

MICROENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* EN DIFERENTES SISTEMAS Y MATERIALES. EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Mary Isabel Lopretti^{1,2}, Laura Olazabal²

1) Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay
2) Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Avenida Italia, 6201, Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: mlopre@latu.org.uy

Recibido: Abril 2013; Aceptado: Septiembre 2013

RESUMEN

La protección de los microorganismos mediante microencapsulación se desarrolla en forma creciente, donde es importante encontrar un soporte adecuado que sea biocompatible y estable en el tiempo. En este trabajo se estudiaron tres sistemas de encapsulación de una levadura *Kluyveromyces marxianus* con el fin de poder obtener un sistema estable que permita fermentaciones en sustratos con presencia de inhibidores como derivados de lignina y subproductos de hemicelulosa. La fermentación alcohólica con *Kluyveromyces* libre presenta una disminución en el rendimiento del 50 y 75% cuando se trabaja con inhibidores fenólicos y de xilano, respectivamente. *Kluyveromyces* encapsulado en alginato presenta una disminución del rendimiento de la producción de alcohol del 50 y 60%, respectivamente, mientras que encapsulado en quitosano la disminución del rendimiento es del 25 y 30%, respectivamente. La encapsulación en PVA presenta una disminución del rendimiento del 20 y 10%, respectivamente.

Todos los sistemas permitieron desarrollar el crecimiento y fermentar azúcares a altas temperaturas, siendo la encapsulación en PVA la más adecuada probablemente por el tamaño pequeño de las partículas, que aumenta la superficie de acción. Consideramos que es un buen sistema de fermentación para procesos que utilizan lignocelulósicos como materia prima obteniendo buena protección y aumentando los rendimientos productivos.

Palabras claves: Material lignocelulósico, fermentación, microencapsulación.

ABSTRACT

The protection of microorganisms by microencapsulation was developed in increasingly, where it is important to find a suitable carrier that is biocompatible and stable in time. In this work we studied three encapsulation systems with a yeast KM in order to study the fermentation activity and obtain a stable system that allow fermentations with inhibited substrates, as byproducts hydrolysis products of lignin and hemicellulose hydrolysis. The alcoholic fermentation with free *Kluyveromyces* shows a decrease in the yield of 50 and 75% when working with phenolic inhibitors and inhibitors of xylane, respectively. *Kluyveromyces* encapsulated in alginate has a performance degradation of 50 and 60% respectively. While encapsulated in chitosan has a decreased yield of 25 and 30% respectively, encapsulated in PVA reduced yields of 20 and 10%, respectively.

All systems develop growth and allowed to ferment sugars at high temperatures. PVA encapsulation seems to be adequate because the small particle size, which increases the action surface. We believe it is a good system for fermentation processes that use lignocellulosic feedstock getting good protection and increasing production yields.

Keywords: Lignocellulosic materials, fermentation, microencapsulation

INTRODUCCION

Existen varios soportes poliméricos utilizados en las técnicas de microencapsulación. La microencapsulación en esferas de alginato es un método que permite mejorar la viabilidad de los microorganismos. El alginato presenta una amplia distribución de usos y al ser una proteína aporta

un componente nutricional añadido.

Sin embargo, el uso de alginato es limitado debido a su pobre estabilidad física en presencia de agentes quelantes. Una matriz de alginato expuesta a bajos valores de pH produce una reducción en el peso molecular del alginato causando la rápida degradación y descarga de las células o de ingredientes activos [3,5].

Por otro lado se pueden considerar policationes como el quitosano que forman fuertes complejos con alginatos, los cuales son estables en presencia de quelantes de Ca^{2+} . Así, cubriendo las esferas de alginato con quitosano se puede mejorar su estabilidad química y mecánica, consecuentemente mejorando la efectividad de la microencapsulación [1,2].

El quitosano es un polisacárido de β -1,4-D-glucosamina con excelentes propiedades biológicas. Este biopolímero policatiónico es obtenido por desacetilación química de la quitina (principal componente del exoesqueleto de crustáceos e insectos) y es el segundo polisacárido más abundante. Es componente de la pared celular de hongos *Cigomicetes*, donde es sintetizado por acción de la quitina desacetilasa, convirtiendo los residuos N-acetilglucosamina de la cadena, en residuos glucosamina [4,7].

La carga positiva que se produce en medio ácido como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad glucosamina, le confiere solubilidad en medio acuoso. Existen otros materiales sintéticos para microencapsular como el alcohol polivinílico que permite obtener microsferas firmes, bien definidas y estables.

Esta es una sustancia que despierta especial interés en el campo de los materiales, ya que es ampliamente utilizado en biotecnología para encapsular enzimas y microorganismos y, actualmente, muy difundido en la industria farmacéutica como soporte de liberación lenta de fármacos [6].

El PVA es producido industrialmente por polimerización de acetato de vinilo a polivinil acetato (PVAc), seguida de una hidrólisis a PVA con liberación de los grupos acetato. Esta conversión no es completa, y se debe determinar el grado de hidrólisis alcanzado. Por esta razón, el PVA siempre se debe considerar como un copolímero de PVA y PVAc. El grado de hidrólisis o el contenido de grupos acetato remanentes tienen fuertes implicancias en las propiedades químicas, la solubilidad y cristalización del polímero.

Un polímero entrecruzado, obtenido desde una solución acuosa, que presente un carácter hidrofílico y que, a la vez, pueda hincharse por inmersión en agua pero permanecer insoluble, se denomina hidrogel.

El PVA puede entrecruzarse de diversas maneras, una de ellas es por medio de agentes que generen uniones covalentes entre distintas cadenas poliméricas, tales como glutaraldehído, acetaldehído, formaldehído y otros monoaldehídos en presencia de ácido sulfúrico, acético o

metanol. Un aspecto no deseado de esta técnica es la presencia de residuos de la reacción, que ocasionan la necesidad de extracciones posteriores.

Otro método de preparación de hidrogeles se basa en la generación de interacciones físicas entre cadenas. Los hidrogeles físicos se forman a partir de interacciones tipo enlace de hidrógeno. Estas generan zonas de carácter cristalino que proporcionan sitios con rigidez estructural desde los cuales se desarrolla la matriz de polímero [6,8]

En este trabajo se estudió tres sistemas de encapsulación de una levadura *Kluyveromyces marxianus* con el fin de estudiar su actividad fermentativa y poder obtener un sistema estable que permita fermentaciones en sustratos con presencia de inhibidores como subproductos de la hidrólisis de lignina y subproductos de la hidrólisis de hemicelulosa. La aplicación de este Sistema está orientada a la mejora de los rendimientos productivos en la producción de alcoholes a partir de materiales lignocelulósicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de microesferas de quitosano. Para formar las microesferas de quitosano, se utilizó la técnica de emulsión agua/vaselina líquida (W/O).

Como fase dispersa, se preparó una solución de quitosano al 1,0% (wt/vol) en ácido acético al 5%. Luego la solución de quitosano se filtró utilizando un filtro MN 640 w (*Macherey–Nagel*).

Para la fase continua, se tomó 150 mL de vaselina líquida en un matraz de 500 mL. Se le adicionó 0,1% (w/w) de Span 80. Utilizando una jeringa, se agregaron 10 mL de la solución quitosano 1,0% por goteo ($5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) sobre la vaselina, en agitación constante (500 rpm) a temperatura ambiente.

Luego, se adicionaron 20 mL de glutaraldehído 25% (vol/vol) a los 15, 30, 35 y 60 minutos posteriores al agregado del quitosano, manteniendo la agitación constante. Una vez finalizado el agregado del glutaraldehído, se mantuvieron las mismas condiciones de agitación durante una hora. Se adicionó un volumen de 300 mL de acetato de etilo para extraer el disolvente en exceso, en dos fracciones cada 1 hora ($15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). La reacetilación se llevó a cabo con anhídrido acético (2,21 mM/mg de quitosano). Se mantuvo en agitación durante dos horas.

Las microesferas se decantaron por 24 horas a temperatura ambiente. Para la recolección de las microesferas, primero se descartó la vaselina, y luego se comenzaron a realizar sucesivos lavados con éter de petróleo y acetato de etilo a través de un filtro de $0,8 \mu\text{m}$. Se dejaron secar a temperatura ambiente. La visualización de las microesferas obtenidas fue realizada en un microscopio electrónico (marca), con una resolución 40X

Síntesis de microesferas reticuladas que contienen alcohol polivinílico. Se disolvió alcohol polivinílico en una solución ácida $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--NaCl}$ 0,5 M y HCl 1 M, con agitación, posteriormente, se

adicionó glutaraldehído 25% (v/v) formando una mezcla. Dicha mezcla se añadió con agitación vaselina líquida como fase continua de 0,1% y Spam 80 para formar una emulsión de alcohol polivinílico en el aceite.

Una vez que se adicionaron todos los reactivos se dejaron agitando a 80°C por 6 horas y luego se redujo la temperatura a 40°C y se dejó toda la noche en agitación.

Las microesferas fueron lavadas con éter de petróleo y luego filtradas con vacío. Finalmente se las resuspendió en Tris-HCl 0,5 M (pH 9), y se almacenó a temperatura ambiente.

La visualización de las microesferas obtenidas fue realizada en un microscopio electrónico *Jeol JSM-5900 LV* en la *Unidad de Microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias*, con una resolución 40X.

Preparación de microesferas de alginato. Se preparó una solución de alginato al 2,5% (w/v) y 150 mL de una solución de Cl_2Ca 0,1 M. Se acondicionó sobre una placa de agitación un vaso de *Bohemia* conteniendo 150 mL de solución de Cl_2Ca . Sobre el Cl_2Ca se deja gotear la solución de alginato con un caudal de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, empleando una bomba peristáltica. Este procedimiento se mantuvo durante 1 hora. Posteriormente las cápsulas se lavaron con agua destilada.

Crecimiento de *K. marxianus*. Se realizó un cultivo de *K. marxianus* a 40°C en 500 mL de YPD (glucosa $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, extracto levadura $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y peptona $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sin agitación durante 24 horas. Esta metodología se repitió tres veces, incorporando en el medio esferas de alginato, quitosano y poli(vinil alcohol), respectivamente. Después de 24 hs se controló por microscopía el crecimiento de la levadura, y se conservaron a 4°C para ser utilizadas en los ensayos de fermentación.

Fermentación con *K. marxianus* libre. Se fermentaron $1\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *K. marxianus*, a 40°C, en 500 mL de YPD (glucosa 20 g/L, extracto levadura $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y peptona 20 g/L), sin agitación. La fermentación se realizó durante 24 horas. Posteriormente al tiempo final de fermentación se determinaron azúcares fermentables por DNS y grados de alcohol por la técnica de destilación.

Fermentación con *K. marxianus* libre con inhibidores de la fermentación. Se fermentaron $1\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *K. Marxianus* a 40°C en 500 mL de YPD al cual se le agregó 0,1% w/v de polifenoles de lignina con tratamiento térmico 4 horas en autoclave a 121°C (a) y 0,1% de xilosa modificada por tratamiento térmico en autoclave durante 2 horas, a 121°C (b). La fermentación se realizó durante 24 horas. Posteriormente, al tiempo final de la fermentación, se determinaron los azúcares fermentables por DNS y los grados de alcohol, empleando la técnica de destilación.

Fermentación con *K. marxianus* encapsulado. Para la fermentación se utilizaron 2,0 g de esferas de alginato con crecimiento de *K. Marxianus*, 1,56 g de esferas de PVA con *K. Marxianus* y

1,52 g de esferas de quitosano con *K. Marxianus* (respectivamente en cada ensayo) en 500 mL de YPD (glucosa 20 g·L⁻¹, extracto levadura 10 g·L⁻¹ y peptona 20 g·L⁻¹). La fermentación se realizó durante 24 horas sin agitación. Posteriormente al tiempo final de fermentación se determinaron azúcares fermentables por DNS y grados de alcohol por la técnica de destilación.

Fermentación con *K. marxianus* encapsulado en medio con inhibidores de la fermentación. Para la fermentación se utilizaron 2,2 g de esferas de alginato con crecimiento de *K. Marxianus*, 1,60 g de esferas de PVA con *K. Marxianus* y 1,58 g de esferas de quitosano con *K. Marxianus* (respectivamente en cada ensayo) en 500 mL de YPD al cual se le agregó 0,1% w/v de polifenoles de lignina con tratamiento térmico durante 4 horas en autoclave a 121°C (a) y 0,1% de xilosa modificada por tratamiento térmico en autoclave, durante 2 horas a 121°C (b). La fermentación se realizó durante 24 horas sin agitación. Posteriormente, al tiempo final de fermentación se determinaron azúcares fermentables por DNS y grados de alcohol por la técnica de destilación.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Se procesaron muestras metalizando a vacío con oro-paladio. Las muestras se observaron en microscopio *Jeol JSM-5900 LV* a una aceleración de voltaje de 20 KV en la unidad de microscopía electrónica de barrido de la *Facultad de Ciencias*.

Determinación de azúcares reductores. Se utilizó la técnica de DNS (dinitrisalicílico).

Determinación alcohol por destilación. Se utilizó la técnica de destilación tradicional. El material obtenido se cuantificó por el método redox del reactivo del dicromato de potasio.

Se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de etanol, en el intervalo de concentraciones de 2 a 46 g·L⁻¹.

La mezcla de reacción se preparó con 3,00 mL de una solución 0,1 M de K₂Cr₂O₇ y 5 M de H₂SO₄, 300 µL de solución de etanol. Se sellaron los tubos de reacción con parafilm y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se midió absorbancia a 590 nm. Para el blanco se sustituyó la solución de etanol por agua destilada.

Para las muestras de fermentación se sustituyó la solución de etanol por el destilado, y el valor de absorbancia se interpoló en la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva de calibración.

Determinación de etanol por cromatografía de gases-espectrometría de masa. Se cuantificó la concentración de etanol producida por cromatografía de gases – espectrometría de masa. Se utilizó el método del estándar interno para la cuantificación de la concentración del etanol. Primero se construyó una curva de calibración con soluciones de estándar de etanol en agua, en el rango de 2 a 80 g·L⁻¹. Para la misma, se representó la relación de áreas del estándar de etanol con el estándar de isobutanol (estándar interno) con respecto a la concentración del etanol. Obteniéndose una relación lineal. Se utilizó un cromatógrafo de gases *Agilent 7890A* con detector de masa *Agilent*

5975C *Inert XL* y una columna capilar DB-FFAP de 60 m·0,25 mm·0,25 μm . La inyección se realizó en modo *Split* con una relación de *Split* de 20:1. La temperatura del inyector fue de 200°C. El programa de temperatura de la columna contó de una isoterma a 40°C durante 20 minutos y una rampa de 15°C/min hasta 70°C. El flujo del gas helio fue de 0,5 mL·min⁻¹. La fuente del detector de masa se mantiene a 230°C durante todo el análisis y los cuadrupolos a 150°C. La ionización es por impacto electrónico. Para la identificación del etanol y el isobutanol se utilizó el tiempo de retención y el espectro de masa. Se inyectó la muestra y cada punto de la curva de calibración 3 veces por duplicado. Las curvas de calibración mostraron coeficientes de correlación lineal superiores a 0,99.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los resultados de microscopía electrónica podemos ver las cápsulas vacías y con crecimiento de levaduras, observando buen crecimiento en todos los soportes. Las microesferas de PVA presentan el mayor desarrollo y estabilidad.

En las Figuras 1 y 2 vemos las esferas de alginato, en las Figuras 3 y 4 las de quitosano y en las Figuras 5 y 6 las esferas de poli(vinil alcohol).

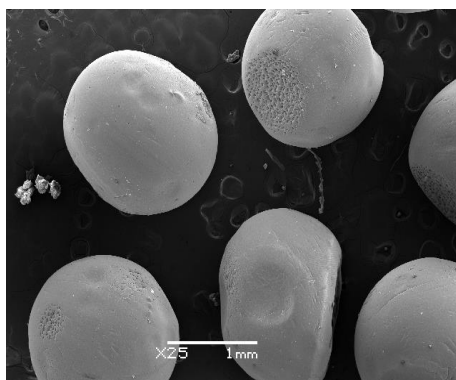


Figura 1. Cápsulas de alginato vacías en microscopía SEM

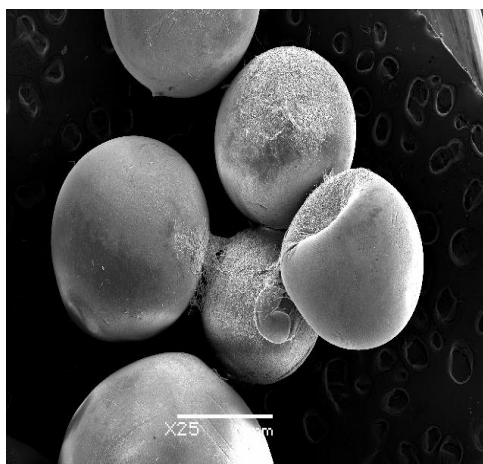


Figura 2. Cápsulas de alginato con crecimiento de *Kluyveromyces* en microscopía SEM.

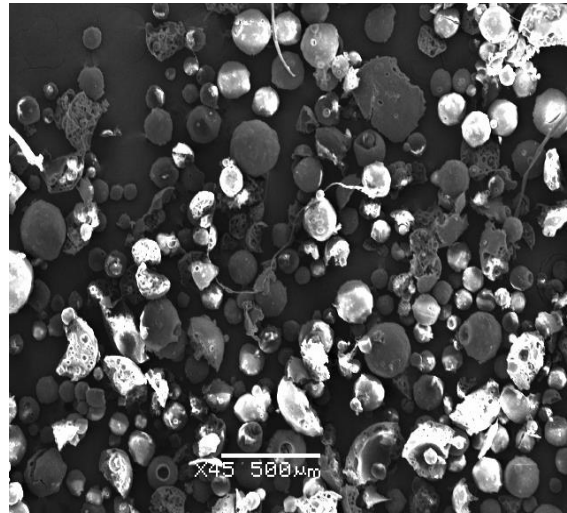


Figura 3. Cápsulas de quitosano vacías en microscopia SEM.

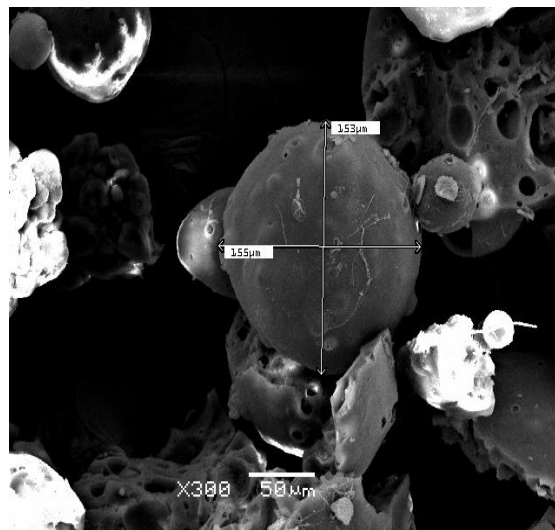


Figura 4. Cápsulas de quitosano con crecimiento de *Kluveromyces* en microscopia SEM.

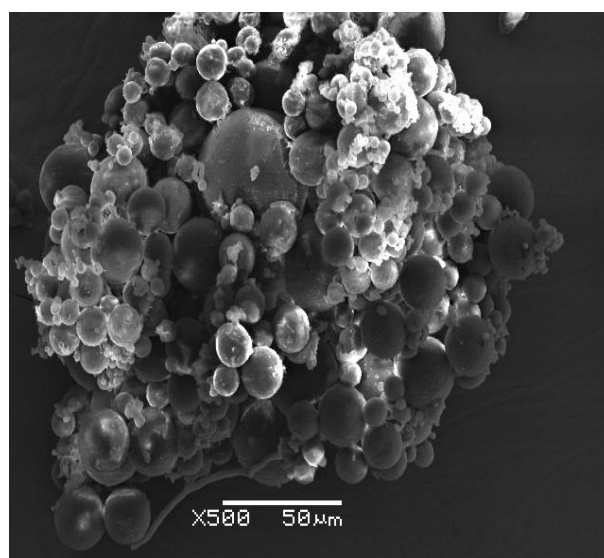


Figura 5. Cápsulas de alcohol polivinílico vacías en microscopia SEM.

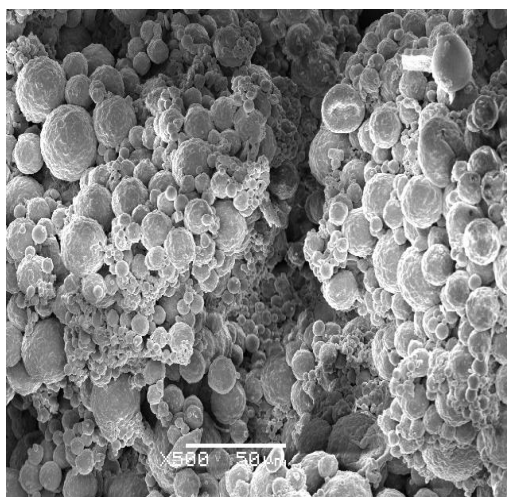


Figura 6. Cápsulas de alcohol polivinílico con crecimiento de *Kluveromyces* en microscopia SEM.

De los resultados obtenidos de las fermentaciones de la levadura libre y encapsulada se realizaron evaluaciones por dos técnicas, de destilación y comatografía gaseosa obteniendo resultados similares. Se puede ver una clara protección de la levadura en los sistemas de microencapsulación que se manifiesta en un mejor rendimiento en la producción de bioetanol. Se muestra en la Tabla 1 los resultados de la fermentación de la levadura libre en medio sintético y en medio con inhibidores.

Tabla 1 Fermentación con *K. marxianus* libre en YPD y en medio con inhibidores de la fermentación.

<i>Tipo de fermentación</i>	<i>Diferencia de azúcares reductores X</i>	<i>Grado de alcohol X</i>
<i>K. marxianus</i> libre en YPD	2 g·L ⁻¹ sobrante	1°
<i>K. marxianus</i> libre en YPD + polifenoles modificados	5 g·L ⁻¹ sobrante	0,5°
<i>K. marxianus</i> libre en YPD + xilano hidrolizado	8 g·L ⁻¹ sobrante	0,3°

En la Tabla 2 se muestra los resultados de la fermentación de la levadura encapsulada en los tres sistemas creciendo en medio sintético y en medio con inhibidores.

Con los resultados obtenidos se realizó un segundo ensayo donde se evaluó la producción de alcohol por cromatografía gaseosa y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Fermentación con *K. marxianus* encapsulado en YPD y en medio con inhibidores de la fermentación.

<i>Tipo de fermentación</i>	<i>Diferencia de azúcar reductor</i>	<i>Grados de alcohol</i>
<i>K. marxianus</i> esferas quitosano en YPD	2 g·L ⁻¹	1°
<i>K. marxianus</i> esferas de quitosano en YPD + Polifenoles	3 g·L ⁻¹	0,8
<i>K. marxianus</i> esferas de quitosano en YPD + xilano hidrolizado	4 g·L ⁻¹	0,7
<i>K. marxianus</i> esferas de PVA en YPD	2 g·L ⁻¹	1°
<i>K. marxianus</i> esferas de PVA en YPD + polifenoles	3 g·L ⁻¹	0,8
<i>K. marxianus</i> esferas de PVA en YPD+ xilanos hidrolizados	3 g·L ⁻¹	0,9
<i>K. marxianus</i> esferas de Alginato en YPD	1 g·L ⁻¹	1°
<i>K. marxianus</i> esferas de alginato en YPD + polifenoles hidrolizados	4 g·L ⁻¹	0,5
<i>K. marxianus</i> esferas de alginato en YPD + xilanos hidrolizados	6 g·L ⁻¹	0,4

Tabla 3. Fermentación con *K. marxianus* encapsulado en YPD y en medio con inhibidores de la fermentación.

<i>Tipo de fermentación</i>	<i>Grado de alcohol g·L⁻¹</i>
<i>K. marxianus</i> esferas quitosano en YPD	7
<i>K. marxianus</i> esferas de quitosano en YPD + Polifenoles	8
<i>K. marxianus</i> esferas de quitosano en YPD + xilano hidrolizado	11
<i>K. marxianus</i> esferas de PVA en YPD	9
<i>K. marxianus</i> esferas de PVA en YPD + polifenoles	8
<i>K. marxianus</i> esferas de PVA en YPD+ xilanos hidrolizados	11
<i>K. marxianus</i> esferas de alginato en YPD	8
<i>K. marxianus</i> esferas de alginato en YPD + polifenoles hidrolizados	10
<i>K. marxianus</i> esferas de alginato en YPD + xilanos hidrolizados	20

CONCLUSIONES

La fermentación alcohólica con *Kluyveromyces* libre presenta una disminución en el rendimiento del 50 y 75% cuando se trabaja con inhibidores fenólicos e inhibidores de xilano, respectivamente. *Kluyveromyces* encapsulado en alginato presenta una disminución del rendimiento del 50 y 60%, respectivamente con relación a la fermentación sin inhibidores. Cuando el *Kluyveromyces* se encapsuló en quitosano presenta una disminución del rendimiento del 25 y 30%, respectivamente referente a la fermentación sin inhibidores.

Cuando se encapsuló *Kluyveromyces* en PVA se observa una disminución del rendimiento del 20 y 10%, respectivamente. Siendo este resultado el mejor en referencia a la fermentación sin inhibidores.

Podemos determinar que en todos los casos el sistema de encapsulación permitió proteger la levadura de inhibidores fenólicos derivados de ligninas y de derivados de hemicelulosa. La importancia de poder definir sistemas de protección de levaduras a estos inhibidores es creciente cada día frente al desarrollo de nuevos emprendimientos de producción de bioetanol a partir de maderas.

Todos los sistemas permitieron desarrollar el crecimiento y fermentar azúcares a altas temperaturas, lo cual permite pensar no solo en la protección y eficacia de la levadura sino en la estabilidad de la cápsula que persiste fermentando a 40°C. En este caso el alginato fue el polímero menos adecuado al sistema.

La importancia de esto radica en la posibilidad de realizar sacarificaciones y fermentaciones simultáneas utilizando levaduras termófilas como en sistemas encapsulados. La eficiencia obtenida es superior si consideramos los aspectos económicos ya que se obtendrían menores costos operativos para la producción de bioetanol.

La encapsulación en PVA parece ser la más adecuada probablemente por el tamaño pequeño de las partículas, que aumenta la superficie de acción y la mayor adaptación a altas temperaturas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM “Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery”, *J. Controlled Release*, **100**, 5 (2004)
- (2) Dini E, Alexandridou S, Kiparissides C “Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications”, *J. Microencapsulation*, **20(3)**, 375 (2003)
- (3) Gombotz WR, Wee SF “Protein release from alginate matrices”, *Advanced Drug Delivery Reviews*; **31**: 267 (1998)
- (4) Kato Y, Onishi H, Machida Y “Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field”, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **4**, 303 (2003)
- (5) Lamas MC, Bregni C, Frias M, Velázquez R “Hydrogel microspheres for flutamide obtained by multiple emulsions”, *S.T.P. Pharma Science*, **8(6)**, 375 (1998)
- (6) Lozinsky VI, Pheva FM “Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization.”

- Overview of recent research and developments”, *Enzyme and Microbial technology*, **23**, 27 (1998)
- (7) Olivera A, Barreiro F, Lopretti M “Microesferas de quitosano como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos” *Rev. Iberoam. Polím.*, **13(5)**, 238 (2012)
- (8) Rainina E, Pusheva M, Ryabokon A “Microbial cells immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogels: Biocatalytic reduction of CO₂ by thermophilic homoacetogenic bacterium”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **19**, 321 (1994)