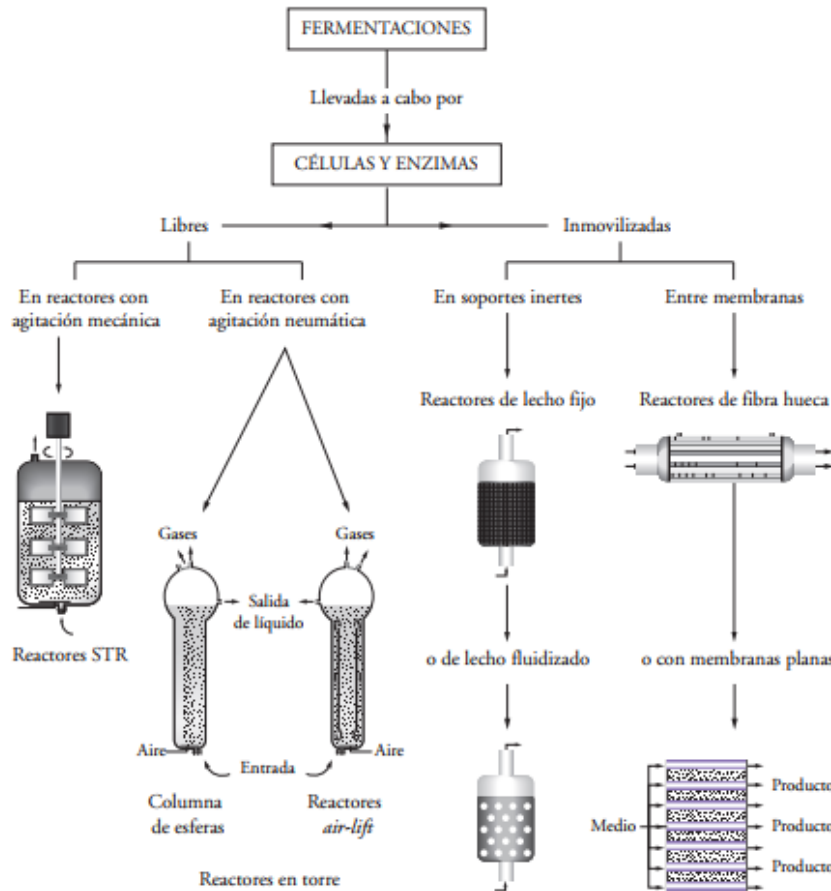


FIGURA 8. Fermentaciones sumergidas, agentes biológicos y biorreactores. Los biorreactores se adaptan a las necesidades de cada agente biológico y de cada tipo de proceso.

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Los microorganismos requieren para su nutrición:

Fuente de Carbono

Fuente de Nitrógeno

Fuente de fósforo

Fuente de oxígeno (u otro aceptor de electrones)

Fuente de Potasio

Fuente de elementos minoritarios y de oligoelementos que pueden ser Azufre, Magnesio, Calcio, Manganeso, Hierro, Zinc, Cobre.

Elementos traza: vitaminas, factores de crecimiento, cobalto, molibdeno, dependiendo de los microorganismos.

Entrada de sustancias a la célula

Antes de que las sustancias nutritivas puedan ser transformadas en el citoplasma tienen que ser atravesadas por las capas que limitan la célula. La pared celular no ofrece ninguna resistencia notable a las moléculas pequeñas ni a los iones, pero evita el paso de las

macromoléculas. El verdadero límite de la célula, responsable del transporte selectivo de las sustancias nutritivas al interior de la célula, es la **membrana citoplasmática**.

Muchas sustancias nutritivas (como electrolitos y anelectrolitos) se acumulan en la célula en concentraciones superiores a aquellas que presentan en el medio externo; la concentración interior puede ser centenares de veces superior. Sólo se produce ésta acumulación cuando la célula dispone de energía (por oxidación o fermentación). Tiene que pensarse en un mecanismo de bombeo, mediante el cuál los sustratos son transportados activamente, con el consiguiente consumo de energía al interior de la célula en contra de un gradiente de concentración. Lo que se debe observar es la existencia de un **agente transportador** entre las capas externa e interna.

La *entrada de sustancia es específica*: sólo entran aquellos sustratos para los que se dispone de un mecanismo de transporte. En muchos casos, se ha puesto de manifiesto que el aparato transportador tiene carácter enzimático, es decir, puede ser inducido, es específico del sustrato y sólo se forma en las condiciones adecuadas para la síntesis proteica, entonces se habla de **permeasas**. La hipótesis encuentra su mejor fundamento en aquellas células que son **crípticas** para un sustrato determinado, esto es, disponen de todos los enzimas necesarios para la transformación del sustrato sin que éste pueda entrar en la célula.

Algunos sustratos y muchas sustancias extrañas a la célula penetran en ésta sin que sean transformados en forma activa. Frente al transporte activo tienen que considerarse dos tipos de permeabilidad que permiten el ingreso de sustancias hasta que la concentración en el interior iguale a la de la solución externa y que no requiere energía alguna (entrada pasiva de sustancias): se llama difusión simple a la entrada específica de sustancias en la célula.

El mecanismo denominado **difusión facilitada** se diferencia del transporte activo sobre todo por su independencia de la energía del metabolismo y por la dependencia que presenta la velocidad de transporte de la concentración de la sustancia que tiene que transportarse en la solución externa; mientras que en el caso del transporte activo la velocidad de transporte ya alcanza su máximo para concentraciones bajas en el exterior, en el caso de la entrada pasiva la velocidad de transporte va aumentando lentamente al aumentar la concentración externa. La difusión facilitada es también un proceso específico y debe llevarse a cabo por un medio de transporte.

TIPOS DE NUTRICIÓN

Para describir los tipos de nutrición tendremos en cuenta también las fuentes de energía, el dador de H y la fuente de C.

- *Fotótrofos* (fotosintéticos), son los organismos capaces de utilizar la radiación electromagnética (luz) como fuente de energía para su crecimiento.
- *Quimiótrofos* (quimiosintéticos), ellos obtienen la energía a partir de reacciones de óxido-reducción de los sustratos utilizados como sustancias nutritivas.

- *Litótrofos*, son capaces de utilizar dadores inorgánicos de H (H_2 , NH_3 , H_2S , Fe^{++} , CO y otros).
- *Organótrofos*, todos los organismos que utilizan compuestos orgánicos de como dadores de H.
- *Autótrofos*, son todos aquellos microorganismos capaces de obtener la mayor parte del carbono celular por fijación de anhídrido carbónico.
- *Heterótrofos*, los que obtienen el carbono celular de compuestos orgánicos.
- Con relación a la convivencia de microorganismos con plantas y animales superiores y con otros microorganismos podemos clasificarlos:
- *Simbiosis*, es la unión de organismos de especies distintas que viven en contacto espacial siempre que los dos miembros salgan beneficiados.
- *Comensalismo*, cuando el beneficio mutuo es menos ostensible, pero sin perjuicio para ninguno de los miembros.
- *Parasitismo*, sólo uno de los miembros sale beneficiado, el parásito, mientras que el otro, el huésped, sale perjudicado pudiendo ser eliminado. Los *parásitos facultativos* pueden crecer en ausencia del huésped; los *parásitos obligados* dependen de uno o más huéspedes, no pueden vivir fuera del huésped, de sus tejidos (parásitos tisulares) o fuera de sus células (parásitos celulares).
- *Saprotitismo*, constituye la alimentación a partir de materia orgánica muerta, es un tipo especial del tipo heterótrofo.

MEDIOS DE FERMENTACION

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos.

Como ya se explicó, los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes: a) Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg; b) Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro; y c) Factores de crecimiento, que están constituídos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc..

Los medios pueden clasificarse, considerándo la naturaleza química de los componentes, en 1) medios sintéticos o medios químicamente definidos, y 2) medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de

levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc. que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable.

En el estudio de los medios de cultivo es conveniente considerar en primer lugar el diseño para tratar a continuación la formulación y optimización de los mismos.

Diseño

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas. Otros aspectos que son también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previos y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos, como es el caso de la importancia del anión P_04 , según ya se explicó. Trataremos especialmente de los tres primeros.

Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO_2 como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El O_2 es uno de los oxidantes más comunes en el metabolismo energético. En la ausencia del O_2 , el N_03 o S_04 son utilizados como aceptores de electrones por algunas bacterias. Las bacterias metanogénicas son auxótrofos anaerobios que utilizan H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 para obtener energía. Otras protistas obtienen su energía, en condiciones anaerobias por reacción de óxido-reducción realizadas sobre compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía.

Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular.

Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de la célula. En algunos casos se requieren también péptidos de histidina.

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de P_04H y S_04 (o aminoácidos azufrados). El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes.

Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios

componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías: a) Los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y b) los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I. En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidas cualitativamente. A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de éstos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a "strees", como por ejemplo por aumento de temperatura por encima de un valor óptimo.

Los requerimientos de factores de crecimiento comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantotémico, niacina, etc., que representan para muchas bacterias y levaduras factores esenciales en los medios sin los cuales no se produce crecimiento celular. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de co-enzimas. Otros factores de crecimiento son las purinas, poliaminas, putrescinas, etc.

En algunos procesos existe la necesidad de efectuar otros agregados, a parte de los nutrientes requeridos por los microorganismos y que representan los requerimientos específicos del proceso considerado.

Un ejemplo es el caso de los precursores que constituye la base de una molécula que debe ser sintetizada por el microorganismo, como el ácido fenil acético para la penicilina. Otro ejemplo es el agregado de ciclo dextrinas en procesos de producción de Bordetella pertussis que puede actuar como complejante de inhibidores de crecimiento celular. El agregado de cloruros o bromuros en el caso de algunos antibióticos como cloro y bromotetraciclinas, tetraciclinas producidas por el Streptomyces aureofaciens, responde también a requerimientos específicos para inhibir la síntesis de productos no deseados, como ocurre también con el agregado de mananos y barbitúricos en la producción de estreptomicina por S. griseus.

El agregado de sulfato, en el proceso de fermentación alcohólica, que favorece la formación de glicerol, es otro ejemplo de un requerimiento específico.

El diseño correcto tiene que ver con las características bioquímicas propias y evolución de los parámetros de cada proceso. Por ejemplo, un proceso caracterizado por un descenso continuo de pH, debido al uso de una sal de amonio como fuente de nitrógeno, obliga a considerar en su diseño algún agregado que no corresponda a una exigencia nutricional, como es el caso del control de pH del mismo. Este puede efectuarse por agregados al medio de agentes "buffer" como mezclas de fosfatos o de carbonato de calcio o como más generalmente se hace, con agregados periódicos de soluciones alcalinas que pueden efectuarse en forma más conveniente mediante un control automático de pH. El diseño de un medio específico para la producción de ácido cítrico debe considerar la influencia negativa que para el proceso tiene un exceso de hierro en su composición; por lo tanto dicho medio debe diseñarse de manera tal que su preparación (a partir de diversas materias primas)

considere una eliminación total del hierro y posterior agregado del mismo en cantidades controladas.

Disponibilidad de los componentes

Aparte de su presencia en el medio de cultivo, los nutrientes deben estar disponibles para ser usados por la célula.

Es importante mencionar la disponibilidad correspondiente a iones metálicos cuya concentración es modificada por quelación, ya que muchos constituyentes del medio y productos del metabolismo actúan como agentes complejantes o precipitantes, _por ejemplo aminoácidos, hidroxiácidos, hidróxidos, y los aniones PO_4 y CO_3^{2-} .

Por lo tanto, con el objeto de controlar su concentración y prevenir la precipitación de los iones metálicos, es necesario o esencial quelar el ion mediante algún agente quelante agregado, como el EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético).

En medios complejos de uso industrial la situación es aún más complicada ya que existe una gran variedad de sustancias orgánicas, las cuales pueden quelar, secuestrar o absorber iones metálicos reduciendo la concentración iónica disponible. Entre dichos compuestos podemos citar: aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, polifenoles, polifosfatos y materiales coloidales.

En general se puede decir que todo material insoluble presente en el medio de cultivo va a tener una determinada capacidad de unión a elementos metálicos disminuyendo su concentración efectiva, como ocurre también con los aminoácidos y proteínas que tienen los grupos reactivos R-COO^- , RHN^- , RS^- , RO , que son los más importantes. La dinámica de formación del complejo está determinada por la constante de equilibrio de formación del complejo metal-ligando, y por la velocidad a la cual el equilibrio es obtenido. La constante de equilibrio para la formación del complejo del ión metálico (M) con el ligando (L) se expresa de la siguiente forma:

$$K = \frac{[\text{M L}]}{[\text{M}] [\text{L}]}$$

Donde las cargas del catión y ligando están omitidas. El valor de K es prácticamente independiente de la naturaleza del ligando, ya que depende particularmente del ion metálico. Se puede hacer una lista de términos de valores decrecientes de la constante de equilibrio como sigue: $\text{Fe}^{+3} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ >$ y de la cual se puede deducir, por ejemplo, que el ion Cu^{2+} estará fundamentalmente como complejo mientras que Ca^{2+} , Na^+ y K^+ estarán en forma de iones metálicos libres.

Por otro lado la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio tiene también una serie de orden decreciente de velocidades de acuerdo al ion: $\text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. De ambas consideraciones surge por ejemplo que cuando se alcanza el equilibrio el ion Ca^{2+} estará casi siempre libre para ser utilizado y si está complejo se hará

rápida disponible, en cambio el Mg^{2+} estará generalmente libre pero si está complejo se hará disponible muy lentamente. En la misma forma se puede deducir que el Co^{2+} estará fundamentalmente en forma complejada siendo disponible además a muy baja velocidad. Por esa razón ese elemento es potencialmente limitante.

En conclusión, es importante tener en cuenta la naturaleza de los compuestos orgánicos que tienen capacidad para actuar como ligandos, y sobre todo el ion metálico considerado, ya que la concentración libre de éste es lo que interesa.

Materias primas fundamentales

Los componentes empleados en la industria de fermentación son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Si tenemos en cuenta que el costo de los nutrientes representa entre el 10 y el 60% del costo total de muchos productos obtenidos por fermentación, se hace prioritario disminuir el costo de los medios.

Las materias primas más importantes corresponden a fuentes de carbono y de nitrógeno. Las fuentes de carbono pueden ser: 1) Hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina; 2) Alcoholes como el glicerol y manitol; y 3) Hidrocarburos como hexadecano, octadecano y otros. Son muy importantes también por su disponibilidad y costo reducido otras materias primas que contienen hidratos de carbono como granos, melazas, celulosas, suero de queso, etc.

También se pueden emplear otros subproductos o efluentes de industrias que por su contenido en fuentes de carbono son interesantes para algunos procesos como las vinazas de destilería, alpechín y residuos sulfíticos, que son sin embargo solamente útiles para procesos de producción de biomasa destinados al consumo animal, ya que si bien contienen hidratos de carbono y otras fuentes de carbono asimilables por los microorganismos, también contienen muchas impurezas que impiden su utilización en otros procesos por las dificultades y costo elevado que presentan las operaciones de separación y purificación de los productos.

Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica más comunes son el amoníaco o las sales de amonio. Las orgánicas están representadas por varios productos, como ser: 1) Hidrolizados de proteínas (Peptonas) que son obtenidas por hidrólisis ácida o enzimática de distintas fuentes proteicas como carne de diferentes órganos y animales, pescado, caseína, gelatina, harina de soja, algodón, girasol, etc.. Mediante ajuste de la relación enzima-sustrato y variando tiempo de hidrólisis es posible variar el tamaño de la cadena de polipéptidos. Aparte de su función como fuente nitrogenada, las peptonas aportan algunas vitaminas y sales inorgánicas como fosfatos y suministran también algunos micronutrientes como Ca, Zn, Fe y Cu. 2) Extracto de carne, que se obtiene por extracción acuosa y concentración posterior variando su tipo de acuerdo a la calidad de carne, tiempo de extracción y temperatura de la misma. 3) Extracto de levadura, que es disponible en forma de pasta o polvo, y puede ser obtenida mediante autólisis o plasmólisis de la levadura, es básicamente una mezcla de aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en H_2O y carbohidratos. 4) Extracto de malta, que es el extracto soluble en H_2O de la malta de la cebada y 5) "Cornsteep", el agua de maceración de la industria del maíz tiene mucha importancia por su

utilización como componente esencial de los medios para la producción de varios antibióticos y enzimas.

Es muy importante también la correcta elección de una determinada fuente cuando se presentan varias alternativas posibles. En este sentido deben considerarse los costos, la disponibilidad y el problema de impurezas que puede acompañar a las distintas materias primas utilizadas.

Ejemplos de medio de cultivo

Tab. 6.1 Ejemplo de una solución nutritiva sintética sencilla.

K_2HPO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,01 g
Glucosa	10,0 g
Agua	1000 ml
Solución concentrada de oligoelementos	1 ml

Tab. 6.2 Solución madre de oligoelementos.

$ZnCl_2$	70 mg
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	100 mg
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	200 mg
$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	100 mg
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	20 mg
$NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$	50 mg
$Na_2SeO_3 \cdot 5 H_2O$	26 mg
$[NaVO_3 \cdot H_2O]$	10 mg]
$[Na_2WO_4 \cdot 2 H_2O]$	30 mg]
HCl (25%)	1 ml
Agua destilada	1000 ml

[], sólo lo requieren algunos organismos

Tab. 6.3 Solución vitamínica acreditada para bacterias del suelo y del agua.

Biotina	0,2 mg
Ácido nicotínico	2,0 mg
Tiamina	1,0 mg
4-Aminobenzoato	1,0 mg
Pantotenato	0,5 mg
Piridoxamina	5,0 mg
Cianocobalamina	2,0 mg
Agua destilada	100 ml
Se añaden 2-3 ml de la solución vitamínica a 1000 ml de la solución nutritiva.	

Tab. 6.4 Condiciones de enriquecimiento de algunas bacterias seleccionadas.

Microorganismos fototróficos (principal fuente de C: CO₂)

en luz	anaerobio	H ₂ ácidos orgán. SH ₂ SH ₂	fotoasimilados dador de H dador de H	λ > 800 nm λ > 715 nm	Rodospiriláceas Cromatiáceas Clorobiáceas
	aerobio	CINH ₄ N ₂	o KNO ₃	como fuente N como fuente N	Algas verdes Cianobacterias

Bacterias quimiolitotrofas (autótrofas) (principal fuente de C: CO₂)

sin compuestos orgánicos en oscuridad	anaerobio	Dador de H NH ₄ ⁺ NO ₂ ⁻ H ₂ SH ₂ , S, S ₂ O ₃ ²⁻ Fe ²⁺	Aceptor de H O ₂ O ₂ O ₂ O ₂ O ₂	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter</i> Bacterias del H ₂ <i>Thiobacillus</i> <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
	aerobio	S, S ₂ O ₃ ²⁻ H ₂ H ₂	NO ₃ ⁻ NO ₃ ⁻ CO ₂	<i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Paracoccus denitrificans</i> Metanogénicas

Bacterias quimiorganotrofas (heterótrofas)

anaerobio aceptor externo de H	con	KNO ₃ 2% + ác. orgán. KNO ₃ 10% + extr. lev.* Sulfato + ác. orgán.	<i>Pseudomonas</i> esporulados <i>Desulfovibrio</i>	} desnitrificantes
	sin	glutamato, histidina lactato + extr. lev. almidón + NH ₄ ⁺ almidón + N ₂ glucosa + NH ₄ ⁺ glucosa + 1% extr. lev.; pH 5 lactato + 1% extr. lev.	<i>C. tetanomorphum</i> <i>Veillonella</i> <i>Clostridium</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>Enterobacter</i> y organismos fermentadores bacterias del ácido láctico bacterias del ácido propiónico	
aerobio		lactato + NH ₄ ⁺ benzoato + NH ₄ ⁺ manitol, benzoato + N ₂ almidón + NH ₄ ⁺ 4% etanol + 1% extr. lev.; pH 6,0 5% urea + 1% extr. lev. petróleo + NH ₄ ⁺ celulosa + NH ₄ ⁺	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Azotobacter</i> <i>Bacillus polymyxa</i> y otros <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> <i>Sporosarcina ureae</i> <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> <i>Sporocytophaga</i>	

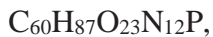
* Inóculo pasteurizado extr. lev. = extracto de levadura

Ejercicio resuelto: Cálculo de nutrientes proceso aerobio

- Partiendo de la fórmula empírica de un microorganismo calcular la masa de nutrientes requerida para generar una masa de 100 g de microorganismos a partir de glucosa ($C_6H_{12}O_6$).
- Calcular el tiempo requerido para llegar a esa masa partiendo de una masa inicial de 1 g.
- Cuántas células podríamos encontrar en un gramo partiendo de una concentración de 10^6 células/ml.

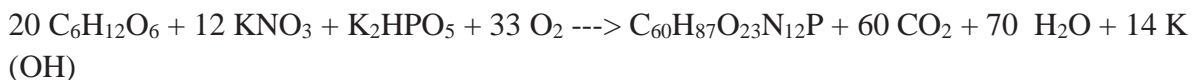
Respuestas:

- La fórmula promedio establecida para los microorganismos es



se adopta como fuente de Nitrógeno KNO_3 y como fuente de fósforo: K_2HPO_5 . Para este ejercicio no se van a incluir elementos minoritarios. En general se agregan en base a formulaciones experimentales.

a.1. Balance estequiométrico: hay que considerar que en un proceso aerobio aproximadamente el 50 % del carbono presente se transforma en CO_2 . En base a esto podemos plantear el siguiente balance:



Según este balance la masa de cada nutriente sería (Coeficiente estequiométrico) x (Peso Molecular)

Masa de Glucosa: $20 \times 179.94 \text{ g/mol} = 3598,8 \text{ g}$

Masa de KNO_3 : $12 \times 101.06 \text{ g/mol} = 1312,72 \text{ g}$

Masa de K_2HPO_5 : 190.1 g

Masa de microorganismos generada: 1373,74 g

Para 100 g de biomasa necesitamos

Glucosa: 261,97 g

En este caso el aceptor de electrones es Oxígeno. La masa de oxígeno requerida sería 527,67 g. En este caso la densidad del oxígeno puro es $1,429 \text{ kg/m}^3$, por lo que se necesitarían $0,369 \text{ m}^3$ de oxígeno puro. Si se usa aire como fuente de oxígeno se requieren $1,76 \text{ m}^3$ de aire (composición 21 % de O_2).

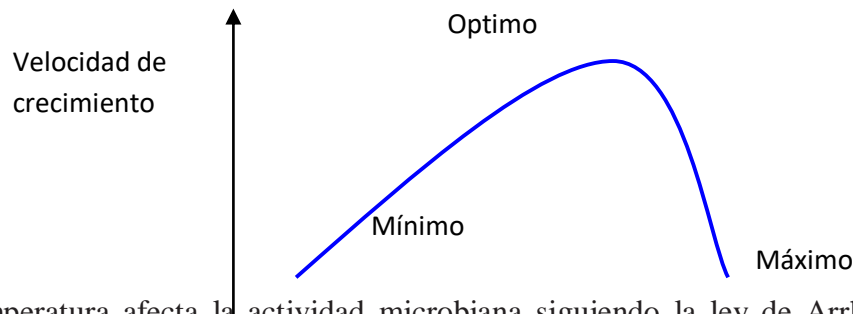
Efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento

Los microorganismos pueden crecer en una variada gama de pH que va desde pH = 2 para los acidófilos hasta pH = 11 para alcalófilos. En general los microorganismos que toleran pH ácidos no toleran pH alcalinos y viceversa.

Independientemente del pH que pueda soportar un microorganismo, es importante conocer cuál es el pH óptimo para el crecimiento. En la fig. 11 está representada en forma general la

variación de un con el pH para hongos y bacterias. De la misma surge claramente que en general los hongos tienen un pH óptimo cercano a 5 mientras que para bacterias se da alrededor de pH = 7; además debido a la forma "achatada" de las curvas, variaciones de 0.5 unidades de pH alrededor del óptimo no tienen mayor influencia. Durante el crecimiento los microorganismos modifican el pH del medio de cultivo, normalmente haciéndolo disminuir; por tal motivo es frecuente incluir en el medio sustancias que actúen como tampon (buffer) a fin de evitar que el pH se aleje del óptimo.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento es complejo. Por un lado cada reacción química individual, de todas las que conforman el metabolismo, es afectada por la temperatura, por lo que un incremento de ésta resulta en una mayor velocidad de reacción. Esto se traduce en un aumento de pm con la temperatura (ver Fig. 12). Por otra parte, aumentos posteriores de temperatura inactivan las enzimas que catalizan las reacciones, con lo que el valor de um decrece rápidamente. La temperatura óptima resulta de la interacción de estos dos efectos. Como regla general, los microorganismos psicófilos poseen temperatura óptima entre 10 y 20 °C, los mesófilos entre 30 y 40 °C y, finalmente, los termófilos entre 50 y 60 °C. La necesidad de mantener la temperatura de cultivo en el valor óptimo, hace que los biorreactores (fermentadores) cuenten con dispositivos apropiados para tal fin.



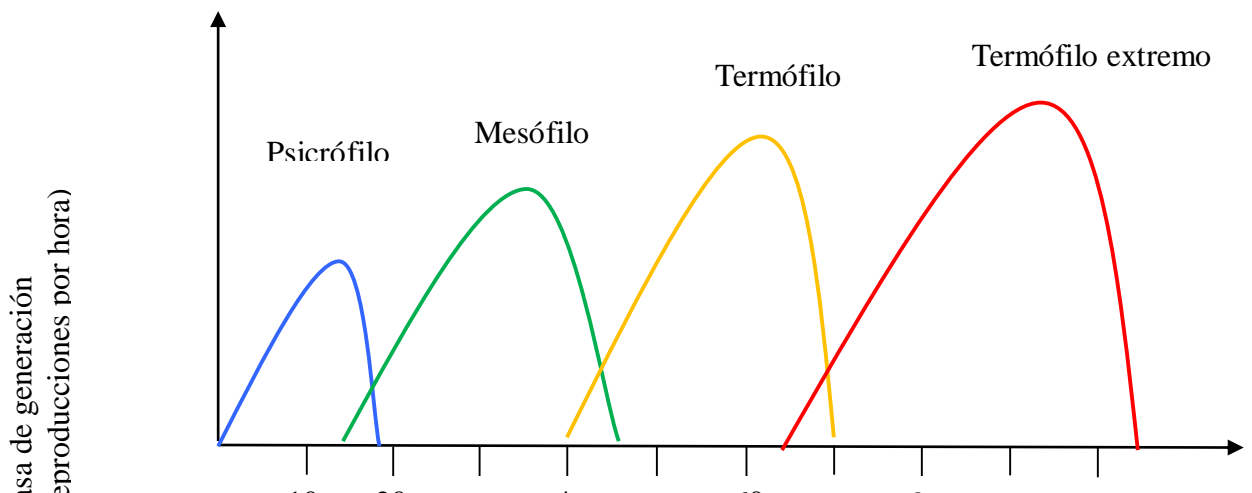
La temperatura afecta la actividad microbiana siguiendo la ley de Arrhenius, tanto para crecimiento y metabolismo como para desnaturalización.

Expresión de la constante de crecimiento en función de T

$$k = A * e^{\frac{-Ea}{RT}}$$

Expresión de la constante de desnaturalización en función de T

$$k = BT^n * e^{\frac{-Ea}{RT}}$$



Congelación

Si bien la congelación impide el crecimiento bacteriano, no siempre produce la muerte de los microbios, ya que existen reacciones enzimáticas que pueden transcurrir lentamente a temperaturas tan bajas como $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, que es donde se detiene el crecimiento celular.

En general las células grandes son mucho más sensibles a la congelación que las pequeñas, y las que no poseen paredes celulares son mucho más sensibles que las que tienen. En la congelación suelen morir algunas células cuando el cultivo es congelado, pero la célula que sobrevive a la congelación inicial puede permanecer viable en estado de congelación durante largos períodos de tiempos. Esto es un estado de vida suspendida, ya que las funciones celulares pueden ser cortadas por completo y sólo cuando se deshela el cultivo puede comenzar de nuevo el metabolismo. Cabe destacar el daño que producen los cristales congelados sobre las estructuras celulares, principalmente sobre la membrana citoplasmática, y no produce el mismo resultado si el enfriamiento es rápido o si se da el tiempo para que se equilibren los estados de transición por los que pasa la célula al ser congelada. Cuanto más baja es la temperatura a la que se conserva el cultivo congelado tanto mejor se conserva.

EFFECTOS OSMÓTICOS Y ACTIVIDAD DEL AGUA

Todos los organismos necesitan agua para vivir. La cantidad de agua varía de acuerdo a los diferentes ambientes y a la disponibilidad de ésta; también hay que tener en cuenta los factores de absorción y de disolución. El agua absorbida a la superficie puede o no estar disponible, según la fuerza con que esté adherida y según la eficacia para recuperarla. Una manera práctica y útil para determinar la disponibilidad de agua es a través de su actividad.

Actividad del agua (a_w)

La actividad del agua está relacionada con la presión de vapor del agua contenida en el aire sobre una solución o sustancia, y se la calcula midiendo la humedad relativa de la fase vapor, que expresa la cantidad de agua presente en el aire, a una temperatura dada, en relación con la cantidad que se encontraría con el aire saturado de agua. La actividad del agua se expresa como fracción, así, $0,75$ de a_w es 75% de humedad relativa. Para medir la actividad del agua de una sustancia o solución se coloca ésta en un espacio cerrado y se deja que alcance un estado de equilibrio con el aire. La actividad del agua indica la disponibilidad de la misma.

Actividad del agua y crecimiento microbiano

En el citoplasma la concentración de solutos es mayor que en el medio de manera que el agua tiende a entrar en la célula. Si la concentración externa de soluto se eleva hasta un valor mayor que el de la interna de la célula el agua tenderá a salir de la célula, y éstas condiciones la única manera de obtener agua y crecer es aumentando la concentración interna de solutos. Algunos organismos pueden hacer esto mejor que otros, soportando crecer en lugares de actividades bajas.

Cuando un organismo crece en un medio con una actividad baja del agua debido a la adición de un soluto, debe realizar más trabajo para extraer agua de la solución. Esto da un menor rendimiento de crecimiento o una velocidad de crecimiento más baja.

Dos solutos con la misma actividad de agua pueden afectar de distinta forma a las células, uno favoreciendo el crecimiento y otro podría llegar a ser tóxico sobre las células.

Actividad matricial y osmótica del agua.

Sabemos que la actividad del agua está afectada por la adsorción o por la interacción con los solutos. **Efecto matricial** denominamos al ejercido por la adsorción del agua, porque la matriz de las sustancias o materiales que adsorben el agua es realmente la responsable de la reducción de disponibilidad de agua. **Efecto osmótico** es el efecto ejercido por los solutos sobre la actividad del agua.

Técnicamente es más fácil variar la actividad osmótica del agua que la actividad matricial, ya que para la primera sólo hay que añadir soluto a un medio de cultivo.

La variación de la actividad matricial podemos realizarla de dos maneras: la primera es secando el sustrato que se desea estudiar para eliminar toda el agua y luego se le añade el agua para que dé el nivel de actividad deseado. La cantidad de agua añadida depende de la fuerza o la capacidad de la sustancia para absorber el agua. La segunda no precisa el conocimiento de las características de ligamento del agua por parte de la sustancia, se basa en dejar que ésta se equilibre con una atmósfera de humedad relativa equivalente a la actividad hídrica deseada.

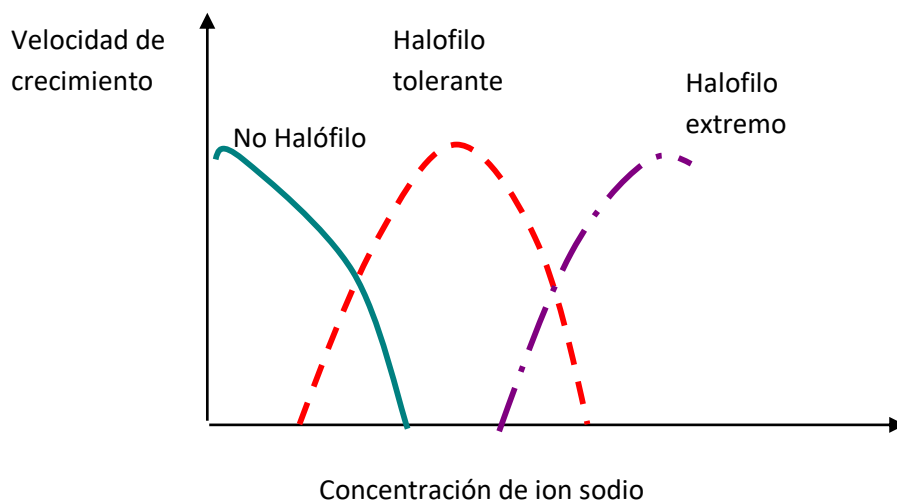
En un sistema controlado osmóticamente, el organismo puede concentrar soluto del medio, permitiendo así el movimiento del agua hacia dentro, mientras que en un sistema matricial no se hallan disponibles en el ambiente circundante grandes cantidades de soluto.

Ecología de los ambientes salinos

Desde el punto de vista ecológico los efectos osmóticos conciernen principalmente en hábitats con elevada concentración de azúcares o sales.

Los microorganismos que necesitan NaCl para su crecimiento se llaman *halófilos obligados*, tenemos halófilos que presentan distintas necesidades de concentración de sal.

Mientras los que crecen en una solución salina de NaCl pero no lo necesitan para su crecimiento se denominan *halófilos facultativos*. También se llaman halotolerantes.



De acuerdo a la concentración de NaCl los microorganismos se denominan halófilos discretos (1-6 %), halófilos moderados (6-15%). Los *halófilos extremos* son aquellos que crecen cuando la concentración de NaCl está en el rango de 15-30 %.

PRESIÓN

Los microorganismos que crecen a presión atmosférica no muestran una disminución notable de su tasa de crecimiento por variaciones de la presión atmosférica; sin embargo, cuando ésta disminuye a niveles extremadamente bajos (atmósfera superior), el agua puede evaporarse y el oxígeno se vuelve limitante.

Cuando la presión aumenta (por ejemplo en el mar a medida que se aumenta la profundidad, la presión sube aproximadamente una atmósfera cada 10 m) la actividad de los microorganismos que se desarrollan a presión atmosférica disminuye en algunos casos (microorganismos sensibles) mientras que en otros no los afecta prácticamente en el rango de 1-400 atm (equivalente a 4000 m de profundidad en el mar).

Hay microorganismos que resisten este aumento sin disminuir la actividad y se denominan barotolerantes, resisten presiones de 400 a 1000 atm (equivalente a 10000 m de profundidad).

Existen microorganismos que se denominan barófilos que no pueden crecer a bajas presiones y en general no se desarrollan a presión atmosférica. Las presiones en que se desarrollan corresponden al rango 400 a 1000 atm.

Estos datos corresponden a crecimiento a presión constante. Si se lo somete a compresión progresiva los microorganismos barófilos y barotolerantes se desarrollan sin inconvenientes, pero si se los somete a una descompresión muchos mueren, quedando sólo algunos barófilos en condiciones viables.

POTENCIAL DE ÓXIDORREDUCCIÓN

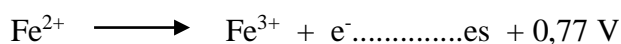
La base real de una reacción de oxidorreducción, donde se emplea una sustancia química aportada por compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de energía, es la transferencia de electrones. En términos energéticos el donador de electrones es una fuente energética.

El potencial de oxidorreducción, redox (Eh), en los ambientes oxidativos tienen potenciales positivos y en los reductores los tienen negativos. Una sustancia se reduce cuando recibe electrones del donador y la otra se oxida cuando los libera.

Por ejemplo el potencial de oxidorreducción del hidrógeno es:



el del hierro:



Una sustancia de menor potencial de oxidorreducción puede donar electrones a cualquier sustancia más oxidada que ella y recibirlos de una más reducida.

El potencial redox puede mantenerse constante a diferentes valores por medio de agentes químicos. En los ambientes biológicos los potenciales bajos se mantienen por agentes reductores, como H₂S o compuestos orgánicos de sulfhidrilo (SH).

Los organismos reducen el potencial redox de su ambiente debido a sus procesos metabólicos. Ello es generalmente por el consumo de O₂ y por la producción de productos del metabolismo.

Es importante considerar el nivel de oxígeno en el cultivo ya que afecta al potencial redox y es reactante en el sistema de transporte de electrones y en la biosíntesis .

Podemos clasificar los grupos de acuerdo a las condiciones de vida teniendo en cuenta el oxígeno y el potencial redox .

Los **aerobios** obligados se encuentran en los ambientes aerobios y necesitan oxígeno porque son incapaces de generar energía por la fermentación.

El oxígeno es esencial porque es un aceptor terminal de electrones y es necesario para la biosíntesis de los esteroides y los ácidos grasos no saturados.

La eficiencia de una buena aireación nos lleva a un crecimiento bacteriano aceptable. Por ello, es que se debe proveer de métodos de aireación efectivos.

Los organismos **facultativos** obtienen energía a través de la fermentación o de la fosforilización oxidativa. No es indispensable pero crecen mejor con oxígeno.

Los microorganismos **microaerófilos** necesitan una tensión de oxígeno muy baja.

Los **anaerobios** son los que no pueden utilizar oxígeno como aceptor de electrones. Tenemos los *aerotolerantes*, que no utilizan oxígeno pero pueden desarrollarse en presencia o ausencia de él; y los *aerófilos*, obligados o estrictos, que la presencia de oxígeno es altamente tóxica. Encontramos entre estos a las bacterias y protozoos.

Los ambientes de bajo potencial redox son ambientes anaerobios. Éstos pueden ser fangos, sedimentos de lagos, ríos, pozos de petróleo, etc.; donde el bajo potencial se debe al consumo de oxígeno, principalmente por bacterias, para su respiración.

RADIACIÓN

La radiación se refiere a aquellas fuentes de energía que son transmitidas de un lugar a otro a través del aire o del espacio exterior. Pueden consistir en partículas o en ondas electromagnéticas. La radiación particular consiste en rayos de átomos o en ondas electromagnéticas, dentro de ellas tenemos las ondas hertzianas, la luz y los rayos X.

Las ondas hertzianas no tienen efectos biológicos detectables, son las radiaciones de mayor longitud de onda.

Los rayos infrarrojos son algo más cortos; producen calor cuando son absorbidos y los rayos infrarrojos con longitudes de onda menores a 1000 nm pueden ser utilizados por las bacterias fotosintetizadoras como fuente de energía.

La porción de ondas visibles por el ojo humano (380 a 760 nm) es la principal fuente de energía para realizar la fotosíntesis de las algas.

Las radiaciones ultravioleta son aun más cortas que las anteriores, están comprendidas entre 380 y 200 nm, son perjudiciales para los organismos vivos. La principal fuente de radiación de radiación ultravioleta y visible, es el sol, si bien no todos los rayos cortos ultravioleta y los largos infrarrojos llegan a la Tierra.

Las radiaciones ionizantes tienen longitudes de onda más cortas e incluyen los rayos X, producidos principalmente por el hombre, los rayos gamma, que son similares pero son productos de la descomposición de materiales radiactivos, y los rayos cósmicos, que llegan a la Tierra desde el exterior. Éstas radiaciones ionizan el agua y otras sustancias y, en general, tienen efectos perjudiciales para el organismo.

RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UV), éste tipo de radiación es letal para los microorganismos. Las radiaciones UV que penetran a la Tierra son las de mayores longitudes de onda, las de onda corta no llegan a la superficie terrestre.

La muerte de las células por la radiación UV es debida a su acción sobre el DNA (a 260 nm es altamente letal 9), esto es porque impide que se pueda realizar una réplica del DAN. Existen enzimas que intentan y pueden reparar el daño causado por la radiación UV, es reparada sólo cuando se la expone a la luz visible en el espectro de la luz azul, éste mecanismo es denominado fotorreactivación. Otras enzimas actúan en ausencia de luz. Por lo tanto el daño será irreparable o se producirá la muerte de la célula, cuando el daño producido por la radiación sea mayor que la actividad reparadora de la célula.

La radiación ejerce mayor efecto sobre las células húmedas que las secas, sobre las no pigmentadas que las pigmentadas, sobre las haploides o mononucleadas que las diploides o plurinucleadas.

LUZ VISIBLE. La luz visible de elevada intensidad puede causar la muerte celular, debido a un proceso denominado *fotooxidación*, en el cual la luz absorbida por los pigmentos de la célula causa la inactivación de los enzimas o de otros componentes sensibles cuando está presente el oxígeno. En ausencia de oxígeno la fotooxidación no se puede producir y la luz puede ser absorbida sin causar daño. Si se pigmentan las células se aumenta enormemente la sensibilidad a la fotooxidación, a tal punto de exponerlo a la luz visible causando la muerte, éste fenómeno se denomina *acción fotodinámica*. El papel principal de la luz visible es la energía que provee para la fotosíntesis. Interviene en un gran número de procesos que ocurren con la presencia de la luz.

RADIACIÓN IONIZANTE. Esta radiación no mata por afectar directamente a los constituyentes celulares, sino que induce indirectamente cambios al introducir en el medio radicales químicos activos (radicales libres). Éstos radicales libres pueden reaccionar con macromoléculas sensibles de la célula e inactivarlas. La radiación ionizante puede actuar sobre todos los constituyentes celulares pero la muerte es producida por los efectos sobre el DNA. La inactivación de un gen crítico puede conducir a la muerte, mientras que la inactivación de células sueltas de proteínas no conduce a la muerte. Las radiaciones ionizantes naturales como los rayos cósmicos y las provenientes de materiales naturales radiactivos nunca tienen efectos perjudiciales sobre los organismos, probablemente porque sus niveles son demasiado bajos.

Inmovilización de células

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

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

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

“uso repetido y continuo”: surge inmediatamente que la gran ventaja del uso de biocatalizadores inmovilizados se relaciona con la fácil separación del catalizador del medio de reacción sin pérdida de actividad, y por consecuencia directa, con su reutilización. Las

células o enzimas inmovilizadas pueden ser separadas fácilmente. Es necesario saber cómo afecta el método de inmovilización la estabilidad del biocatalizador, y por ende la extensión de su uso repetido.

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

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

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

- ENTRECruzamiento FISICO (FLOCULACION).
- ENTRECruzamiento COVALENTE.
- ADSORCION SOBRE MATRICES INSOLUBLES
- ENLACE COVALENTE CON MATRICES INSOLUBLES.
- ENTRAMPAMIENTO FISICO EN MATERIALES POROSOS.
- ENCAPSULAMIENTO.

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

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

El caso típico es la floculación de algunas cepas de *Zymomonas mobilis*, empleadas en la producción de etanol. El método de inmovilización es sencillo, pues espontáneamente se producen flocs cuando se crecen células en un medio adecuado sin agitación. Los flocs así formados se utilizan como inóculo de medios de cultivo frescos, y pueden ser usados en la producción de etanol a partir de glucosa en reactores especialmente diseñados. Las células inmovilizadas son retenidas dentro del reactor. Este método permite alcanzar altas concentraciones celulares, y se lleva a cabo en condiciones de reacción suaves, que no perjudican la estabilidad del biocatalizador. Presenta algunas desventajas: se alcanza una baja resistencia mecánica frente a la agitación y a la compresión, hay limitaciones difusionales al transporte de nutrientes, y está limitado a pocas clases de microorganismos.

2.- **INMOVILIZACION DEL BIOCATALIZADOR EN CARRIERS PREFORMADOS:** es la estrategia típica en la inmovilización de enzimas, especialmente por medio de enlaces

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

3.- INMOVILIZACION DURANTE LA PREPARACION DEL CARRIER: Es la estrategia más común en la inmovilización de células enteras. Si bien hay dos métodos, entrapamiento y encapsulamiento, este último es de limitada importancia. Debido al tamaño de las células enteras, es relativamente sencillo preparar redes de porosidad tal que garanticen la completa retención de las células, y que los procesos de transporte de sustratos y productos sean suficientemente rápidos para obtener alta eficiencia en la actividad catalítica. La dificultad se encuentra en la búsqueda de condiciones de preparación de carriers que cumplan con los requerimientos exigidos para que se retenga la actividad del biocatalizador y/o la viabilidad celular. Es el método de inmovilización más usado, debido a su flexibilidad y simplicidad, y a las poco agresivas condiciones de reacción (en el caso de polímeros naturales).

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

TIPOS DE CARRIERS.

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

INORGANICOS:

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

ORGANICOS:

- Naturales: virutas de madera, antracita, colágeno, celulosa, alginatos, carragenatos,

albúmina.

- Sintéticos: PVC, polipropileno, poliacrilamida, resinas de intercambio iónico, epóxidos, poliuretanos.

La selección del material se realiza siguiendo algunos criterios heurísticos:

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

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

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

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

Los más sencillos son los mecanismos de entrapamiento por gelificación y por gelificación ionotrópica.

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

Hay dos áreas donde se aplica el K-carragenato:

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

GELIFICACION IONOTROPICA: El sistema más común es el entrecruzamiento de alginatos con iones Ca^{+2} . Los alginatos son polímeros de ácido manurónico y gulurónico, solubles en agua a temperatura ambiente como alginatos de Na^{+} y que gelifican en presencia de ciertos iones polivalentes. En general una solución de alginato de Na^{+} se deja gotear en una solución de CaCl_2 obteniéndose en tiempos cortos, bolillas esféricas de tamaño controlado y homogéneo. Es un método que presenta gran flexibilidad, pues alginatos de distinto peso molecular y distinta composición química (distintas proporciones de ácidos gulurónico y manurónico) rinden geles de muy buenas características químicas y físicas. El requerimiento de Ca^{+2} depende de la composición química del gel. La concentración de CaCl_2 en la mezcla de gelificación puede variar entre 0,05 y 2 %. El rango de temperaturas de operación va desde 0 hasta 80 °C. Las bolillas que se obtienen presentan diámetros entre 0,1 y 5 mm. y pueden presentar una alta carga celular por entrapamiento directo (hasta 30 g de células húmedas por ml de catalizador). Este sistema puede someterse a un secado parcial, con lo que el tamaño disminuye y aumenta la estabilidad mecánica sin variación en la porosidad. La desventaja que presenta es la inestabilidad frente a ciertos agentes capaces de secuestrar iones Ca^{+2} (p. ej.: fosfatos).

Los puntos destacables de este método son:

- Reversibilidad de la gelificación: obliga a tomar precauciones en cuanto a la composición del medio a utilizar, principalmente pH y presencia de agentes que puedan secuestrar a los iones por precipitación o por formación de complejos.
- Buena estabilidad mecánica respecto al empaquetado en columna y a la agitación
- Formación de bolillas regulares, y con tamaño controlado.
- Formación de redes macroporosas, que se conserva aún después del secado parcial.
- Alta capacidad de carga sin pérdida de estabilidad mecánica, pero con pérdida de eficiencia debido a resistencias difusionales.
- Rendimientos de actividad catalítica de entre 80 y 100% en condiciones de reacción controladas.
- Método suave, que permite que las células mantengan viabilidad y estabilidad