

Producción microfluídica de cápsulas de hidrogel con células de levadura para estudios de actividad metabólica y storing

Microfluidic Production of Hydrogel Beads with Yeast Cells for Metabolic Activity Studies and Storing

Doctorando/a:

Juan Fernando CAMPAÑA PÉREZ

<https://orcid.org/0000-0002-5443-8169>

Centro IREN, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, Argentina

juanfercampanha@gmail.com

Director/a:

Betiana LERNER

Codirector/a:

Maximiliano PÉREZ

Resumen

Este trabajo presenta el desarrollo de una plataforma microfluídica para la producción de cápsulas de hidrogel que permite encapsular simultáneamente células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante el uso del dispositivo microfluídico se generaron gotas monodispersas de un copolímero fotorreactivo (DMAA-MABP-SSNa) que, al ser irradiadas con luz UV ($\lambda = 365$ nm), forman cápsulas estables de aproximadamente 1000 μm con una distribución de tamaño homogénea. Se evaluó la actividad metabólica de las levaduras encapsuladas mediante el consumo de glucosa y se comparó su viabilidad y capacidad de almacenamiento frente a células libres (cultivadas en suspensión), a 4 °C y 30 °C, durante 15 días. Las cápsulas de hidrogel con mayor concentración de polímero (150 mg/mL) mantuvieron más del 50 % de viabilidad celular luego de 15 días a 4 °C, mientras que para las células libres su viabilidad decayó en pocos días. Asimismo, estas cápsulas de hidrogel redujeron notablemente la turbidez del medio de fermentación en comparación con las células libres, alcanzando un Índice de Eficiencia Metabólica Relativa (RMEI) de 0,341. Los resultados obtenidos posicionan a esta plataforma como una alternativa robusta y versátil para el almacenamiento celular sin refrigeración y para su uso en biorreactores fermentativos en las industrias alimentaria, de bebidas y farmacéutica.

Palabras clave: microfluídica; encapsulación de levaduras; hidrogeles; reticulación por UV; biorreactores

Abstract

This work presents the development of a microfluidic platform for the production of hydrogel beads, allowing for the simultaneous encapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. Using this microfluidic device, monodisperse droplets of a photoreactive copolymer (DMAA-MABP-SSNa) were generated, which, upon UV irradiation ($\lambda = 365$ nm), formed stable beads of approximately 1000 μm with a homogeneous size distribution. The metabolic activity of the encapsulated yeast was evaluated through glucose consumption, and their viability and storage capacity were compared against free cells (suspension cultures) at 4 °C and 30 °C for 15 days. Hydrogel beads with the highest polymer concentration (150 mg/mL) maintained over 50% cell viability after 15 days at 4 °C, whereas the viability of free cells declined within a few days. Furthermore, the use of these hydrogel beads significantly reduced the turbidity of the fermentation medium compared to free cells, achieving

a Relative Metabolic Efficiency Index (RMEI) of 0.341. The obtained results position this platform as a robust and versatile alternative for cell storage without refrigeration, and for its use in fermentative bioreactors within the food, beverage, and pharmaceutical industries.

Keywords: microfluidics; yeast encapsulation; hydrogels; UV-crosslinking; bioreactors

Introducción

Las tecnologías microfluídicas se han convertido en una herramienta clave en biotecnología, al ofrecer entornos controlados que permiten observar y manipular procesos celulares en tiempo real (Mozdzierz et al., 2015). Su aplicación ha impulsado avances significativos en ingeniería de tejidos, farmacología y biología molecular, así como en la optimización de procesos fermentativos en la industria alimentaria y de bebidas (Benucci et al., 2021). Una de las aplicaciones más prometedoras es la encapsulación celular en gotas mediante matrices de hidrogel, empleando diversas cepas de levaduras y materiales como alginato de calcio, agarosa o quitosano. Sin embargo, muchos de estos materiales presentan baja reproducibilidad, propiedades mecánicas subóptimas y biocompatibilidad limitada (Westman et al., 2012).

Un método novedoso para producir cápsulas de hidrogel combina microfluídica de gotas con reticulación fotoquímica por inserción C,H (CHic) (Prucker & Brandstetter, 2018). Bajo irradiación UV, unidades de benzofenona incorporadas en la cadena polimérica alcanzan un estado triplete reactivo que extrae átomos de hidrógeno de cadenas vecinas, formando enlaces C–C estables. Este proceso permite la formación simultánea de la matriz de hidrogel y el atrapamiento estable de material biológico dentro de una red porosa altamente ajustable (Alpsoy et al., 2023).

En este trabajo se utiliza la plataforma microfluídica para encapsular células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Laffort Zymaflore VL3) dentro de una matriz copolimérica ternaria (DMAA-MABP-SSNa), generada mediante la reticulación UV a $\lambda = 365$ nm. El objetivo es caracterizar los parámetros morfológicos de las cápsulas resultantes y evaluar cómo la concentración de polímero influye en la estabilidad estructural, la viabilidad celular y la actividad metabólica de las levaduras encapsuladas.

Desarrollo

Se usó un copolímero fotorreactivo sintetizado previamente a partir de N,N-dimetilacrilamida (DMAA), metacriloiloxi benzofenona (MABP) y estirensulfonato de sodio (SSNa) en proporción molar 92,5:5:2,5 (Toomey & Freidank, 2004).

El dispositivo microfluídico consistió en una bomba de infusión de doble jeringa conectada a una unión en T mediante tubing de teflón (500 μ m DI). La fase continua (aceite fluorado) y la fase dispersa (solución de polímero con levaduras) se inyectaron en una relación de flujos 1:5 (1,3:5,6 μ L/min), generando gotas monodispersas que fueron reticuladas bajo lámpara UV (365 nm, 15 y 30 min) (Figura 1). Las cápsulas resultantes se lavaron por centrifugación y filtración, y se resuspendieron en buffer DPBS.

Se evaluaron dos concentraciones de polímero (100 y 150 mg/mL) con un inóculo inicial de 10^7 – 10^8 células/mL. La actividad metabólica se determinó mediante el consumo de glucosa por refractometría, con renovación del medio cada 48 y 72 h. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayo colorimétrico (MTT) durante 15 días de almacenamiento a 4 °C y 30 °C, y la turbidez del medio se midió por espectrofotometría UV-Vis ($\lambda = 600$ nm). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una y dos vías ($p < 0,05$).

HYDROGEL BEADS PRODUCTION

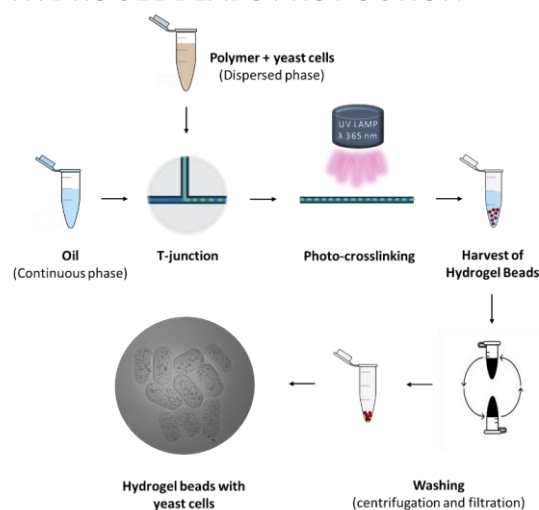


Figura 1. Diagrama de flujo de la producción de cápsulas de hidrogel con levaduras encapsuladas.

Resultados

La plataforma produjo cápsulas de hidrogel monodispersas con una longitud promedio de aproximadamente 1000 μm , tanto para 100 mg/mL ($999,9 \pm 2,8 \mu\text{m}$) como para 150 mg/mL ($998,9 \pm 1,6 \mu\text{m}$) de polímero, confirmando una alta reproducibilidad dimensional. La microscopía óptica y de fluorescencia confirmó la incorporación homogénea de las células de levadura dentro de la red polimérica sin comprometer la estabilidad interfacial del sistema bifásico (Figura 2).

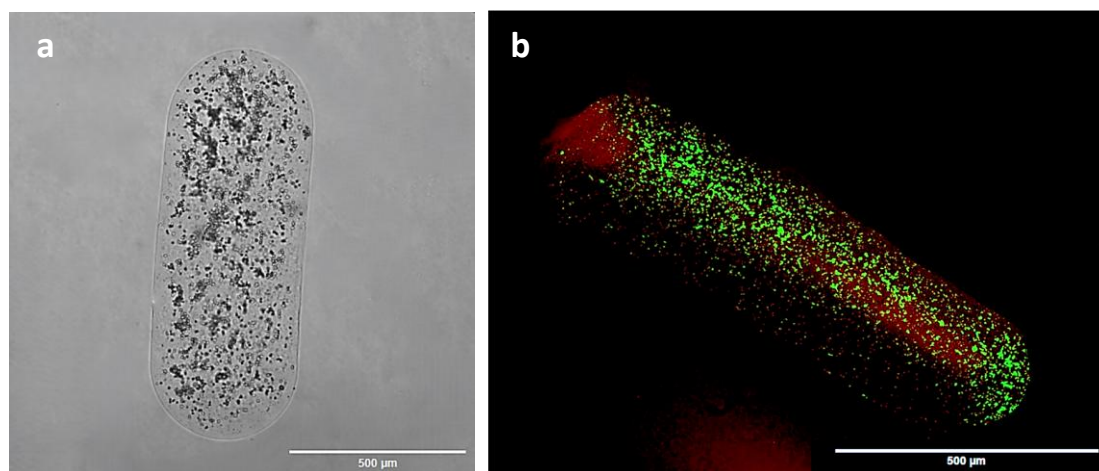


Figura 2. Micrografías de cápsulas de hidrogel con células de levadura. (a) Microscopía óptica. (b) Microscopía de fluorescencia. 10x Magnificación.

El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló diferencias estructurales entre concentraciones: las cápsulas de hidrogel de 100 mg/mL mostraron mayor elasticidad, con expansión de la membrana para acondicionar el crecimiento celular, mientras que las de 150 mg/mL presentaron una matriz más rígida, con ruptura localizada en lugar de expansión, atribuible a una mayor densidad de reticulación (Figura 3).

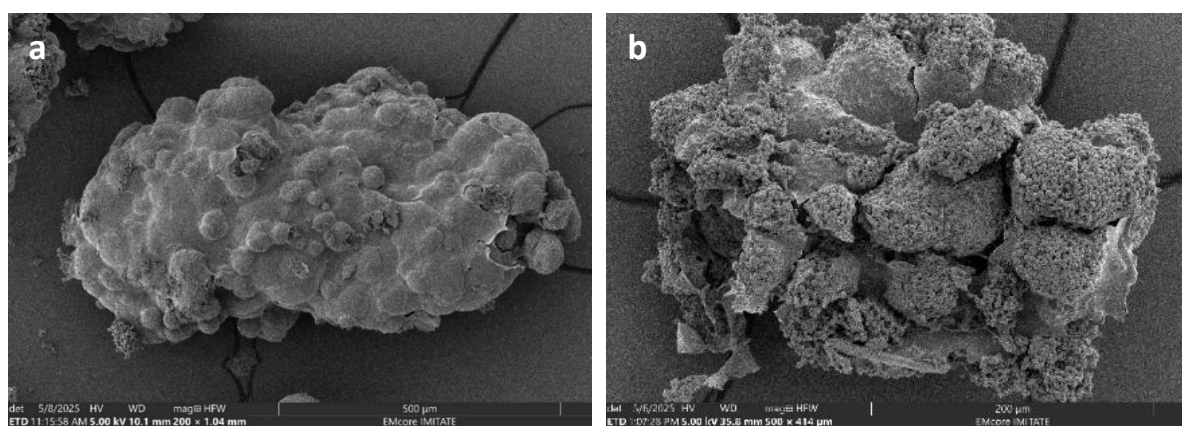


Figura 3. Micrografías SEM de cápsulas de hidrogel con células de levadura a diferentes concentraciones de polímero. (a) 100 mg de polímero. (b) 150 mg de polímero.

En los ensayos metabólicos no se observaron diferencias significativas en el consumo de glucosa entre concentraciones celulares de 10^7 y 10^8 células/mL, lo que sugiere que la difusión a través de la matriz —y no la capacidad biológica— limita la tasa metabólica (Figura 4a). En los ciclos de renovación de 48 h, las cápsulas de 150 mg/mL mostraron mayor actividad metabólica que las de 100 mg/mL, posiblemente por una mayor protección frente al estrés mecánico (Figura 4b).

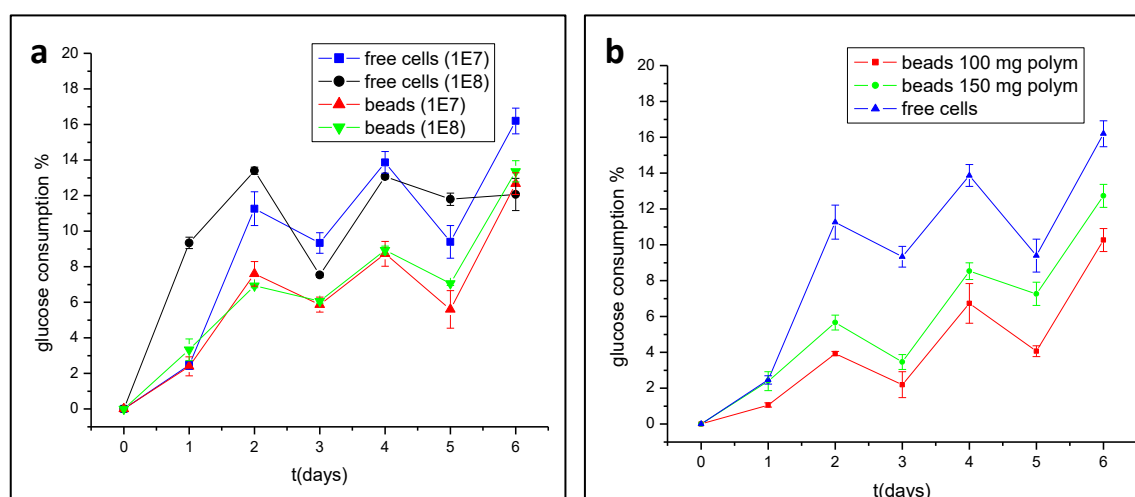


Figura 4. Perfiles cinéticos de consumo de glucosa. (a) A diferentes concentraciones celulares. (b) A diferentes concentraciones de polímero.

Por otro lado, para los ensayos de la viabilidad celular, las células libres almacenadas a 4 °C perdieron más del 80 % de su viabilidad en los primeros tres días, mientras que las células encapsuladas mantuvieron cerca del 90 % de viabilidad a los cuatro días y más del 50 % luego de 15 días (Figura 5). A 30 °C, las células libres se inactivaron completamente entre el día 4 y 5, mientras que las encapsuladas conservaron cerca del 40 % de actividad.

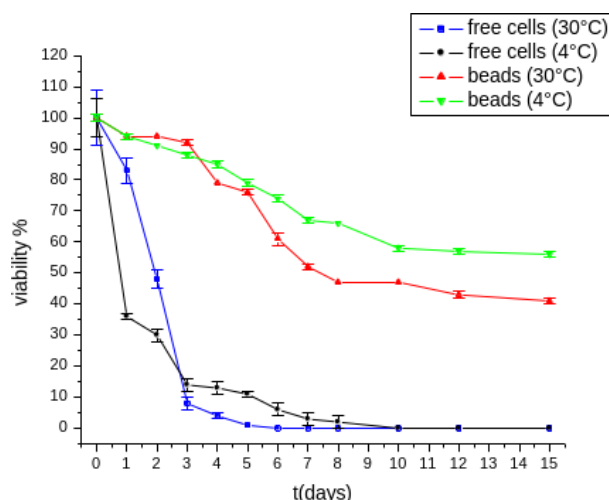


Figura 5. Viabilidad celular en función del tiempo de almacenamiento, para células libres y encapsuladas a 4 °C y 30 °C.

Finalmente, las cápsulas de 150 mg/mL presentaron la menor turbidez del medio de fermentación (44 %) frente a 135 % (100 mg/mL) y 555 % (células libres), alcanzando el mayor Índice de Eficiencia Metabólica Relativa (Tabla 1), lo que evidencia una mayor eficiencia metabólica por unidad de turbidez.

Tratamiento	Glucosa consumida (%)	Turbidez (%)	RMEI
Células libres	15	555	0,027
Cápsulas 100 mg/mL	14,8	135	0,110
Cápsulas 150 mg/mL	15	44	0,341

Tabla 1. Índice de Eficiencia Metabólica Relativa (RMEI) por tratamiento.

Conclusiones

Las cápsulas de hidrogel reticuladas por UV constituyen una plataforma efectiva para el almacenamiento celular sin refrigeración a corto plazo y para la separación de productos fermentados. Los resultados demuestran que la encapsulación en hidrogel permite mantener una alta actividad metabólica de las levaduras mientras se minimiza la turbidez del producto final, y que las cápsulas pueden separarse fácilmente por tamizado simple, lo que podría reducir costos de manufactura, particularmente en la industria cervecera. Asimismo, la encapsulación incrementa significativamente la viabilidad celular incluso en condiciones desfavorables, permitiendo el almacenamiento prolongado sin refrigeración. Estos hallazgos sugieren una estrategia práctica y económica para optimizar procesos en las industrias alimentaria, de bebidas y farmacéutica, mejorando la viabilidad celular durante el transporte y almacenamiento, y simplificando la purificación de productos.

Utilización de IA generativa / herramientas IA

Declaro la utilización de la herramienta IA Claude (Anthropic) y Gemini para su uso en la generación de figuras/diagramas ilustrativos, corrección de texto en inglés y formateo del texto del presente documento. Confirmando que luego de la utilización, los contenidos obtenidos fueron revisados, constatados y editados, asumiendo plena responsabilidad por el contenido presentado en el presente trabajo.

Referencias

- Alpsoy, L., Sedeky, A. S., Rehbein, U., Thedieck, K., & Brandstetter, T. (2023). *Particle ID: A Multiplexed Hydrogel Bead Platform for Biomedical Applications*. *ACS Applied Materials & Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c12122>
- Benucci, I., Cecchi, T., Lombardelli, C., Maresca, D., Mauriello, G., & Esti, M. (2021). Novel microencapsulated yeast for the primary fermentation of green beer: kinetic behavior, volatiles and sensory profile. *Food Chemistry*, 340, 127900. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127900>
- Mozdzierz, N. J., Love, K. R., Lee, K. S., Lee, H. L. T., Shah, K. A., Ram, R. J., & Love, J. C. (2015). A perfusion-capable microfluidic bioreactor for assessing microbial heterologous protein production. *Lab on a Chip*, 15(14), 2918–2922. <https://doi.org/10.1039/c5lc00443h>
- Prucker, O., & Brandstetter, T. (2018). Surface-attached hydrogel coatings via C,H-insertion crosslinking for biomedical and bioanalytical applications (Review). *Biointerphases*, 13(1), 010801. <https://doi.org/10.1116/1.4999786>
- Toomey, R., & Freidank, D. (2004). Swelling Behavior of Thin, Surface-Attached Polymer Networks. *Macromolecules*, 37(3), 882–887. <https://doi.org/10.1021/ma034737v>
- Westman, J. O., Ylittervo, P., Franzén, C. J., & Taherzadeh, M. J. (2012). Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1441–1454. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4517-y>