

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Producción de isobutanol a partir de glucosa en cultivos de
Shimwellia blattae (p424IbPSO): Desarrollo, fenomenología y
modelización**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel García Acedos

Directores

Félix García-Ochoa Soria
Victoria Eugenia Santos Mazorra

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y DE MATERIALES



**Producción de Isobutanol a partir de Glucosa en Cultivos
de *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Desarrollo, Fenomenología
y Modelización**

Memoria que para optar al grado de Doctor presenta

MIGUEL GARCÍA ACEDOS

Directores:

Dr. Félix García-Ochoa Soria y

Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20__

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

El Dr. Félix García-Ochoa Soria, Catedrático de Ingeniería Química, y la Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra, Catedrática de Ingeniería Química, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, realizado en el Departamento de Ingeniería Química y de Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los directores,

Félix García-Ochoa Soria

Victoria Eugenia Santos Mazorra

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas primeras líneas para agradecer a todas y a cada una de las personas que me han acompañado y ayudado durante estos años. Cinco años de Tesis que no hubieran sido iguales sin ellos.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. Félix García-Ochoa y la Dra. Victoria E. Santos Mazorra, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo la Tesis Doctoral y poder dedicarme durante estos años a lo que realmente me apasiona; por haberme enseñado a madurar como investigador; por la paciencia infinita que han tenido conmigo en algunos momentos; y sobre todo por haber estado ahí en todo momento. A los Doctores Miguel Ladero Galán, Emilio Gómez Castro y Pedro Yustos Cuesta, por haber sacado tiempo para ayudarme cuando lo he necesitado. Así mismo, quiero dar las gracias a los Doctores José Luis García López y Beatriz Galán Sicilia, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, por toda su ayuda y por todo lo que he podido aprender en el área de la Biología Molecular gracias a ellos.

Durante los cinco años que he estado trabajando en el laboratorio de “bichos” del grupo FQPIMA he conocido a una gran cantidad de compañeros, la vida en el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ellos. Por ello, quiero dar las gracias a los Doctores Alberto Rodríguez, Susana De la Morena, Vanessa Ripoll y Mateusz Wojtkusik. Ellos son las primeras personas con las que tuve el placer de coincidir al incorporarme a este grupo de investigación y tuvieron la inmensa paciencia de explicarme todo lo necesario para que el trabajo haya salido adelante. Con ellos he compartido risas, estrés, fiestas, charlas, alguna discusión, congresos, viajes y una gran cantidad de momentos que no olvidaré. Cuando cada uno de ellos leía su Tesis Doctoral se quedaba un gran hueco en el laboratorio. A los Doctores Pablo Brea y Cristina Prieto, por las largas charlas en el café en las que ellos intentaban que entendiera sus trabajos de Tesis (creo que aún no lo han conseguido) y por ayudarme siempre que lo he necesitado. Cuando todos ellos se fueron de la Universidad pensé que ya no sería lo mismo, sin embargo, las nuevas “adquisiciones” del grupo vinieron pisando fuerte. En primer lugar, el “Señor” Alberto Ramón, una persona capaz de sacarte una sonrisa en cualquier momento, un gran amigo y siempre dispuesto a ayudarte. En este sentido, quiero agradecer a Andrea Hermida la ayuda que me ofreció durante los meses que estuvo aquí, juntos sacamos adelante un gran trabajo. No quiero olvidarme de Víctor Martín

e Itziar Arias, ellos forman parte de las nuevas generaciones del grupo de investigación y les deseo todo lo mejor para sus respectivas Tesis Doctorales.

A ti Isabel de la Torre, por haber sido la compañera profesional y personal que cualquiera desearía tener. Por ser una de las personas más importantes de mi vida. Gracias por haberme ayudado tanto durante este periodo, gracias por tu paciencia, gracias por ser como eres. Juntos empezamos hace diez años la carrera de Biología, cinco años después comenzamos la aventura de la Tesis Doctoral en Ingeniería Química y cinco años después espero que el destino nos siga dando la oportunidad de compartir juntos tantas experiencias.

En estos agradecimientos quiero aprovechar para dar las gracias a las personas que más se lo merecen, a mi padre, a mi madre y a mi hermana. Gracias a ellos hoy puedo sentirme orgulloso de todo lo que he conseguido, todo se lo debo a ellos. Quiero dar las gracias por todo el apoyo que me han ofrecido a toda la gran familia García y Acedos y, a la familia Pascual, en especial a Raquel y Ana María.

Mis amigos han sido una parte fundamental de esta etapa, ellos han conseguido que en los momentos más difíciles todo fuera mejor y, que los mejores momentos todo fuera aún mejor, gracias a todos (Ana, Jaime, Raquel, Amal, Manu, Marina, Esther, Luis, etc.). Quiero dar las gracias en especial a Marina Sanz y a las casi doctoras Iris Azami y Paloma García, por estar ahí siempre.

Durante el último año de la Tesis he tenido el placer de disfrutar de una estancia de investigación en Lisboa, por ello, quiero dar las gracias a mi tutora durante la estancia la Profesora María A. Reis, así como, a todos mis compañeros de la Planta Piloto de la Faculdade de Ciências de la Universidade Nova de Lisboa: Daniela, Nuno, Bruno, Fernando y Claudia.

No me quiero olvidar de toda la gente del departamento de Ingeniería Química que he tenido la suerte de conocer a lo largo de estos años: Florina, Vicky, Marimar, Cris, Antonio, Sandra, Clara y Priscila. También quiero dar las gracias a los Doctores José Manuel Toledo y María Isabel Guijarro, así como a Inma y a José, por ayudarnos siempre que lo hemos necesitado. Tampoco me quiero olvidar de Paqui, que siempre nos ha sacado una sonrisa cuando le tocaba estar en nuestro laboratorio, aunque se lo encontrase todo “patas arriba”.

Por último, quiero agradecer el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad por financiar la Tesis Doctoral a través de la ayuda para la Formación de Personal Investigador de la cual he sido beneficiario (BES-2014-068344) y por la financiación del Ministerio de los proyectos en que se ha enmarcado esta Tesis Doctoral (CTQ2013-45970-C2-1-R y CTQ2017-84963-C2-1-R). También quiero agradecer al Ministerio la financiación de la estancia en el extranjero que disfrute durante el último año de Tesis. De la misma forma, quiero dar las gracias a la Universidad Complutense de Madrid y al Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas.

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. BIORREFINERÍAS	20
1.1.1.Evolución del concepto de biorrefinería: clasificación	21
1.1.2.Uso de residuos lignocelulósicos como materia prima	23
1.2. BIOCOMBUSTIBLES: FUENTE de ENERGÍA RENOVABLE	32
1.2.1.El isobutanol y el n-butanol como sustitutos del bioetanol.....	34
1.2.2.Mercado de isobutanol como aditivo y combustible.....	37
1.2.3.Otras aplicaciones del isobutanol	39
1.3. PRODUCCIÓN de ISOBUTANOL.....	40
1.3.1.Bioproseso de producción de isobutanol.....	41
1.3.2.Mejoras genéticas en GMOs productores de isobutanol	46
1.3.3.Condiciones fluido-dinámicas en bioprosesos aerobios	48
2. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
3.1. MATERIALES.....	57
3.1.1.Microorganismo empleado.....	57
3.1.2.Reactivos y medios de cultivo.....	58

3.1.3. Equipos empleados.....	58
3.2. MÉTODOS.....	66
3.2.1. Obtención y conservación del microorganismo	66
3.2.2. Cultivos en incubadora orbital y en biorreactor	67
3.2.3. Métodos de Análisis	69
3.2.4. Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión y análisis de la viabilidad celular.....	71
3.2.5. Análisis de proteínas totales	72
3.2.6. Manipulación de ADN: transformación bacteriana.....	73
3.2.7. Métodos matemáticos y herramientas informáticas	77
4. ESTUDIOS EXPERIMENTALES.....	83
4.1. Producción de isobutanol con células en crecimiento.....	85
4.1.1. Publicación 1: Estudio de las condiciones de operación.....	85
4.1.2. Publicación 2: Influencia de la disponibilidad de oxígeno en el flujo de carbono	87
4.1.3. Publicación 3: Efecto de la concentración inicial de sustrato y modelo cinético.....	90
4.2. Producción de isobutanol con células en estado de <i>resting cells</i>	92
4.2.1. Publicación 4: Influencia de las condiciones de crecimiento.....	92
4.2.2. Publicación 5: Efecto de las condiciones fluidodinámicas sobre el crecimiento y las rutas metabólicas	95

4.3. Nuevas construcciones genéticas para la mejora de la producción de isobutanol	98
5. CONCLUSIONES.....	107
5.1. Producción de isobutanol con células en crecimiento.....	107
5.2. Producción de isobutanol con células en estado de <i>resting cells</i>	109
5.3. Nuevas cepas modificadas genéticamente para producción de isobutanol	111
5.4. Conclusiones más relevantes de este trabajo.....	112
5.5. Recomendaciones.....	113
6. CONCLUSIONS	117
6.1. Isobutanol production using growing cells	117
6.2. Isobutanol production using resting cells.....	119
6.3. New strains for isobutanol production	121
6.4. Most relevant conclusions of this work.....	122
6.5. Recommendations	123
7. REFERENCIAS	127
8. ANEXO I: PUBLICACIONES	143

RESUMEN

RESUMEN

TÍTULO

Producción de Isobutanol a partir de Glucosa en Cultivos de *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Desarrollo, Fenomenología y Modelización.

INTRODUCCIÓN

Las sociedades desarrolladas han experimentado un gran incremento en la demanda de combustibles fósiles, debido al aumento de los requerimientos energéticos, al crecimiento de la población mundial y al de su nivel de vida. Los temores por el agotamiento de estas fuentes no renovables y la preocupación por el impacto ambiental, han convertido este problema en una de las grandes preocupaciones de la sociedad actual. Por ello, es preciso desarrollar tecnología para reducir la dependencia y el empleo de combustibles derivados de fuentes fósiles. Numerosos estudios se han centrado en la obtención de sustitutos del bioetanol como combustible. Entre ellos, se encuentra el isobutanol, compuesto que presenta algunas características que lo hacen atractivo, ya que, además de como carburante, puede ser empleado como compuesto base (*platform chemical*) para la obtención de productos de alto valor añadido.

El proceso de producción biotecnológica de isobutanol es un proceso relativamente reciente, la mayoría de los estudios se han centrado en la construcción de diferentes cepas de microorganismos productores. En la literatura se encuentran pocos estudios de desarrollo y optimización del proceso, ni de su fenomenología y modelización. Al igual que en la mayoría de los bioprocesos aeróbicos, el oxígeno juega un papel clave en el bioproceso de producción isobutanol. El estudio de la influencia de las condiciones fluido-dinámicas es determinante para la optimización de las condiciones de operación y el cambio de escala del proceso. La OTR y la OUR, determinan las condiciones fluido-dinámicas a las que puede llevarse a cabo el proceso, ya que puede inducirse la aparición de estrés celular.

OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es la optimización del proceso de producción de isobutanol con *Shimwellia blattae* (p424IbPSO), empleando glucosa como modelo de un

hidrolizado enzimático de la fracción de celulosa proveniente de paja de trigo. Para ello, se han probado dos tipos de operación: primero, con células en estado de crecimiento; en segundo lugar, se ha iniciado el estudio de la producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*. Otros objetivos fundamentales son la determinación de un modelo cinético del proceso y el estudio de la fenomenología; el acople entre el transporte y consumo de oxígeno y el posible stress hidrodinámico.

RESULTADOS

Para la optimización del proceso empleando células en crecimiento, se ha determinado, primero, la composición del medio de cultivo óptima y, después, las condiciones óptimas de operación. Se ha establecido que la concentración inicial de sustrato óptima es 45 g.L^{-1} , observando que con concentraciones superiores a 50 g.L^{-1} se inhibe la producción de isobutanol. Empleando las condiciones óptimas se han obtenido 11 g.L^{-1} de isobutanol.

Se ha formulado un modelo cinético capaz de describir la evolución de los componentes clave: biomasa, glucosa, isobutanol y subproductos. También se ha llevado a cabo un estudio acerca de la influencia del oxígeno y de las condiciones fluido-dinámicas en el proceso.

Los resultados del estudio de la influencia del oxígeno en el proceso muestran una distribución de productos que varía notablemente en función del oxígeno disponible. En los experimentos realizados con baja disponibilidad de oxígeno, los productos mayoritarios son ácido láctico y etanol; mientras que, en los experimentos con alto nivel de oxígeno, los productos mayoritarios son isobutanol y ácido acético. Se ha establecido que la producción de isobutanol en condiciones aeróbicas es baja, ya que el flujo de carbono se desvía hacia la producción de otros compuestos no descritos previamente en este bioproceso. Se han identificado dichos compuestos, lo que ha permitido establecer un esquema metabólico para la producción de isobutanol con *S. blattae* (p424IbPSO) en función de la disponibilidad de oxígeno.

Se ha probado la producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*. Se determinó que esta cepa tiene capacidad para producir isobutanol en dicho estado y se ha

optimizado la etapa de obtención de biomasa mediante un diseño experimental tipo Taguchi, a escala de incubadora orbital, determinando el medio de cultivo y la temperatura óptimos. Se ha observado que las células presentan mayor actividad si son recolectadas a edades tempranas. Una exposición prolongada a elevadas concentraciones de IPTG y temperatura, inducen la formación de cuerpos de inclusión en las células, que inhiben la producción.

Se ha estudiado la optimización de la producción de biomasa a escala de STBR, comprobando el efecto de las condiciones fluido-dinámicas durante el crecimiento. Los resultados muestran que la velocidad de crecimiento aumenta hasta una velocidad de agitación de 600 rpm; se mantiene constante hasta 1000 rpm y disminuye en los experimentos con agitación superior a 1200 rpm. Se ha comprobado que la viabilidad y la integridad celular se empiezan a ver comprometidas a partir de 800 rpm. Estos efectos negativos se deben principalmente a las velocidades de cizalla que se producen en el fluido y que inducen estrés hidrodinámico. Por otro lado, los cambios en OTR-OUR modifican la distribución de los metabolitos producidos, tanto en experimentos con células en crecimiento como en *resting cells*. Se determinó que la agitación óptima para la obtención de biomasa es 400 rpm. Además, se ha observado que las células producidas bajo diferentes condiciones fluido-dinámicas presentan una distribución de metabolitos diferente en las pruebas de *resting cells*, aun cuando dichas pruebas son realizadas en las mismas condiciones.

Por último, se ha procedido a la construcción genética de diferentes cepas con el fin de mejorar la capacidad de producción de isobutanol en condiciones anaeróbicas. Como las mejores condiciones para producir isobutanol son en ausencia de oxígeno y, sin embargo, la ruta de *S. blattae* (p424IbPSO) necesita cofactores reducidos (NADPH), que se producen en condiciones aeróbicas, se han propuesto diversas construcciones genéticas. Primero insertando un gen que codifica para una alcohol-deshidrogenasa no dependiente de NADPH, que mejora la producción de isobutanol. Dicha producción mejora aún más cuando se inserta una enzima transhidrogenasa que mantiene un equilibrio entre las concentraciones de NADH/NADPH en condiciones anaeróbicas. Aun así, se ha observado que la inserción de un plásmido adicional en la cepa genera estrés.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han conseguido establecer las condiciones óptimas para la producción de isobutanol a partir de glucosa con *S. blattae* (p424IbPSO) como biocatalizador.

Se ha demostrado la capacidad de dicha cepa para producir isobutanol en estado de *resting cells* y se han determinado las condiciones óptimas para el crecimiento de biomasa productora de isobutanol.

Se ha formulado y determinado un modelo cinético que describe la evolución del proceso con el tiempo (biomasa, glucosa, isobutanol y subproductos) en distintos experimentos, que utilizan diferente concentración inicial de glucosa, con muy buen ajuste. Todos los resultados que se han obtenido en este trabajo evidencian la importancia del oxígeno como nutriente esencial y su papel sobre el metabolismo, así como la importancia del estudio de las condiciones fluido-dinámicas en los bioprocesos de producción aeróbicos y, en particular, sobre el proceso de producción de isobutanol.

También se ha puesto de manifiesto la importancia que tiene la ingeniería de cofactores para la producción de isobutanol, lo cual puede ser extrapolable a todos aquellos bioprocesos que requieran NADPH en condiciones anaeróbicas para la síntesis de compuestos de interés industrial.

SUMMARY

SUMMARY

THESIS TITLE

Isobutanol Production from Glucose in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) Cultures: Development, Phenomenology and Modelling.

INTRODUCTION

In recent years, developed societies have experienced a great increase in the demand for fossil fuels, due to the increase in energy requirements, the growth of the world population and also the standards of living. The depletion of these non-renewable sources and their environmental impact has made this problem one of the biggest concerns of today's society. Therefore, it is necessary to develop technology to reduce the dependence and use of fossil fuels. Nowadays, numerous studies have focused on obtaining substitutes for bioethanol as a fuel. Among them, isobutanol is a compound with some characteristics making it very attractive, since, in addition to being used as a fuel, it can also be used as “platform chemical” to obtain products with added value.

Biotechnological process for isobutanol production is a process recently proposed; most studies on it have focused on the construction of different strains of microorganisms producing isobutanol. In the literature, there are few studies on development and optimization of the process, nor of its phenomenology and kinetic modelling. As in most aerobic bioprocesses, oxygen must play a key role in the isobutanol production bioprocess. Thus, the study of the influence of fluid-dynamic conditions is decisive for the optimization of operating conditions and the scale-up of the process. Fluid-dynamic conditions determine OTR and OUR values; thus, the process performance would be different depending on those conditions; moreover, appearance of cellular stress can be induced.

OBJECTIVES

The main objective of this work is the optimization of the isobutanol production process by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) as biocatalyst, using glucose as a model of an enzymatic hydrolysate of wheat straw. To this objective, two types of operation have been tested: firstly, isobutanol production with growing cells; and secondly, production of isobutanol in resting cells. Other fundamental objectives are to determine a kinetic model

of the process and to study the phenomenology, the coupling between oxygen transport and consumption and possible hydrodynamic stress.

RESULTS

In order to optimise the process with growing cells, the composition of the optimum culture medium has first been determined and then the optimum operating conditions. It has been established that the initial optimum substrate concentration is 45 g.L⁻¹, being the process inhibited for initial glucose concentrations up to 50 g.L⁻¹. Under the optimal conditions, 11 g.L⁻¹ of isobutanol has been obtained.

A kinetic model has been determined to describe the key components evolution: biomass, glucose, isobutanol and by-products. A study of the influence of oxygen and fluid-dynamic conditions on the isobutanol production process has also been carried out.

The results of oxygen influence show a distribution of products that varies considerably depending on oxygen availability. In the experiments performed with low oxygen availability, main products were lactic acid and ethanol; while in experiments with high oxygen levels, the main products were biomass, isobutanol and acetic acid. It has been established that isobutanol production is low under aerobic conditions, as the carbon flux is diverted to the production of other compounds not described previously in this bioprocess. These compounds have been identified, which has allowed the establishment of a metabolic scheme for the production of isobutanol with *S.blattae* (p424IbPSO) oxygen dependant.

The production of isobutanol has been tested in resting cells operation. It was determined that this strain has the ability to produce isobutanol in this way. The biomass obtaining stage has been optimized by means of a Taguchi experimental design at an orbital shaker scale, in which optimal culture medium and growth temperature were determined. It has been observed that cells present greater activity if they are collected at an early age. Prolonged exposure to high concentrations of IPTG and temperature induce the formation of inclusion bodies into cells, which cause inhibition of isobutanol production.

Optimization of biomass production at STBR scale has been studied, checking the effect of fluid-dynamic conditions during growth. Results show that growth rate increases

up to a stirring speed of 600 rpm; remains constant up to 1000 rpm and decreases in experiments with stirring speed greater than 1200 rpm. It has been proven that viability and cell integrity begin to be compromised from 800 rpm upwards. These negative effects are mainly due to shear rates in the fluid able to induce hydrodynamic stress on cells. On the other hand, changes in OTR-OUR modify the distribution of metabolites produced, both in growing cultures and in resting cells. It was determined that the optimal stirrer speed for obtaining biomass is 400 rpm. In addition, it has been observed that cells produced under different fluid-dynamic conditions present a different distribution of metabolites in the resting cells tests, even when these tests are performed under the same conditions.

Finally, different strains have been constructed in order to improve isobutanol production under anaerobic conditions. The best conditions for isobutanol production are in the absence of oxygen, but the *S. blattae* (p424IbPSO) metabolic pathway requires reduced cofactors (NADPH), which are produced under aerobic conditions. Accordingly, several genetic constructs have been proposed. Firstly, by inserting a gene coding for an alcohol dehydrogenase not dependent on NADPH, which increases isobutanol production. The production rate is further developed when a transhydrogenase enzyme is inserted, as it maintains the balance between NADH/NADPH concentrations under anaerobic conditions. However, it has been observed that the insertion of an additional plasmid in the strain generates stress.

CONCLUSIONS

This work has succeeded in establishing optimal conditions for the isobutanol production from glucose using *S. blattae* (p424IbPSO) as a biocatalyst.

The capacity of this strain to produce isobutanol in a resting cell state has been demonstrated and the optimal conditions for the growth of isobutanol-producing biomass have been determined.

A new kinetic model that describes the evolution of the process (biomass, glucose, isobutanol and by-products) in different experiments has been formulated and determined, being able to reproduce experimental data. Results obtained in this work show the importance of oxygen as an essential nutrient and its role in metabolism, as well as the

importance of studying fluid-dynamic conditions in aerobic production bioprocesses and, in particular, in the isobutanol production process.

The importance of co-factor engineering for isobutanol production has also been highlighted, which can be extrapolated to all those bioprocesses that require NADPH under anaerobic conditions for the synthesis of compounds with industrial interest.

A close-up photograph of several golden wheat stalks, showing the intricate details of the grain heads and the fine hairs on the awns. The lighting is warm, highlighting the texture and color of the wheat. A semi-transparent text box is overlaid on the center of the image.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la sociedad se enfrenta a dos grandes retos, el primero, es el agotamiento de las fuentes de combustibles fósiles, y el segundo, es el incremento en la generación de residuos y emisiones [1]. El agotamiento de combustibles fósiles se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la sociedad ya que la demanda no ha dejado de crecer en las últimas décadas. Este aumento en la demanda de combustibles fósiles se debe principalmente al crecimiento de la población mundial y de su nivel de vida y, por lo tanto, al aumento de los requerimientos energéticos. En la *Figura 1.1* se puede observar la evolución del consumo de las distintas fuentes de combustibles fósiles desde el año 1850. Como puede observarse, desde la Segunda Revolución Industrial el consumo de combustibles fósiles ha crecido notablemente, haciéndose más acusado a partir del año 1950 aproximadamente. Además, algunas de las economías emergentes del mundo, como China o India, están experimentando un gran crecimiento, que en el año 2017 fue del 6,9 % y del 6,6 % en el PIB, respectivamente; sobre todo, si se compara con la tasa de crecimiento del PIB mundial que se situó en el 3,2 % y el de la Unión Europea, en un 2,4 % [2]. Se estima que hasta el año 2025 se producirá un incremento en el consumo de energía del 57 % respecto del consumo en el año 2002, desde 435 trillones de MJ hasta 681 trillones de MJ. Se ha estimado que el consumo de petróleo se incrementará en un 35 % desde el año 2004 hasta el año 2025, pasando de un consumo diario de 82 millones de barriles a 111 millones de barriles diarios. Del mismo modo, en la *Figura 1.1* se puede ver el precio medio anual del barril de petróleo desde el año 1978, observándose que el citado precio ha aumentado exponencialmente hasta la actualidad. En los últimos años, el precio de los combustibles fósiles ha registrado fuertes fluctuaciones, registrando máximos históricos y también precios muy bajos. Entre los años 1978 y 2001 el precio medio del petróleo se incrementó en un 69 %, el barril pasó de 13 \$/barril a costar 22 \$/barril y durante el periodo transcurrido entre los años 2001 y 2018 el precio del petróleo se ha incrementado en un 273 %, pasando de costar 22 \$/barril a 82 \$/barril [3]. Hay que remarcar que el aumento en el precio del petróleo lleva consigo un aumento en el precio de todos los compuestos y productos derivados del mismo, como pueden ser la mayoría de los polímeros y algunos disolventes, que también registran aumentos en su demanda.

Por otro lado, el uso de combustibles fósiles está causando otros problemas que se suman a los anteriores; entre ellos destaca el impacto ambiental que genera su uso. La producción de los denominados gases de efecto invernadero (GEI), en la combustión de los combustibles fósiles, está desencadenando una serie de problemas ambientales, siendo los principales responsables de un posible rápido cambio climático a nivel mundial. Tal y como se explica en el Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), el aumento de la concentración de CO₂ y de la temperatura del planeta es inequívoco, y durante el periodo 1880 y 2012 se han producido aumentos de la concentración de CO₂ de 275 a 400 ppm y de la temperatura de la Tierra de 0,85 °C [4, 5]. En la *Figura 1.2A*, se puede observar la evolución de las emisiones de CO₂ por regiones del mundo desde 1850. La emisión de GEI coincide con el comienzo de la Segunda Revolución Industrial, debido al aumento en el consumo de combustibles fósiles como se puede ver en la *Figura 1.1*. Además, en la *Figura 1.2A*, también se puede apreciar que se produce un incremento en las emisiones de CO₂ más acusado desde 1950, cuando el consumo de combustibles fósiles también se incrementa. En la *Figura 1.2B*, se puede observar las fluctuaciones de la temperatura entre el mar y la tierra en comparación con la temperatura media del periodo de 1961 a 1990. Como se puede ver, en los últimos años se ha producido un aumento de la temperatura, y la tendencia es a seguir aumentando. Los expertos en el área del cambio climático indican que si no se toman medidas drásticas en cuanto a la emisión de gases de efecto invernadero la temperatura de la Tierra puede llegar a aumentar entre 2,6 y 4,8 °C a finales de este siglo [6]. Este aumento estimado en la temperatura de la Tierra puede tener consecuencias catastróficas en un futuro. Las emisiones de CO₂ en el año 2014 ya eran de 35,7 GT.año⁻¹, y se estima que actualmente ya se ha superado el límite de emisiones propuesto para los próximos 30 años [6, 7]. La OMS ha estimado que el número de muertes humanas entre el año 2030 y 2050 provocadas por el cambio climático serán de 250.000 muertes adicionales por año, y la misma organización asegura que es una predicción bastante conservadora respecto de los efectos que probablemente suponga el cambio climático [6, 8]. Por lo tanto, el cambio climático es considerado como la mayor amenaza para la salud mundial del Siglo XXI [9]. Así mismo, recientes estudios han predicho que el cambio climático también puede tener consecuencias negativas en la economía mundial, ya que de no corregirse este problema medioambiental se puede llegar a producir una disminución del PIB mundial cercana al 3,3 % en 2060 [10].

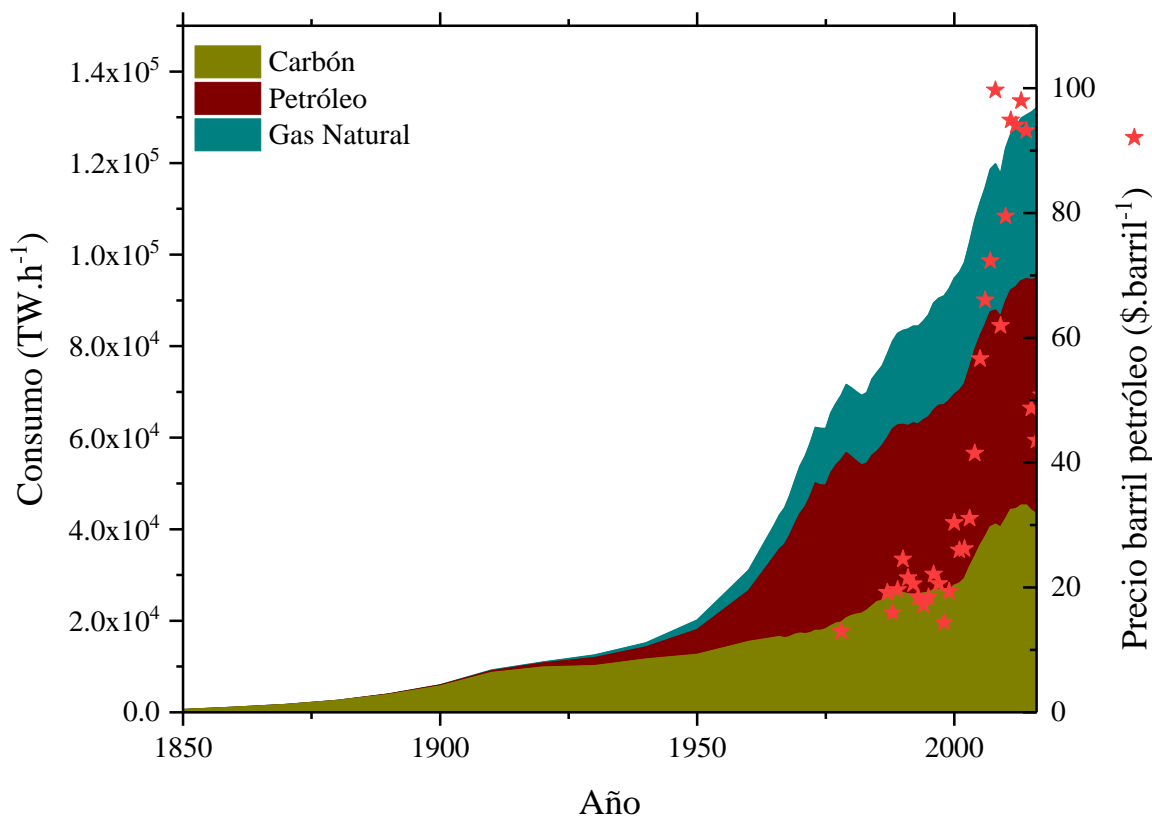


Figura 1.1. Evolución del consumo de combustibles fósiles (eje izquierdo, en TW/h) [11] y evolución del precio (en \$/barril, eje derecho) [12].

Durante las últimas décadas, numerosas investigaciones se han centrado en obtener soluciones frente al agotamiento de los combustibles fósiles y el impacto ambiental que conlleva su uso. En el año 1900 se presentó, en la Exposición Universal de París, el primer motor que quemaba aceite de cacahuete, que luego es sustituido por productos provenientes del petróleo. No es hasta los años 70, a raíz de las crisis del petróleo (especialmente la de 1979), cuando surge la idea de los biocombustibles como sustitutos “verdes” de los combustibles fósiles [13, 14]. Con la extensión del uso de la Biotecnología Industrial, que conllevó las primeras modificaciones genéticas de microorganismos para la producción industrial de biocombustibles, la producción de etanol y de biodiesel se estableció de forma significativa en la década de los años 80 [3]. La aparición del concepto de “biorrefinería”, para la producción de biocombustibles a partir de materia orgánica supone un gran hito. Algunos autores han denominado la consolidación de la Biotecnología Industrial y su aplicación en las biorrefinerías, como la Tercera Revolución industrial [15, 16]. En un primer momento, la materia prima para obtener estos biocombustibles fueron cultivos

(cosechas), que competían por el terreno cultivable con la producción de alimentos, entre ellos semillas, grano y azúcares [1]. A los biocombustibles obtenidos a partir de estas fuentes se los denominó biocombustibles de primera generación (G1). Debido a la controversia que ha generado la competencia con la producción de alimentos, lo que conllevaría a una reducción de alimentos disponibles para la población en ciertas regiones subdesarrolladas del mundo, surgió la idea de los biocombustibles de segunda generación (2G). Estos biocombustibles de segunda generación son obtenidos a partir de residuos, principalmente agroalimentarios y forestales [17].

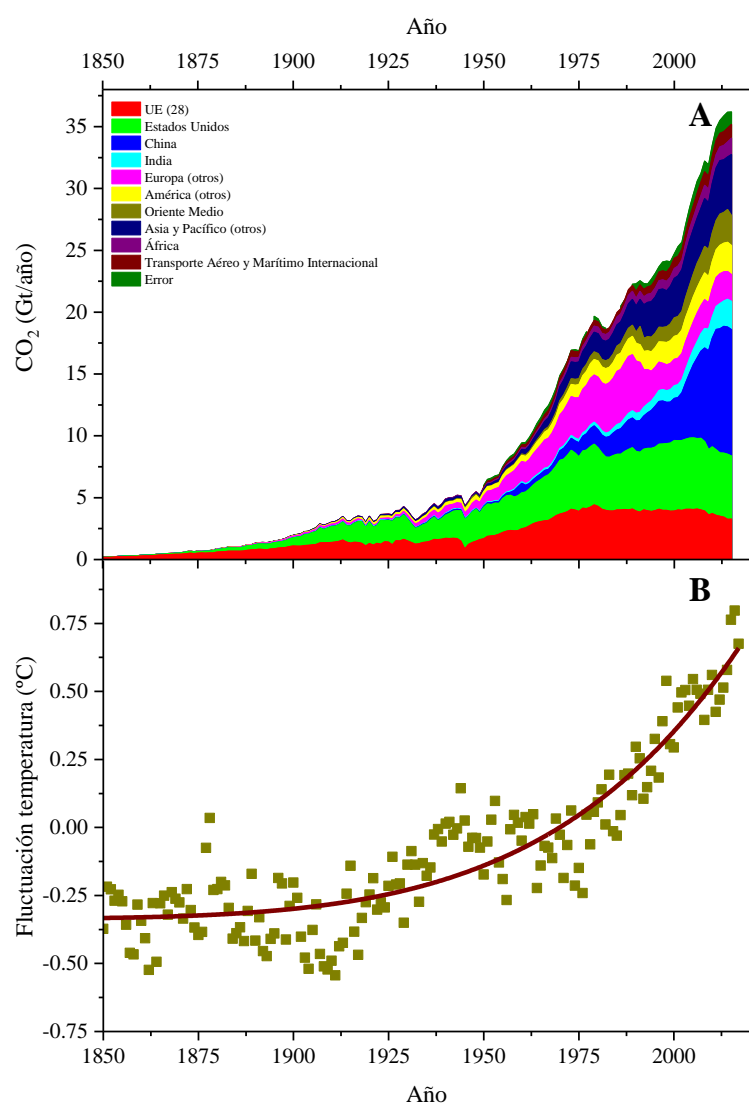


Figura 1.2. Evolución de las emisiones de CO₂ desde 1850 hasta la actualidad (Figura 1.2A) y fluctuación de la temperatura media mundial entre la tierra y el mar en relación con la temperatura media de 1961-1990 en °C (Figura 1.2B). Fuente [11].

El bioetanol, como sustituto de la gasolina, es el gran protagonista en el mercado de los biocombustibles actualmente. Como se observa en la *Figura 1.3* la producción mundial de bioetanol es superior a la producción de biodiesel. Además, las proyecciones para los próximos años siguen dando un papel protagonista al bioetanol en la producción de biocombustibles frente a la producción de biodiesel [18]. Pero, el uso de bioetanol como combustible presenta una serie de problemas, entre ellos, su baja densidad energética en comparación con la gasolina y las dificultades que presenta en sus sistemas de distribución (no compatibles con los sistemas de distribución de la gasolina). Además, la cantidad de bioetanol que puede ser mezclado con la gasolina para su uso en vehículos está limitada por las regulaciones ambientales y por la propia compatibilidad del bioetanol en los motores gasolina actuales[19]. Por todo ello, en los últimos años, se han desarrollado numerosas investigaciones para la obtención de alternativas al bioetanol como sustituto de la gasolina. Entre estos compuestos está el isobutanol, hidrocarburo que presenta una serie de ventajas respecto al bioetanol [19], estas ventajas serán detalladas con más profundidad posteriormente en este trabajo.

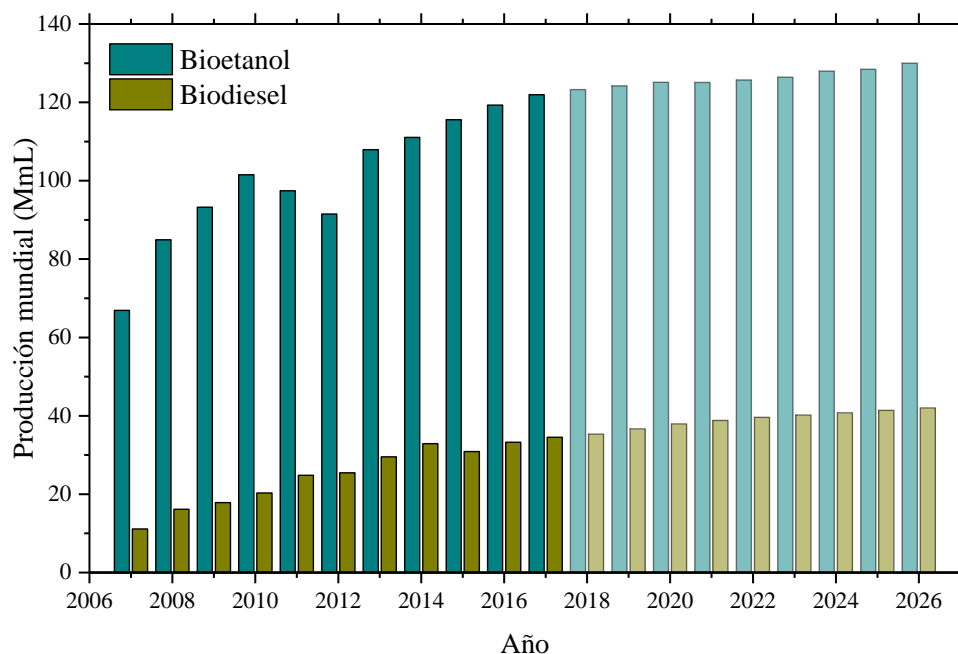


Figura 1.3. Producción mundial (Mil millones de litros) de bioetanol y biodiesel desde el año 2007 hasta el 2017 y predicción de la producción mundial de ambos hasta 2026. Fuente [18].

Como se ha comentado anteriormente la generación de residuos y emisiones es el segundo gran reto al que se enfrenta la sociedad actual [1]. Del total de residuos producidos a nivel mundial, 3 millones de toneladas diarias, el 50% son materia orgánica [1]. Estos residuos incluyen restos agrícolas y forestales, desechos domésticos, y residuos de la industria alimentaria y de otras industrias [17]. La gestión de estos residuos orgánicos incluye actualmente su uso para alimentación animal y el compostaje, la incineración y el vertido controlado en vertederos acondicionados [1]. La incineración de residuos orgánicos contribuye a la producción de gases de efecto invernadero, que también se produce en los vertederos, aunque en menor cantidad. Una de las soluciones propuestas para este problema es el empleo de residuos orgánicos como materia prima, principalmente la denominada biomasa, para obtener combustibles y productos químicos de base. Como ya se ha indicado, por los problemas generados, las biorrefinerías para aprovechar estos residuos orgánicos son las llamadas de segunda generación, tratando de combinar diversidad de materias primas y de productos obtenidos, a ser posible algunos de alto valor añadido, lo que otros autores han denominado “biorrefinerías integradas” [20, 21].

1.1. BIORREFINERÍAS

El concepto de biorrefinería, que nace como ya se ha indicado en la década de los 70, cobra relevancia décadas después. Actualmente, goza de la atención de grandes empresas, de responsables políticos y de la industria y, sobre todo, de los investigadores a nivel mundial que consideran la idea de biorrefinería, aunque tenga que pulirse, como el futuro de una economía sostenible [22-24]. La bio-economía puede entenderse como una economía derivada de una industria en la que las materias primas y la energía empleadas derivan de recursos renovables, como pueden ser las fuentes vegetales y animales [25]. Actualmente, se considera que las biorrefinerías son el futuro para los algunos sectores industriales, de forma que puedan sobrevivir en una economía global cambiante y más competitiva; así como una importante vía para reducir la demanda de combustibles fósiles y hacer frente al desafío medioambiental que supone el cambio climático y la acumulación de residuos [1, 26]. En consecuencia, las biorrefinerías pueden suponer una contribución importante al uso eficiente de recursos y materias primas [27].

1.1.1. Evolución del concepto de biorrefinería: clasificación

A pesar de que algunas biorrefinerías ya están implantadas a escala industrial, el concepto de biorrefinería aún no ha sido definido plenamente. Todas las aproximaciones que se han hecho a este concepto coinciden en que las biorrefinerías llevan a cabo un procesamiento de biomasa para obtener una gama de diferentes productos [26]. El primer registro que se tiene de este término, en el año 1981, describe un proceso en tres etapas, en el cual, mediante la fermentación de biomasa, se obtenían una serie de ácidos orgánicos, que posteriormente, mediante un proceso de electrólisis de los ácidos, se obtenían combustibles y productos químicos similares a los obtenidos en una refinería tradicional de petróleo [28]. La mayoría de las definiciones que existen para el concepto de biorrefinería tienen en común el empleo de la analogía que existe con las refinerías tradicionales del petróleo, algunas de las definiciones más relevantes se pueden ver resumidas en la *Tabla 1.1*. Como se puede ver en dicha tabla, en un primer momento las definiciones de biorrefinería se basaban en la idea de la conversión de biomasa en combustibles y productos. Uno de los cambios más importantes en la definición de biorrefinería fue promovido por la Agencia Internacional de Energía [24], que introdujo dentro de la definición de biorrefinería el concepto de sostenibilidad. La sostenibilidad dentro de este concepto implica que estas instalaciones deben usar materias primas renovables con un procesamiento respetuoso con el medio ambiente, y que, además, estas materias primas se deben procesar de manera sostenible para obtener productos que sean también sostenibles. Según Koltuniewicz & Dabkowska (2016), para que una biorrefinería cumpla con el principio de sostenibilidad debe emplear materias primas que procedan de biomasa procesada, se deben emplear reactivos y obtener productos que sean biodegradables [29].

La clasificación de los diferentes tipos de biorrefinerías es otro punto en el que todavía no se ha llegado a un consenso [26]. En un primer momento, las biorrefinerías se catalogaron en función de las materias primas empleadas (azúcares libres, semillas, biomasa forestal, etc.) y por las tecnologías empleadas para el tratamiento de la biomasa y la obtención del producto de interés (procesos químicos, termoquímicos y procesos bioquímicos) [26, 30, 31].

Con la evolución del concepto de biorrefinería, ha sido necesario comprender las diferencias entre los distintos tipos de biorrefinerías, lo que generó un debate sobre las

diferentes generaciones. Por ello, se propuso una tercera clasificación para estas instalaciones.

Tabla 1.1. Definiciones más destacadas del concepto de biorrefinería

<i>Definición del concepto</i>	<i>Ref.</i>
Una fábrica que integra procesos de conversión de biomasa y equipamiento para producir combustibles, energía y productos.	[32]
Las biorrefinerías son sistemas en los que la biomasa se puede utilizar en su totalidad mediante la conversión de la misma a través de múltiples procesos en una serie de productos de valor añadido	[33]
Una biorrefinería es una fábrica que integra procesos de conversión de biomasa y equipos para producir combustibles, energía y productos químicos a partir de biomasa. Considerando el proceso de biorrefinería como un análogo a las refinerías tradicionales del petróleo, las cuales producen combustibles y diferentes productos a partir del petróleo.	[34]
La biorrefinería es la transformación sostenible de la biomasa en una gama de productos de valor añadido, basados en la biotecnología y la bioenergía.	[24]

Esta última clasificación se centra en la evolución de las biomásas empleadas como materia prima en las biorrefinerías a lo largo de estos años y el efecto que tiene el empleo de los diferentes materiales en la economía y en la sociedad. Esta clasificación diferencia tres generaciones [17]:

- **Biorrefinerías de primera generación**, que tienen como principal característica el empleo de materia orgánica que procede directamente de una potencial fuente de alimentación, animal o vegetal. Por ejemplo, el empleo de granos de maíz para la producción de bioetanol, o grasas animales y vegetales para la producción de biodiesel.
- **Biorrefinerías de segunda generación**, que surgen como solución a los problemas de competencia de las anteriores con la producción de alimentos, y se orientan a la producción de biocombustibles y otros compuestos de valor añadido. Por ello, las plantas de segunda generación emplean residuos agrícolas, forestales, domésticos e industriales, que no sean una fuente de alimentos, como puede ser la paja del trigo,

la merma de algunos frutos o los restos de poda, así como otro tipo de residuos, de la industria agro-alimentaria, principalmente.

- **Biorrefinerías de tercera generación**, que emplean micro-algas y algas macroscópicas como materia prima para producir combustibles y otros productos de valor añadido.

Los productos obtenidos deben ser capaces de sustituir a los combustibles fósiles procedentes de las refinerías del petróleo y los compuestos derivados del mismo que no sean utilizados como fuente de energía, como compuestos intermedios y algunos polímeros. En este sentido, los productos de las biorrefinerías, pueden ser clasificados en dos grupos: biocombustibles o compuestos energéticos, y compuestos no energéticos con mayor valor añadido [17]. Los productos o compuestos energéticos más importantes obtenidos son:

- Biocombustibles gaseosos (gas de síntesis, hidrógeno, metano).
- Biocombustibles sólidos (pellet, lignina, carbón vegetal).
- Biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel, isobutanol, n-butanol, aceites).

Por otro lado, están los compuestos que no son utilizados para producir directamente energía, entre ellos:

- Compuestos químicos (productos químicos intermedios, denominados *building blocks* y *platform chemicals*) [17].
- Ácidos orgánicos (succínico, láctico, itacónico, hialurónico y otros).
- Biopolímeros y resinas (plásticos, resinas fenólicas y furánicas, entre otros).
- Componentes de alimentos, piensos y fertilizantes.

1.1.2. Uso de residuos lignocelulósicos como materia prima

La biomasa lignocelulósica (BLC) es una de las materias primas más abundantes utilizables para la producción de biocombustibles de segunda generación. Estos materiales son residuos, así que no compiten por el suelo cultivable con la producción de alimentos, tanto para humanos o como para ganadería [35, 36], además su utilización contribuye a la sostenibilidad medioambiental [35]. Una de las características más interesantes de este material es que puede ser utilizado a gran escala a partir de diferentes materias primas de bajo coste [37], como pueden ser residuos domésticos, residuos industriales, residuos forestales y residuos agrícolas, entre otros [35]. De estos residuos, actualmente, los más

prometedores son la paja de maíz en Estados Unidos, el bagazo de caña en América del Sur, la paja de arroz en Asia, y la paja de trigo en Europa [35, 38]. La BLC constituye la mayor fuente de materia prima renovable para las biorrefinerías a nivel mundial.

Composición de la biomasa lignocelulósica (BLC)

La BLC está principalmente formada por tres fracciones: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa representa entre un 30 % y un 50 % del total, la hemicelulosa se encuentra entre un 15 % y un 35 % y la lignina supone de un 10 % a un 20 % [39]. En la *Figura 1.4* se puede observar un esquema de la estructura y composición del material lignocelulósico.

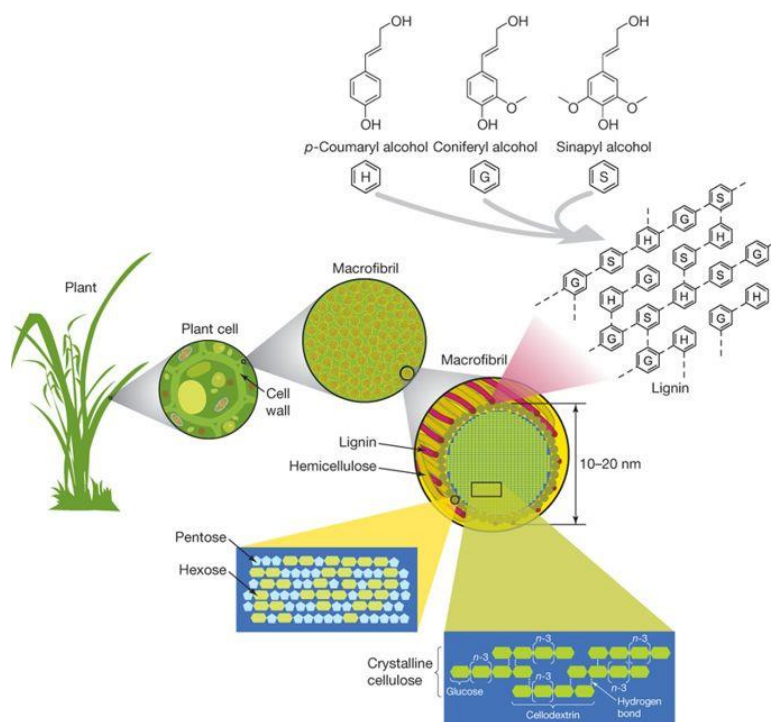


Figura 1.4. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Rubin (2018) [40].

La **celulosa** es un homo-polisacárido estructural, forma parte de la pared celular de las plantas. Este homo-polisacárido está compuesto de monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4-O-glucosídicos, pudiendo llegar a alcanzar varios miles de unidades de glucosa de longitud. Los enlaces puente de hidrógeno intra- e inter-catenarios producen una estructura cristalina de gran dureza [35]. Mientras que los materiales compuestos por almidón (un homo-polisacárido de reserva energética vegetal) necesitan una temperatura

de 60 a 70 °C para deshacer su estructura cristalina, la celulosa necesita la aplicación de 320 °C y una presión de 25 MPa para perder su estructura cristalina en agua. Algunos vegetales, como el algodón o el lino, son las fuentes más puras de celulosa, ya que contienen entre un 80 y un 95 % de celulosa, mientras que las plantas leñosas solo contienen un 45 % de celulosa. Los residuos vegetales suelen contener un valor muy próximo al 50 %.

La **hemicelulosa** es el segundo componente más abundante de la BLC. Se trata de un hetero-polímero de estructura amorfa, compuesto por pentosas y hexosas (D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y D-glucosa) y azúcares ácidos o ácidos urónicos (D-glucorónico, D-galacturónico y ácidos metilgalacturónicos) [41]. El esqueleto de la hemicelulosa lo forman subunidades de xilano con enlaces β (1→4) entre la D-xilosa (90 %) y la L-arabinosa (10%). Las ramificaciones que tiene esta cadena central, de xilosa y arabinosa, varían dependiendo de la naturaleza del material lignocelulósico [41]. Las hemicelulosas de la madera blanda presenta generalmente glucomananos (manosa y glucosa acetilada), mientras que las hemicelulosas de madera dura presentan con mayor frecuencia xilanos [42]. La hemicelulosa se dispone entre las microfibras de celulosa, proporcionando una consistencia alta a la estructura fibrilar final [39]. El principal problema que ofrece la hemicelulosa es que necesita una amplia variedad de enzimas para ser hidrolizada por completo.

El último componente de la materia lignocelulósica es la **lignina**. La lignina es un biopolímero aromático y rígido, con un alto peso molecular (10000 Da). Se une mediante enlaces covalentes a los xilanos de la fracción hemicelulósica, lo que confiere rigidez a la pared celular. Está compuesta por tres monómeros fenólicos de alcohol fenilpropiónico: alcohol *p*-cumárico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. La biomasa forestal está compuesta principalmente de polímeros de celulosa y lignina. La madera blanda tiene un alto nivel de lignina (30-60 %), seguido de la madera dura (30-55%), mientras que las herbáceas y demás residuos agrícolas tienen los niveles más bajos de lignina (3-30%) [35]. La lignina cumple la función de proteger a la planta frente a patógenos e insectos [43]. Generalmente, la presencia de lignina dificulta los procesos de hidrólisis enzimática, pues presenta un efecto inhibitorio, y también tiene un efecto negativo en las fermentaciones microbianas posteriores de los azúcares.

Clasificación de los materiales lignocelulósicos

Las materias primas a partir de las cuales se obtiene la BLC se pueden dividir en distintos grupos en función de su origen, composición y estructura. La clasificación más utilizada es en función de su origen, y los principales grupos son los siguientes: residuos agrícolas, residuos forestales, cultivos de plantas no destinadas a la alimentación, residuos domésticos y urbanos, y residuos industriales, aunque hay otros [35].

Los **residuos forestales** de BLC están formados en su mayor parte por plantas leñosas. En Estados Unidos representan el 30% de la BLC total producida. Los materiales leñosos provenientes de residuos forestales se dividen en dos grandes grupos, maderas blandas (principalmente coníferas y gimnospermas) y maderas duras (angiospermas) [44]. La principal diferencia entre ambas es que las maderas blandas poseen densidades más bajas y crecen con mayor rapidez que las de madera dura. Este tipo de plantas se encuentran principalmente en el hemisferio norte. La diferencia con respecto al resto de materiales lignocelulósicos es que la materia prima leñosa ofrece un tiempo de recolección más flexible. La biomasa forestal está compuesta principalmente por celulosa y lignina, pero la materia prima leñosa posee más lignina que los residuos agrícolas y poco contenido en cenizas. Estas características hacen que las plantas leñosas sean una fuente muy valiosa de BLC, ya que el contenido en pentosas es menor y se obtiene un mayor rendimiento en bioetanol [35].

Los **residuos agrícolas** suponen un alto porcentaje del total de la BLC producida a nivel mundial. En su gran mayoría provienen de restos de plantaciones de maíz, paja de arroz y de trigo, así como el bagazo de la caña de azúcar [35]. Los residuos agrícolas contienen un alto porcentaje de hemicelulosa (25-30%), mayor que en la biomasa leñosa. El uso de residuos agrícolas es más respetuoso con el medioambiente, ya que, al reducir la dependencia de plantas leñosas, disminuye la deforestación. Además, estas plantas herbáceas crecen con mayor rapidez que los árboles, por lo tanto la disponibilidad de las mismas es mayor [38]. El césped (traducción del término inglés *Switchgrass*), es el principal pasto herbáceo que crece en las llanuras del hemisferio norte del continente americano. Estos pastos han levantado un gran interés para su uso como materia prima, ya que son perennes, tienen un bajo coste en inversión, son abundantes, resisten enfermedades y tienen un alto rendimiento en azúcares. En Asia y Europa, se emplea con mayor

frecuencia *Miscanthus giganteus*, una herbácea de rápido crecimiento que se ha convertido en un buen candidato para la producción de bioetanol [35].

Además de las materias primas forestales y agrícolas, también son una importante fuente de materia prima para la producción de biocombustibles los residuos sólidos orgánicos domésticos, urbanos e industriales. Uno de los puntos más interesantes de esta fuente de material lignocelulósico es que reduce los problemas de acumulación de residuos domésticos, urbanos y residuos de las industrias alimentarias [35].

Uno de los principales inconvenientes que presenta la BLC es su estabilidad, rigidez y consistencia, por ello se debe llevar a cabo un tratamiento severo y supone altos costes para el procesamiento de este residuo [45]. Por ello, actualmente, no se consideran procesos económicamente viables. Otro de los inconvenientes que presenta la BLC es que tras el tratamiento para liberar los azúcares que la componen, el segundo monosacárido obtenido en mayor concentración es la xilosa, representando alrededor de un tercio de los azúcares liberados. La principal levadura industrial para producir bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae* solo cataboliza las hexosas, como por ejemplo la glucosa, y no es capaz de co-fermentar glucosa y xilosa [46]. Por lo tanto, si hay un rendimiento en xilosa alto tras la hidrólisis, este azúcar no rinde bioetanol en la fermentación, reduciendo el rendimiento total del proceso.

Obtención de los azúcares libres: pretratamiento e hidrólisis enzimática

El primer paso para la liberación de azúcares de la BLC es la separación de las tres fracciones que la componen: celulosa, hemicelulosa y lignina. El proceso conlleva varias etapas, debido a que la BLC es un material recalcitrante, y serán diferentes en función de las necesidades y la composición de cada material lignocelulósico.

El pre-tratamiento del material lignocelulósico. Las propiedades de la BLC la hacen resistentes al ataque enzimático [47]. El objetivo del pretratamiento es precisamente que los materiales lignocelulósicos pierdan su consistencia y rigidez. El pretratamiento puede mejorar la accesibilidad de las enzimas a las distintas dianas, mejorando el rendimiento en azúcares libres tras la hidrólisis enzimática [47]. En la *Figura 1.5* se puede ver un esquema del objetivo del pre-tratamiento. Entre las características de los materiales lignocelulósicos que complican el tratamiento enzimático están la cristalinidad de la celulosa, el área o

superficie de acceso para las enzimas, la protección por la lignina y hemicelulosa, y el grado de acetilación de las hemicelulosas [47]. Dado que la BLC tiene una composición y estructura complicada, los pre-tratamientos no son sencillos, y dependen de las exigencias de cada tipo de material lignocelulósico. En función de la naturaleza del pretratamiento, estos se pueden dividir en pretratamientos físicos, químicos, físico-químicos y biológicos [35, 36, 47]. En la *Tabla 1.2* se pueden ver algunos de los pretratamientos más prometedores para la separación de las tres fracciones de la BLC [35, 36].

Una vez realizado el pretratamiento, produciendo la desorganización de las tres fracciones que forman la BLC, los monosacáridos deben ser liberados. Existen distintos procesos para la liberación de los monosacáridos, y se pueden agrupar en tres tipos de tratamientos: tratamientos químicos, tratamientos termoquímicos y tratamientos bioquímicos [48].

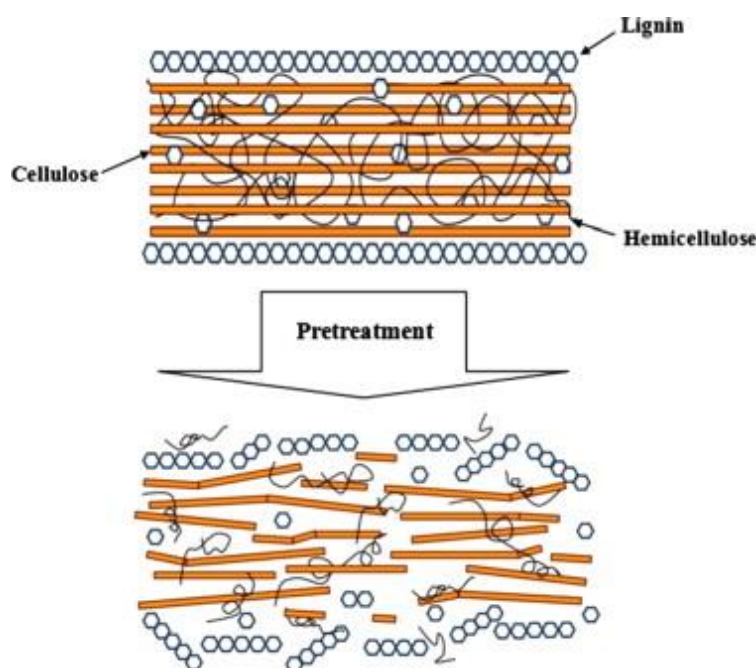


Figura 1.5. Esquema del efecto del pre-tratamiento sobre el material lignocelulósico, adaptada de Haghghi Mood, S. et al 2013 [49].

De estos diferentes tratamientos se van a comentar los tratamientos bioquímicos, ya que son los empleados en el proyecto de investigación, “Utilización Eficiente de la Biomasa Lignocelulósica: Biorrefinería Integrada” (CTQ2013-45970-C2-1-R), en el cual se enmarca esta Tesis Doctoral. El tratamiento bioquímico para la liberación de los azúcares

consiste en la aplicación de una serie de enzimas (catalizadores bioquímicos) que “atacan” a la estructura de la celulosa, hemicelulosa y lignina, rindiendo monosacáridos libres y otros compuestos que se comentan a continuación.

El empleo de condiciones suaves de operación (temperaturas suaves, presiones bajas y rangos de pH neutros) en el trabajo con enzimas se prefiere frente a los procesos con tratamientos químicos y termoquímicos, los cuales precisan de condiciones de operación más severas. Generalmente las enzimas que se emplean para la degradación de este tipo de materiales son producidas por hongos celulolíticos [50]. Estos hongos sintetizan distintos tipos de enzimas para degradar los materiales lignocelulósicos y alimentarse de los azúcares que liberan, entre estas enzimas se encuentran las que degradan la celulosa, las que degradan la hemicelulosa, las que degradan la lignina y, por otra parte, una serie de enzimas complementarias que facilitan la actividad de las tres anteriores. A continuación, se resumen las características de estos tipos de enzimas:

- Las enzimas encargadas de degradar la celulosa se pueden dividir en tres tipos [51]: enzimas endoglucanasas, estas enzimas atacan de forma aleatoria la cadena de glucosas que forma la celulosa, rindiendo pequeños fragmentos de la cadena inicial de glucosas, aumentando así la accesibilidad al resto de enzimas; enzimas exoglucanasas, estas enzimas presentan una estructura tipo “túnel” y actúan sobre los extremos libres de las cadenas de glucosa rindiendo celobiosa (dímeros de glucosa); por último, las enzimas β -glucosidasas tienen como diana los enlaces β -(1→4) de la celobiosa, rindiendo moléculas de glucosa libre.
- Entre las enzimas que degradan la hemicelulosa se encuentran las siguientes: las endoxilanasas, que liberan arabinosa y, las endoxilanasas que no liberan arabinosa, β -xilosidasas, xiloglucanasas, acetil-xilano esterases y feruloil esterases, β -mananasas, α -galactosidasas, α -arabinofuranosidasas y α -glucoronidasas [50]. Estas enzimas rinden diferentes monosacáridos, como xilosa, glucosa, galactosa, manosa y arabinosa y, por otro lado, ácidos orgánicos, como el ácido acético y el ácido ferúlico.
- Las enzimas que degradan la lignina se conocen como ligninasas, son la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y la lacasa, que provocan la despolimerización de la lignina [52-54].

Con las dos etapas explicadas anteriormente, pretratamiento e hidrólisis enzimática, se obtienen monosacáridos libres que podrán ser fermentados por microorganismos para la

obtención de biocombustibles (bioetanol, isobutanol y n-butanol, entre otros) y otros compuestos de alto valor añadido (como el ácido láctico, el ácido succínico o el ácido fumárico) [17]. Uno de los principales problemas que se presenta durante la fermentación de hidrolizados de BLC es la presencia de algunos inhibidores microbianos, que son compuestos tóxicos para los microorganismos. El tipo de inhibidor y su presencia dependen principalmente de la composición del material lignocelulósico y el tipo de pre-tratamiento al cual se somete el material [55]. Los principales inhibidores que pueden aparecer tras el pre-tratamiento son ácidos débiles, como ácido acético y ácido levulínico; derivados de furanos, como furaldehído, 2-furaldehído (furfural) y 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF); y compuestos fenólicos, como vainillina, siringaldehído y coniferil aldehído [56].

Existen propuestas de procesos que combinan fermentación simultáneamente con la etapa de hidrólisis enzimática o sacarificación. El proceso en el que ambas etapas se realizan a la vez se conoce como sacarificación y fermentación simultánea o SSF (del inglés *Saccharification and Simultaneous Fermentation*) [57, 58]. El principal objetivo de realizar estas dos etapas simultáneamente es reducir los costes del proceso, ya que la liberación de azúcares se produce a la vez que estos son consumidos, evitando la inhibición por producto de las enzimas y la inhibición por sustrato de los microorganismos. Sin embargo, este tipo de procesos simultáneos tienen un gran inconveniente, la temperatura óptima y el pH óptimo de actividad de las enzimas no suele coincidir con la temperatura y el pH óptimo de los microorganismos.

Tabla 1.2. Características, ventajas e inconvenientes de los pre-tratamientos de biomasa lignocelulósica más prometedores datos obtenidos de [35, 36, 59]

Pretratamiento	Rendimiento en azúcares	Formación de inhibidores	Generación subproductos	Espectro de aplicación	Coste del equipamiento	Viable en escala piloto	Ventajas	Inconvenientes o limitaciones
Mecánico	Bajo	No	No	Si	Alto	Si	Reduce la cristalinidad de la celulosa	Consumo más energía de la que se produce con la misma biomasa
Ácido	Alto	Alto	Alto	Si	Alto	Si	Hidroliza la celulosa y la hemicelulosa, y altera la estructura de la lignina	Peligroso, tóxico y corrosivo
Álkali	Alto	Bajo	Alto	Si	Ninguno	Si	Elimina lignina y hemicelulosa, incrementa la superficie accesible	Tiempos de residencia altos, se forman sales irrecuperables
Agua caliente	Alto	Alto	Bajo	-	-	Si	Elimina hemicelulosa aumentando accesibilidad de las enzimas a la celulosa	Tiempos de residencia altos, poca eliminación de lignina
Organosolv	Alto	Alto	Alto	Si	Alto	Si	Hidroliza lignina y hemicelulosa	Necesidades de los disolventes
Tratamiento oxidativo	Alto/Bajo	No	Bajo	-	Alto	-	Elimina lignina, disuelve hemicelulosa y elimina estructura cristalina de la celulosa	-
Ozono-lisis	Alto	Bajo	Alto	-	Alto	No	Reduce contenido en lignina, residuos no tóxicos	Requiere grandes cantidades de ozono
Explosión por vapor	Alto	Alto	Bajo	Si	Alto	Si	Eliminación de hemicelulosa y altera la estructura de la lignina	No elimina la lignina
Líquidos iónicos	Alto/Bajo	Bajo	-	Si	-	-	Disuelve celulosa e incrementa la actividad celulasa	Aún en estudio
Biológico	Bajo	Bajo	Alto	Si	Bajo	No	Ecológicamente sostenible y bajo uso de energía y reactivos químicos	Bajo nivel de bioconversión

1.2. BIOCOMBUSTIBLES: FUENTE de ENERGÍA RENOVABLE

Un biocombustible se puede definir como cualquier tipo de combustible que se haya obtenido a partir de materia orgánica de origen animal o vegetal, a diferencia de los combustibles tradicionales cuya materia prima es el petróleo proveniente de fuentes fósiles [60]. Con el enfoque actual de la bio-economía sostenible, el bioetanol y otros biocombustibles han acaparado una gran atención en los últimos años. Esto se refleja en que los volúmenes de producción de los biocombustibles son cada vez mayores, y actualmente se está empezando a considerar la producción de estos combustibles a partir de otras fuentes renovables [3]. El objetivo principal que se pretende lograr con el empleo de los biocombustibles es la reducción de la dependencia del petróleo y mantener la seguridad energética, que como se ha comentado anteriormente, es una de las principales preocupaciones de la sociedad actual debido a las previsiones de agotamiento del mismo [14]. Por otro lado, el empleo de materia orgánica de origen vegetal para la producción de biocombustibles puede dar solución a la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera, ya que, el CO₂ emitido en la combustión de estos biocombustibles es fijado previamente durante el crecimiento de la planta por medio de la fotosíntesis [14, 61, 62]. En la actualidad, se están produciendo distintos tipos de biocombustibles a partir de distintas materias primas orgánicas y a través de distintos procesos. El empleo de BLC para la producción de biocombustibles está tomando fuerza en los últimos años ya que este material resulta muy atractivo para este fin, y no compite directamente con la producción de alimentos, lo cual es uno de los principales problemas creados por los biocombustibles de primera generación. Sin embargo, la producción a partir de estos materiales requiere de nuevos procesos de producción que deben ser económicamente viables [3]. En la *Figura 1.6* se puede ver un esquema que refleja las características y las ventajas e inconvenientes de los combustibles fósiles, los biocombustibles de primera generación y los de segunda generación.

Entre los biocombustibles líquidos el bioetanol es el que presenta mayores tasas de producción y venta a nivel mundial, además se espera que esto se mantenga así durante los próximos años. En la *Figura 1.3*, se puede observar los niveles de producción de bioetanol y biodiesel a nivel mundial, así como las previsiones para los próximos años. A pesar de esto, y como ya se ha comentado anteriormente, el bioetanol no se considera como el mejor sustituto de la gasolina, ya que posee una menor presión de vapor, un mayor índice de

octanaje y una menor densidad energética; esta densidad energética es de aproximadamente el 65% respecto de la densidad energética de la gasolina [19, 63]. Por otro lado, el bioetanol presenta una alta higroscopicidad, y por lo tanto no es compatible al 100 % con los motores y sistemas de distribución de gasolina existentes en la actualidad [63, 64]. Además, las cantidades de bioetanol que se pueden mezclar con la gasolina fósil son limitadas debido a las políticas de regulación de la composición de los combustibles y por las propias características del bioetanol y las de la gasolina [19].

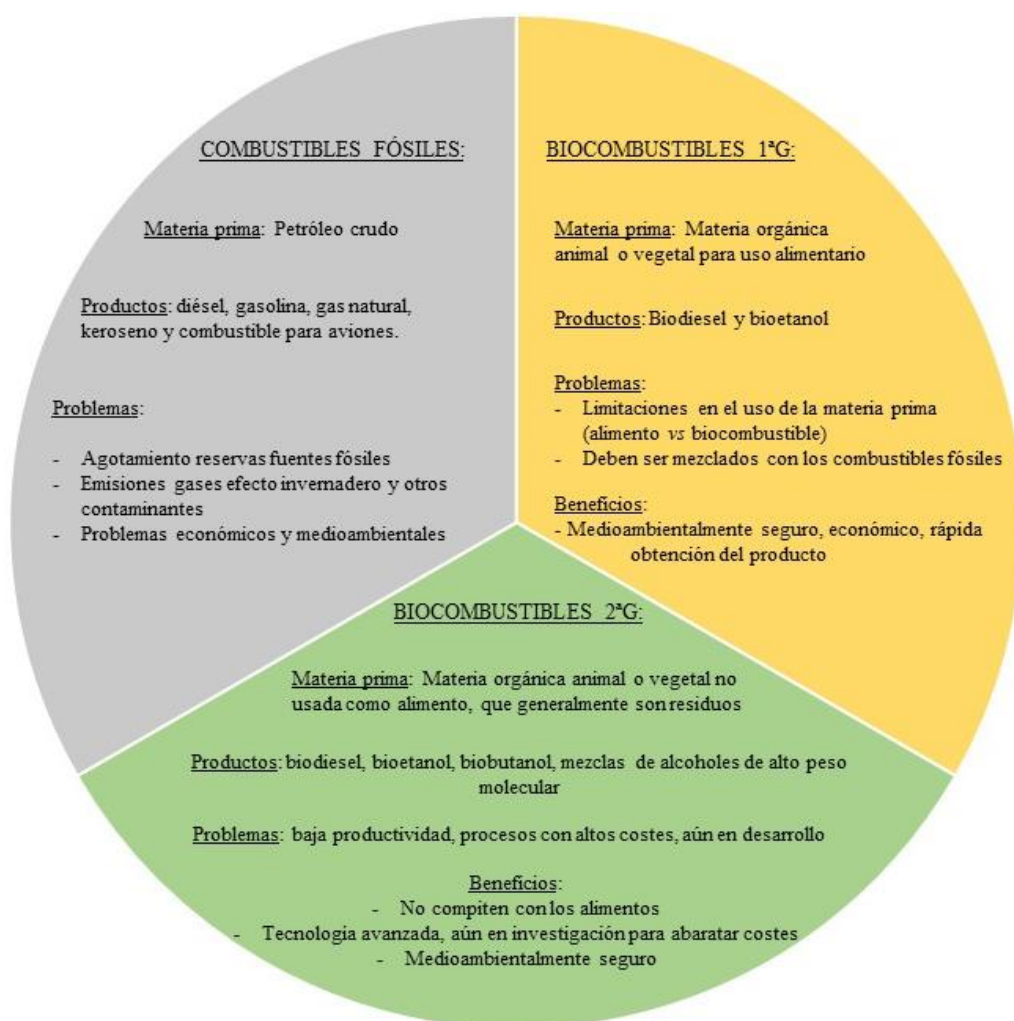


Figura 1.6. Características, principales ventajas e inconvenientes de los combustibles fósiles, biocombustibles de primera (1ªG) y biocombustibles de segunda generación (2ªG). Ilustración adaptada de [61].

Por estos motivos, en los últimos años se ha levantado un interés especial en la búsqueda de sustitutos para el bioetanol, con mejores propiedades. Entre ellos se encuentran los alcoholes de alto peso molecular isómeros del butanol, como son: n-butanol, 2-butanol, isobutanol y terc-butanol. De estos cuatro isómeros del butanol sólo dos han

centrado el interés de los investigadores y la industria en los últimos años por sus propiedades, el n-butanol y el isobutanol, que se consideran como buenos aditivos de la gasolina, mejorando sus propiedades en mezclas, y en un futuro próximo llegar a reemplazarla por completo [19, 65].

En los últimos años, se ha propuesto el empleo de mezclas de isobutanol-gasóleo en los motores diésel actuales, y se han realizado algunos estudios para conocer las características de la mezcla para su empleo como combustible, obteniendo algunos resultados interesantes [66, 67]. El isobutanol puede ser mezclado hasta un 10 % con el gasóleo; a partir de este valor el rendimiento de los motores disminuye. Se ha demostrado que las mezclas al 10 % de isobutanol-gasóleo disminuyen considerablemente las emisiones durante la combustión de monóxido de carbono (CO) y de óxidos de nitrógeno (NO_x), aunque las emisiones de algunos compuestos hidrocarbonados (HC) contaminantes aumentan [66]. Posteriormente, se han realizado algunos estudios para intentar optimizar la mezcla de isobutanol-gas óleo, llegando a obtener buenos resultados en mezclas al 40 % de isobutanol-combustible diésel [67].

1.2.1. El isobutanol y el n-butanol como sustitutos del bioetanol

Como se ha comentado en el apartado anterior, de todos los sustitutos potenciales del bioetanol hay dos que han despertado especial interés por sus propiedades físico-químicas, el isobutanol y el n-butanol. En la *Tabla 1.3*, se puede ver un resumen de las propiedades físico-químicas del isobutanol y del n-butanol en comparación con el bioetanol y la gasolina de origen fósil. En primer lugar, la densidad energética del n-butanol y del isobutanol es aproximadamente un 26 % superior a la densidad energética del bioetanol [19, 68]. El valor de la densidad energética de estos isómeros del butanol es más cercano al de la gasolina obtenida de fuentes fósiles. Otra de las propiedades que hacen que estos isómeros del butanol sean atractivos es su solubilidad en agua, así como la solubilidad del agua en estos alcoholes. En las mezclas de bioetanol-gasolina al 10 %, una pequeña cantidad de agua es soluble, hasta que se llega al nivel de saturación. Una vez se supera dicho nivel de saturación la mezcla queda separada en dos fases, una de bioetanol-agua y otra de bioetanol-gasolina [19]. Además, a temperaturas bajas, el punto de saturación es inferior, por lo que, durante los inviernos o países de climas fríos, esta separación se podría dar con mayor facilidad [19]. Cuando la separación en dos fases sucede, la fase de bioetanol-gasolina que queda no cumple con los requisitos para su empleo como combustible [19].

Ya que la solubilidad del butanol y el isobutanol en agua son menores que las de etanol, las mezclas de estos alcoholes con la gasolina serían mucho más estables frente a la presencia de agua, evitando la formación de dos fases. Además, las industrias productoras de isómeros de butanol aseguran que cuando los alcoholes presentan una cierta tolerancia a la presencia de agua, el transporte por tuberías de las mezclas butanol-gasolina se ve favorecido [19].

Tabla 1.3. *Propiedades físico-químicas de la gasolina, bioetanol, N-butanol e Isobutanol, tabla adaptada de Tao, L. et al [19] y Kumar, B.R. et al[69].*

	Gasolina	Bioetanol	n-butanol	Isobutanol
Densidad Energética (MJ.Kg ⁻¹)	30-33	21,4	26,9	26,6
LHV (MJ.Kg ⁻¹)	41-44	26,8	32,2	33,1
Numero de octanos (investigación)	88-98	110	96	106
Numero de octanos (motor)	80-88	90	84	90
Calor de evaporación (MJ.Kg ⁻¹)	0,36	0,92	0,71	0,69
Valor de presión Reid (kPa)	54-103	16	2,2	3,3
Punto de ebullición (°C)	27-225	78	117,7	107,9
Solubilidad a 20 °C	Poca	Miscible		
% wt en agua			7,7	8,7
% wt de agua en			20,1	20
Viscosidad cinemática a 20 °C (mm ² .s ⁻¹)	0,37-0,44	1,5	3,6	8,3
Densidad (Kg.m ⁻³)	680	789,4	810	802
Concentración límite inferior inflamabilidad (vol %)	1,4	3,3	1,4	1,7
Concentración límite superior inflamabilidad (vol %)	7,6	19	11,3	11,8
Punto de ignición (°C)	-43	13	37	28
Temperatura de autoignición (°C)	250-300	363	340	415

El índice de octano del n-butanol y del isobutanol es más próximo al índice de octano de la gasolina, el octanaje de ambos es inferior al del bioetanol [70]. El octanaje es una de las principales propiedades a tener en cuenta en los biocombustibles sustitutos de la gasolina, se utiliza para determinar el rendimiento antidetonante de un combustible y las especificaciones del combustible para su uso en vehículos, teniendo incidencia en el

rendimiento del motor [71]. A día de hoy, las mezclas que se han practicado para conseguir los requisitos en su uso como carburante son de bioetanol-gasolina y mezclas con alcoholes de bajo octanaje. La medida del octanaje de “investigación”, hace referencia al octanaje de un combustible medido en un motor de un cilindro y bajo condiciones controladas, a diferencia de la medida de octanaje de “motor”, la cual se obtiene bajo condiciones más severas y menos controladas [72]. Otro de los factores a tener en cuenta en la evaluación de un compuesto para su uso como biocombustible es la presión de vapor, ya que esta limita la evaporación de combustible no quemado del tanque y del circuito del combustible en el vehículo [73]. El bioetanol y los dos isómeros del butanol citados presentan una presión de vapor significativamente inferior a la de la gasolina, siendo la del n-butanol y el isobutanol también significativamente inferior a la del bioetanol. Esto tiene repercusión en la presión de vapor de la mezcla de la gasolina con cada uno de los alcoholes, resultando mezclas con presión de vapor diferente. Si se prepara una mezcla al 10 % de bioetanol con gasolina, la presión de vapor resultante es de 7 kPa mayor que la de la gasolina [19]. Por el contrario, la mezcla al 12-15 % de isobutanol o de n-butanol con gasolina hace que la presión de vapor baje en torno a 7 kPa [19]. Esto supone un importante beneficio a la hora de producir los biocombustibles, ya que el empleo de una mezcla de biobutanol-gasolina con una presión de vapor baja tiene ventajas para su uso en verano o en países con climas cálidos, y mezclas de bioetanol-gasolina con presiones de vapor superiores presentan ventajas para el invierno o para países de climas más fríos [19, 70]. Otra de las características que hacen atractivos a los alcoholes de alto peso molecular como sustitutos del bioetanol es la cantidad de emisiones de contaminantes. Se ha demostrado que las mezclas de los isómeros del butanol con la gasolina reducen las emisiones de monóxido de carbono (CO) durante su combustión en comparación con las mezclas bioetanol-gasolina y la combustión de la gasolina pura [19]. Por el contrario, no parece que exista una reducción clara de los óxidos de nitrógeno (NO_x), pero se reducen en un 7 % las emisiones de compuestos hidrocarbonados (HC). Todavía no existen demasiados estudios de emisiones de gases y partículas contaminantes en la combustión del n-butanol y del isobutanol puros en motores de vehículos modernos, por lo que la información es muy limitada. El NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) ha hecho algunos estudios de emisiones; de sus resultados se puede extraer que las emisiones producidas por los alcoholes de alto peso molecular sin quemar eran tan solo el 20 % de las que produce el bioetanol [19]. En cambio, hay una mayor emisión de butiraldehído en las mezclas de n-butanol-gasolina, y mayor emisión de acetona y 2-metil propano en las mezclas de isobutanol-gasolina [19]. Las emisiones que

producen los biocombustibles sin quemar, por evaporación, representan aproximadamente un 50 % del total de las emisiones en los vehículos modernos [19].

Uno de los principales inconvenientes o problemas que puede presentar el uso de mezclas de bioetanol con la gasolina es la formación de residuos en los circuitos del motor de los vehículos, que pueden provocar un aumento de la temperatura de los gases producidos (gases de escape), así como la temperatura de los componentes del motor, generando daños [19]. Los vehículos más antiguos, y también los motores de vehículos marinos, motocicletas y motores para otros usos, que utilizan sistemas de suministro fijo de combustible y sistemas de encendido fijo (carburadores convencionales), pueden presentar el problema de la acumulación de residuos con mayor facilidad. En cambio, en los vehículos más modernos, que tienen sistemas de suministro de combustible optimizado, que ajustan la cantidad de combustible suministrado para operar cerca de las condiciones estequiométricas, el problema se reduce considerablemente. Se piensa que los isómeros del butanol presentan una proporción menor de oxígeno carbono que el bioetanol, y reducirían el problema de la acumulación de residuos en el sistema, a los mismos volúmenes de mezcla con gasolina [19].

Otro de los problemas que se pueden presentar es la compatibilidad de los isómeros del butanol con los materiales del circuito y del motor, que incluyen entre otras partes las líneas de distribución del combustible, los tanques de combustible, las bombas, los inyectores, carburadores, válvulas y reguladores de presión. En el caso del bioetanol, el efecto sobre las diferentes partes del circuito se conoce en profundidad, y presenta una compatibilidad completa con los materiales del motor utilizándolo en mezclas hasta un 85 % de bioetanol. Aunque se considera que los isómeros de isobutanol son menos corrosivos, se deben hacer más estudios de compatibilidad, ya que la información es muy limitada por ahora. Uno de los pocos estudios que hay en la literatura indica que el n-butanol puede producir corrosión en algunas partes del motor bajo condiciones de temperatura baja [19].

1.2.2. Mercado de isobutanol como aditivo y combustible

En la actualidad, está aumentando el apoyo a los biocombustibles y cada vez hay más normativas de regulación sobre su producción y forma de uso. La inversión que están haciendo ciertos países para la producción y el empleo de los biocombustibles surge como

respuesta a los principales problemas de hoy en día, como la dependencia del petróleo, el cambio climático generado por la acumulación de gases de efecto invernadero y la acumulación de residuos. Además, algunos países argumentan que el apoyo a la producción de biocombustibles a partir de residuos fomenta el desarrollo rural y la viabilidad de la industria agrícola; especialmente en países en los que la agricultura y la ganadería suponen una parte importante del PIB [62].

Tanto la producción como la forma de usar el biodiesel y el bioetanol como combustibles está fuertemente regulada por los distintos gobiernos; actualmente, los alcoholes de alto peso molecular no pueden ser usados como combustibles para vehículos convencionales, sólo se permite en algunos países su empleo en pequeñas cantidades mezcladas con la gasolina [19]. En mayo de 2017, el gobierno de Arizona (Estados Unidos) firmó un proyecto de ley para que las gasolineras del Estado pudieran suministrar mezclas de isobutanol-gasolina, y en agosto del mismo año la ley entró en vigor [74]. En junio del año 2018, el Administrador de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), aprobó el registro del bio-isobutanol como aditivo y combustible. Según algunos expertos, esto supuso un gran hito en el mercado de combustibles de Estados Unidos ya que el registro de otros compuestos como combustibles otorga al consumidor más opciones. El Congreso Naval Americano aplaudió la decisión, ya que según esta institución, el empleo de bio-isobutanol como aditivo para los combustibles proporciona a los consumidores una alternativa más segura, eficiente y más respetuosa con el medio ambiente que las mezclas de bioetanol-gasolina al 15 % (E15), y que además este compuesto es altamente compatible con los motores de vehículos marinos [74]. Actualmente, en Estados Unidos, se permite la mezcla de n-butanol e isobutanol con gasolina, teniendo como límite el contenido de un 15 % de estos compuestos en la mezcla, siempre y cuando se le añada a dicha mezcla inhibidores de corrosión [19]. La regulación del uso de isobutanol en mezclas con gasolina en Europa se recoge dentro de la Norma Europea 228:2013 y en la EN 15376; de acuerdo a estas normas, el isobutil alcohol, o isobutanol, puede ser utilizado como aditivo de la gasolina hasta un 7 % del volumen final como límite de mezcla [75].

La primera planta de producción de isobutanol mediante procesos biotecnológicos, a nivel mundial, fue levantada por la empresa Gevo. La planta fue construida en mayo de 2011 en Luverne, Estado de Minnesota (Estados Unidos). Gevo produce al año 5,68 millones de litros de bio-isobutanol y se espera que con el nuevo proyecto de ampliación

de la planta la producción anual llegue hasta los 68 millones de litros [76]. Posteriormente, han surgido distintas empresas que están desarrollando bio-procesos a escala industrial de producción de bio-isobutanol; cabe destacar Butamax Advanced Biofuels, empresa creada por la petrolera británica BP y la empresa estadounidense de productos químicos DuPont para desarrollar la producción de bio-isobutanol. Otras empresas que se han sumado recientemente al desarrollo de procesos de producción de isómeros del butanol para su uso como biocombustible o disolvente son Green Biologics, con sede en Reino Unido, y Kreussler, con sede en Alemania [74].

1.2.3. Otras aplicaciones del isobutanol

Además de su uso como biocombustible o como aditivo para combustibles, el isobutanol tiene otra serie de aplicaciones de gran interés industrial. Entre ellas están su uso como disolvente de pinturas, porque disminuye la viscosidad de las mismas y se obtienen mejoras en el acabado, y también como aditivo de tintes. También se utiliza en industria alimentaria como aromatizante. Por otro lado, el isobutanol está considerado como un compuesto *platform chemical*, lo que significa que se puede utilizar como materia prima para la síntesis de otros compuestos de alto valor añadido. Por un lado, se puede llevar a cabo la producción de butenos, mediante la deshidratación del isobutanol, que son materia prima para la producción de caucho sintético [77]. A partir del isobutanol también se puede obtener acetato de isobutilo, que es usado para producir lacas y revestimientos. Es también precursor de ésteres isobutílicos de ácidos dicarboxílicos, como el ftalato de diisobutilo (DIBP), usado como precursor de plásticos. Otros ésteres isobutílicos de ácidos dicarboxílicos, como por ejemplo el ácido adípico, se usan para producir nylon; o el ácido azelaico, para cosméticos; y el ácido sebácico, empleado también en la síntesis de plásticos, lubricantes sintéticos y para fluidos de sistemas hidráulicos [78]. El isobutanol es también precursor del p-xileno, también utilizado para la producción de plásticos y materiales de aplicación en la industria textil. Otras aplicaciones del isobutanol son: extracción de compuestos orgánicos, en especial, la extracción de medicamentos y algunas sustancias naturales como antibióticos, hormonas, vitaminas, alcaloides y alcanfor; aditivo de abrillantadores y limpiadores domésticos; solubilizante en la industria textil; aditivo en productos anticongelantes; fase móvil para cromatografía en papel y en capa fina; humectante del nitrato de celulosa; base para la producción de éteres de glicol; base para la

producción de xantato de isobutilo; y, materia prima para aditivos con efecto anticorrosivo [78].

1.3. PRODUCCIÓN de ISOBUTANOL

La producción de isobutanol se puede llevar a cabo por vía química, usando como materia prima una fracción del petróleo, o por vía biotecnológica, mediante el empleo de microorganismos, usando como materia prima diferentes materiales compuestos principalmente de materia orgánica. La producción de isobutanol por la **vía química** o sintética se lleva a cabo mediante el proceso Oxo- o hidroformilación, utilizando propileno con hidrógeno y monóxido de carbono [79, 80]. El proceso se lleva a cabo en presencia de un catalizador inorgánico compuesto principalmente por rodio, a temperaturas elevadas (100 °C) y presiones altas (20 bares) [80]. La primera reacción rinde n-butiraldehído e isobutiraldehído. Posteriormente, se realiza una segunda reacción de hidrogenación. Así en esta segunda reacción a partir del n-butiraldehído y el isobutiraldehído en presencia de hidrógeno y con un catalizador de rodio se obtiene n-butanol e isobutanol [79, 80]. Dependiendo del tipo de catalizador inorgánico de rodio que se emplee se obtendrán distintas proporciones de los dos isómeros, con los catalizadores más antiguos se obtenía una relación de n-butanol y de isobutanol 1:1. Los catalizadores más actuales pueden producir mezclas 30:1, respectivamente [79]. Uno de los principales problemas de este proceso de producción sintética es el precio del catalizador, que es extremadamente elevado, y que además se inhibe con facilidad en presencia de diferentes compuestos que pueden formar parte de las impurezas de la materia prima [80]. Por otro lado, el empleo de temperaturas altas y presiones elevadas, hacen que el proceso sea más costoso y menos seguro. Además de los problemas que ya se han comentado anteriormente en cuanto al uso del petróleo como materia prima.

La producción de isobutanol por la **vía biotecnológica** ha levantado un gran interés en los últimos años. Esta producción biotecnológica se lleva a cabo mediante el empleo de microorganismos, los cuales a partir de hexosas producen este compuesto. La vía biotecnológica de producción de isobutanol ha levantado un gran interés en los últimos años, siendo el principal motivo que es un proceso que emplea condiciones de operación más suaves que la síntesis por vía química, temperaturas cercanas a los 30 °C y presión atmosférica, obteniendo un abaratamiento de los costes de producción y también un aumento en la seguridad el proceso. Además de esto, también se reducen los costes del

catalizador, ya que como se ha comentado anteriormente, los catalizadores de rodio empleados en la vía sintética presentan un elevado precio.

En la *Figura 1.7* se puede ver la situación del mercado del isobutanol en Estados Unidos. Se muestra el mercado del isobutanol obtenido por vía sintética y el bio-isobutanol obtenido por vía biotecnológica. Así mismo, en dicha figura se muestran las previsiones para este mercado hasta el año 2022. Se puede apreciar que la vía química sigue siendo la vía prioritaria de síntesis de isobutanol; aun así, la vía biológica ha aumentado sus ventas desde 2012, y para el año 2022 se prevé que las ventas de bio-isobutanol sean muy parecidas a las ventas de isobutanol químico.

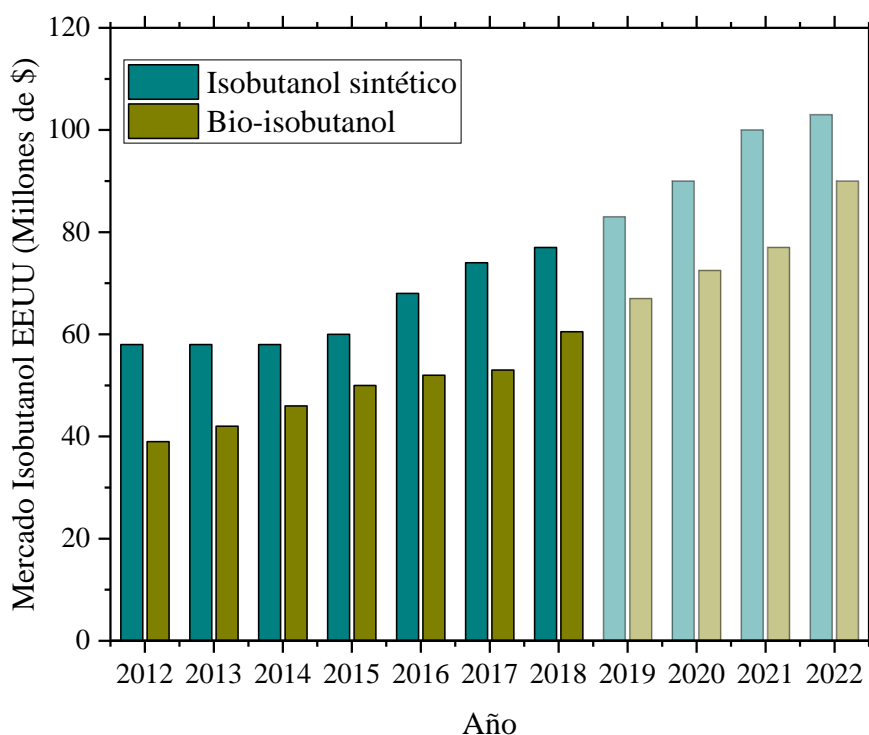


Figura 1.7. Mercado de isobutanol en Estados Unidos y previsiones hasta 2022. Fuente [81].

1.3.1. Bioproceso de producción de isobutanol

El isobutanol fue identificado por primera vez como subproducto de la fermentación de cerveza con la levadura *Saccharomyces carlsbergensis*, en concentraciones que no superaban los 16 mg.L^{-1} [82]. Debido a los bajos rendimientos en isobutanol, no se podía considerar como un proceso para la producción de isobutanol a nivel industrial; no fue hasta el año 2008 cuando Liao y sus colaboradores publicaron la primera modificación genética en *Escherichia coli* para producir isobutanol [83]. La construcción propuesta por James C.

Liao fue la combinación de reacciones de la ruta de síntesis de aminoácidos, ruta de síntesis de la valina, y enzimas de la ruta Ehrlich. En la *Figura 1.8* se puede ver un esquema de las reacciones de la ruta introducida en *E.coli* por Liao [83, 84].

Como se puede ver en la *Figura 1.8*, la glucosa se metaboliza mediante la glicólisis, rindiendo 2 moléculas de piruvato. James C. Liao propuso introducir la enzima acetolactato sintasa (AlsS) de *Bacillus subtilis*, debido a que presenta una gran afinidad por el piruvato, reduciendo de esta manera la cantidad de piruvato que se deriva a la producción de otros alcoholes, como el etanol, o algunos ácidos orgánicos, como el ácido láctico o el acético. A continuación, introdujo las enzimas IlvC e IlvD, la primera una enzima reductoisomerasa que participa en las rutas de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, y la segunda una enzima deshidratasa que participa en las mismas rutas de biosíntesis de aminoácidos que la anterior. Ambas enzimas, IlvC e IlvD, son endógenas de *E. coli*, pero debido a la baja actividad que presentan, James C. Liao propuso sobre-expresarlas, aumentando cinco veces el rendimiento en isobutanol. La enzima IlvC, es una enzima NAD(P)H dependiente, por lo que es importante remarcar esta dependencia de cofactores reducidos. La siguiente enzima que se introdujo en la ruta fue una KDC, 2-ketoácido descarboxilasa. Liao probó a introducir cinco KDCs diferentes, Pdc6, Aro10 y Thi3 de *S. cerevisiae*; Kivd de *L. lactis* y Pdc de *Clostridium acetobutylicum*, pero la enzima KDC que mostró mayor actividad fue Kivd de *Lactococcus lactis*. Estas enzimas se probaron combinadas con la última enzima de la ruta, la alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae* [83]. Esta última enzima es dependiente también de cofactores reducidos, en concreto es dependiente de NADH.

Liao introdujo otras modificaciones genéticas en la cepa para reducir la competencia del piruvato por otras rutas metabólicas. Delecionó los genes endógenos que codificaban para las enzimas lactato deshidrogenasa (*ldhA*), alcohol deshidrogenasa (*adhE*), fumarato reductasa (*frdAB*), regulador FNR (*fnr*), fosfato acetiltransferasa (*pta*) y la enzima piruvato-formato liasa (*pflB*) [83]; de esta manera se reduce el consumo de piruvato para la síntesis de ácido láctico, etanol, ácido fumárico, acetyl-CoA y ácido fórmico. Por otro lado, el regulador FNR es el encargado de reprimir los genes implicados en la respiración aeróbica, y activa los genes necesarios para las vías fermentativas en condiciones anaeróbicas.

Eliminando dicho regulador se aumentaba la expresión de los genes de rutas aeróbicas durante la fermentación.

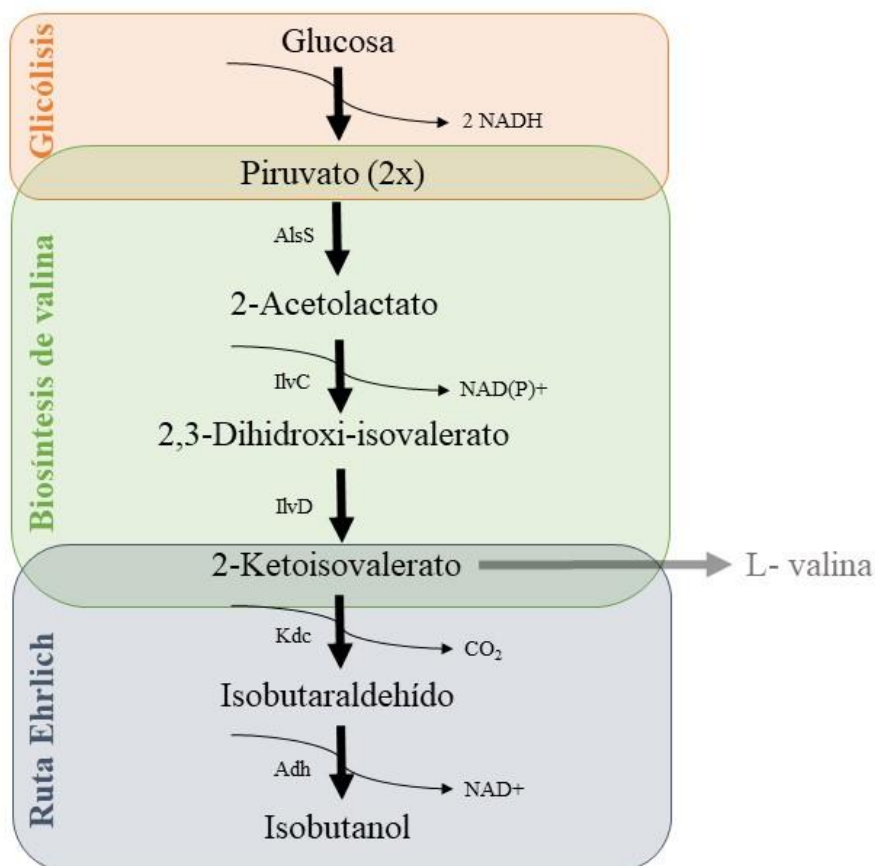


Figura 1.8. Esquema de la ruta metabólica introducida en *E. coli* por Liao y colaboradores, adaptación esquema de la ruta de [83, 84]. En el esquema se puede ver la combinación de la ruta de biosíntesis de la valina y la ruta de Ehrlich para producir isobutanol.

La cepa de *E. coli* resultante tras las modificaciones anteriormente descritas es *E. coli* JCL260. Con esta cepa James C. Liao fue capaz de producir a partir de glucosa aproximadamente 7 g.L⁻¹ en condiciones limitantes de oxígeno. Pero con la misma cepa se consiguieron producir aproximadamente 22 g.L⁻¹ empleando elevadas concentraciones de glucosa, largos tiempos de fermentación, control manual del pH cada 24 horas y condiciones micro-aeróbicas. El rendimiento obtenido respecto del rendimiento máximo teórico fue del 86 %, el rendimiento máximo teórico de isobutanol es de 0,41 g_{Ib}.g_{Gc}⁻¹.

Uno de los puntos débiles de esta construcción es la dependencia de cofactores reducidos de la ruta, ya que el NAD(P)H sólo se produce o se recicla en condiciones

aeróbicas [85]. Debido a que el isobutanol es un alcohol que se evapora con gran facilidad, las fermentaciones a escala de incubadora orbital se deben llevar a cabo en botellas o matraces cerrados [83, 86]. Cuando se consume el oxígeno en el caldo, la cantidad de NAD(P)H se empieza a reducir, y se produce lo que se conoce como *cofactor imbalance* o desbalance de cofactores [77, 85]. Cuando la cantidad de NAD(P)H no es suficiente, la ruta se bloquea y se deja de producir isobutanol. Este es uno de los principales motivos por el cual numerosos autores apuntan a que este proceso debe ser llevado a cabo en condiciones de aerobiosis, ya que de lo contrario, una vez agotado el NAD(P)H, el microorganismo deja de producir isobutanol [87-93]. Por esta razón, Liao diseñó un sistema de retención de isobutanol con la ayuda de trampas frías a la salida del reactor [91]. De esta manera, podía mantener el medio aireado y recolectar el isobutanol para poder cuantificarlo. Además, este sistema tiene beneficios a la hora de purificar el isobutanol, así como eliminar del caldo el alcohol que puede provocar la inhibición de las células ya que es citotóxico [94, 95]. En la *Figura 1.9* se puede ver el sistema de producción con recolección del producto en trampas frías a la salida del reactor. El sustrato se añadió al fermentador en *fed-batch*, el porcentaje de oxígeno disuelto se mantuvo al 20 % y el pH del caldo fue controlado durante toda la fermentación en un valor de 6,8 [91]. Con la cepa *E.coli* JCL260 [83], y el sistema de trampas frías colocadas a la salida del reactor, consiguió producir aproximadamente 50 g.L⁻¹ de isobutanol a partir de 200 g.L⁻¹ de glucosa, llegándose al 61 % del rendimiento máximo teórico. A pesar de ello, en otro trabajo posterior con esta misma cepa, en condiciones similares, obtuvo sólo 1,5 g.L⁻¹ de isobutanol [92]. Este trabajo se realizó sin trampas frías, lo que genera una controversia entre ambos resultados, ya que en este último trabajo se estima una evaporación constante del isobutanol en vez de emplear trampas frías y cuantificarlo.

La presencia o ausencia de oxígeno es uno de los puntos que más controversia genera en la producción de isobutanol. Como ya se ha comentado anteriormente, algunos autores aseguran que la presencia de oxígeno es indispensable en el proceso de producción de isobutanol. Por el contrario, otros autores apuntan a la necesidad de llevar a cabo este proceso en condiciones anaeróbicas para que la producción sea industrialmente viable [85], a pesar de que se pueda bloquear la ruta por el desbalance entre cofactores oxidados y reducidos [96]. Estos autores aseguran que para que la producción de estos nuevos combustibles la ingeniería metabólica de cofactores, debe dar una respuesta a este problema, y que de lo contrario este tipo de procesos no serán viables a escala industrial.

En este campo, algunos autores han realizado estudios para modificar la dependencia de cofactores reducidos o aumentar la disponibilidad de los mismos, y así poder trabajar en condiciones anaeróbicas o en condiciones limitantes de oxígeno mejorando los rendimientos en isobutanol notablemente [85, 97].

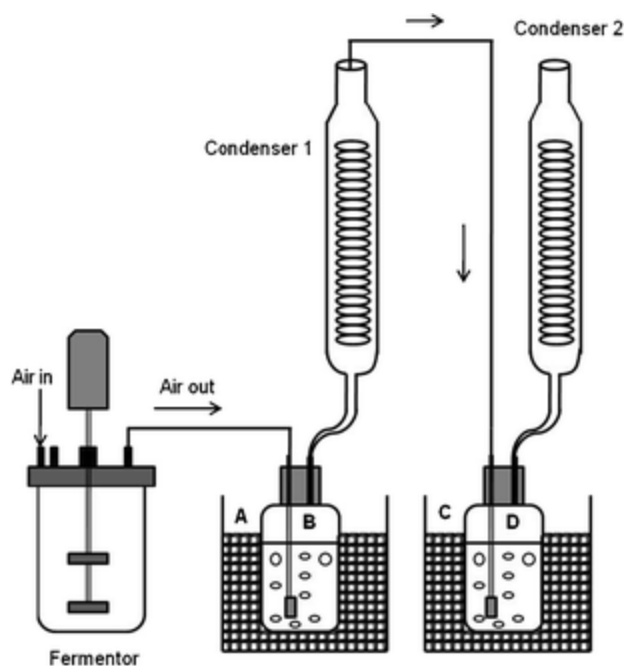


Figura 1.9. Sistema de producción propuesto por Liao et al 2011, imagen adaptada del mismo artículo [91].

Con el sistema de recolección del isobutanol a la salida del reactor, que se puede ver en la *Figura 1.9*, la evaporación del alcohol es más rápida debido al efecto de *stripping* o arrastre producido por la corriente de aire. Esto favorecerá posteriormente la purificación del producto ya que estará en soluciones de agua, además de eliminar el isobutanol del medio de cultivo. Con concentraciones de isobutanol del 1 % (v/v), la inhibición del crecimiento se empieza a hacer patente, generando una disminución en la velocidad de crecimiento en *Escherichia coli* [94]. Aunque la producción de isobutanol continúa una vez producida la inhibición del crecimiento, hay que tener en cuenta que la concentración de isobutanol alcanzada en la fase de producción disminuye, ya que hay un momento en el que se empieza a afectar dicha producción.

Generalmente, los alcoholes generan una desestabilización de las membranas de las células, que probablemente suceda por la inserción de las regiones lipofílicas de los alcoholes directamente en las membranas [94]. La inserción de estos alcoholes en las

membranas provoca un aumento en la fluidez o permeabilidad de las mismas, una disminución de la fuerza protón-motriz, la eliminación de las interacciones entre las proteínas de las membranas y los lípidos, y, por último, una inhibición en el transporte de la glucosa y de los distintos nutrientes [94]. El isobutanol produce un descenso de pH en el interior de la célula y disminuye la concentración de ATP [91, 98]. Además, los alcoholes, como el isobutanol, pueden causar perturbaciones en las rutas de síntesis de aminoácidos y también la represión de las rutas aeróbicas [63, 94, 98]. Cuando la concentración de isobutanol es elevada se produce una interrupción en las interacciones entre las quinonas de la cadena respiratoria y la membrana, provocando un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y, por lo tanto, se puede generar un estrés respiratorio [98]. Debido a los efectos inhibitorios que provoca el isobutanol, otra de las características que se han buscado en los microorganismos modificados genéticamente ha sido precisamente la tolerancia al isobutanol. Por ejemplo, *E.coli* se ve afectada en concentraciones mayores a 8 g.L⁻¹ pero la producción continúa hasta los 20 g.L⁻¹ [86, 91, 98]; en cambio, la cepa de *Shimwellia blattae* (p424IbPSO), que se utilizará como biocatalizador para los estudios que forman esta Tesis Doctoral, es capaz de tolerar concentraciones cercanas a los 10 g.L⁻¹ [95], aunque el crecimiento es inhibido por completo.

También se ha descrito un efecto combinado entre la temperatura de la fermentación y la presencia de isobutanol [91]. Cuando se utilizan temperaturas superiores a 30 °C hay una disminución en la cantidad de ácidos grasos insaturados en la membrana, lo que provoca un aumento en la fluidez de las membranas, que genera una reducción en la tolerancia a los alcoholes [91].

1.3.2. Mejoras genéticas en GMOs productores de isobutanol

Desde la propuesta inicial de Liao en el año 2008, numerosas especies de microorganismos han sido modificadas para el mismo fin: la síntesis de isobutanol. Todas estas modificaciones tienen en común la combinación de la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y la ruta de Ehrlich. Entre los microorganismos más empleados para la producción de isobutanol cabe destacar los siguientes: *E.coli* [85, 87, 88, 93-97, 99-101], *Shimwellia blattae* [95], *Corynebacterium glutamicum* [102-105], *Bacillus subtilis* [106-108], *Corynebacterium crenatum* [109], *Synechocystis sp.* [110], *Clostridium cellulolyticum* [111], *Clostridium thermocellum* [112] y *Saccharomyces cerevisiae*

[113-121]. En la *Tabla 1.4* se recogen las modificaciones genéticas más relevantes que se han llevado a cabo y los resultados obtenidos.

Las modificaciones genéticas en estos microorganismos han ido dirigidas a solventar los problemas que se han comentado: disminuir la dependencia de cofactores reducidos y obtener cepas más resistentes al isobutanol, además de intentar aumentar los rendimientos en isobutanol para hacer el proceso más atractivo [63]. Todas las modificaciones genéticas comparten la combinación de la ruta de biosíntesis de valina con la ruta Ehrlich (genes *als*, *ilv*, *kivd* y *adh*). Las mayores variaciones que se pueden encontrar radican en el origen de los genes que se utilizan, que son extraídos de diferentes microorganismos, rindiendo distintos resultados en la producción de isobutanol. Otra de las estrategias, para incrementar la concentración final en isobutanol, es la eliminación de genes que codifican para enzimas que compiten con la acetolactato sintasa (Als) por el piruvato. Entre otros, los genes que codifican para lactato deshidrogenasa (*ldh*), fumarato reductasa (*frd*), piruvato deshidrogenasa (*pdh*), dihidrolipoil deshidrogenasa (*lpd*), fosfatoacetil transferasa (*pta*), fosfoenolpiruvato descarboxilasa (*pyc*) o alcohol deshidrogenasa (*adh*). En los trabajos donde se han eliminado estos genes se ha comprobado que el rendimiento final en isobutanol es mayor.

La tolerancia a los compuestos presentes en los hidrolizados de BLC es otra de las características que se busca en los microorganismos. En muchos estudios, el principal objetivo es producir isobutanol a partir de residuos lignocelulósicos. Como ya se ha comentado, en algunos pretratamientos se forman compuestos que pueden inhibir el crecimiento bacteriano, como el furfural o el hidroximetilfurfural. Algunas cepas modificadas genéticamente de *Escherichia coli* [95, 96, 100] y *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) [95], son capaces de crecer y producir isobutanol en hidrolizados de BLC; en concreto, *S. blattae* (p424IbPSO) es capaz de crecer y producir isobutanol en hidrolizados de paja de trigo diluidos al 40 %.

Tabla 1.4. Principales modificaciones genéticas realizadas en distintos microorganismos para la producción biotecnológica de isobutanol.

Microorganismo	Modificación genética			Concentración isobutanol (g.L ⁻¹)	Ref.
	Sobreexpresión genes	Delección genes	Inserción genes		
<i>E.coli</i>	<i>kvid, adh2 e ilvHCD</i>	<i>adhE, ldhA, frdAB, fnr, pta pflB</i>	<i>alsS</i> de <i>B.subtilis</i>	22	[83]
	<i>yqhD</i>	-	<i>adh2</i> de <i>S.cerevisiae</i>	7,0	[87]
	<i>yqhD</i>	-	<i>adhA</i> de <i>Lactococcus lactis</i>	8,0	[87]
<i>C. glutamicum</i>	<i>ilvC, ilvD y adhA</i>	<i>pyc y ldh</i>	<i>alsS</i> de <i>B. subtilis</i> y <i>kivd</i> de <i>L. lactis</i>	4,9	[102]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>kivd, ADH6, ILV2, ILV5c, ILV3c, ILV2c, sMAE1</i>	<i>lpd1</i>	-	1,62	[118]
	<i>kivd, ILV2, ILV5, ILV3</i>	-	-	0,15	[116]
	<i>aro10, adhA, ILV2, ILV5, ILV3</i>	-	-	0,635	[117]
<i>B. subtilis</i>	<i>ilvCD</i>	<i>ldh y pdhC</i>	<i>pntAB</i> de <i>E.coli</i> <i>kvid</i> y <i>adh2</i> de <i>L.lactis</i> , y <i>alsS</i> de <i>B.subtilis</i>	6,1	[122]
<i>C. cellulolyticum</i>	<i>ilvCD, y yqhD</i>	-	<i>alsS</i> de <i>B.subtilis</i> y <i>kivd</i> de <i>L.lactis</i>	0,66	[111]
<i>G. thermoglucosid asius</i>	<i>ilvC</i>	-	<i>alsS</i> de <i>B.subtilis</i> y <i>kivd</i> de <i>L.lactis</i>	0,6	[123]
<i>C. thermocellum</i>	<i>ilvBN, ilvCD</i>	<i>hpt</i>	<i>kivd</i> de <i>L.lactis</i>	5,4	[112]
<i>S. blattae</i>	-	-	<i>alsS</i> de <i>B.subtilis</i> , <i>ilvCD</i> de <i>E.coli</i> , <i>kivd</i> de <i>L.lactis</i>	6,0	[95]

1.3.3. Condiciones fluido-dinámicas en bioprocesos aerobios

En los bioprocesos que emplean condiciones aerobias, es fundamental el estudio de las condiciones fluido-dinámicas en el biorreactor. Mediante este estudio se puede determinar el grado de mezcla y las concentraciones de distintos sustratos en diferentes fases dentro del reactor. Por un lado, los sustratos pueden estar disueltos en la fase líquida, como pueden ser las fuentes de carbono y de nitrógeno; en la fase sólida, como es en el

caso de algunos procesos de sacarificación y fermentación simultánea o SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*); o en la fase gaseosa, como es el caso del oxígeno o el monóxido de carbono en algunos bioprocesos. Por otro lado, los microorganismos se pueden encontrar en suspensión en el caldo o inmovilizados en algún tipo de soporte. Además, en algunos procesos biotecnológicos, el producto que se sintetiza sale del reactor en la fase gaseosa, como por ejemplo la producción de metano. Incluso, se puede dar el caso de tener fases líquidas inmiscibles, como puede ser una fase orgánica para disolver algún compuesto de interés en la fermentación y la fase acuosa en la que están los microorganismos. Debido a esto, el estudio de las condiciones fluido-dinámicas es fundamental en los bioprocesos. El tipo de reactor más utilizado es el tanque agitado (STBR o *Stirred Tank Bio-Reactor*), que será el considerado en este trabajo.

En el caso concreto del bioproceso de producción de isobutanol, el estudio de las condiciones fluido-dinámicas tiene un especial interés debido a la controversia que existe en la literatura acerca de si el proceso se debe llevar a cabo en condiciones anaeróbicas [91], en condiciones limitantes de oxígeno o en condiciones completamente aeróbicas [97]. Es necesario realizar estudios, que no existen en la literatura sobre este bioproceso, para determinar la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, *Oxygen Transfer Rate*), el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La), la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, *Oxygen Uptake Rate*) y la tasa de consumo específico de oxígeno (q_{O_2}), entre otros parámetros.

En algunos procesos, el transporte de oxígeno entre la fase gaseosa y la líquida es determinante, se puede convertir en la etapa controlante, y el oxígeno, en el sustrato limitante del proceso. En la *Figura 1.10* se puede ver un esquema de las resistencias en serie que presenta el oxígeno en un bioproceso aerobio. Las resistencias que tiene el oxígeno para pasar de la fase gaseosa a la fase líquida, y posteriormente las resistencias que tiene en la propia fase líquida hasta llegar a las células. Con este esquema se deja patente la importancia y la necesidad de estudiar las condiciones fluido-dinámicas de un sistema aeróbico, en el cual el oxígeno funciona como un sustrato más. Por lo tanto, si la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) es baja comparada con la velocidad potencial de consumo (OUR máxima) la etapa de transporte controlará la velocidad del proceso. Si, por el contrario, se da un exceso de aporte de oxígeno ($OTR > OUR$ máxima) que hace aumentar la concentración de oxígeno en el líquido, se puede provocar efectos perjudiciales

para obtener el producto deseado. Además, la energía suministrada al biorreactor para mejorar la mezcla y la OTR pueden ocasionar daños celulares, fenómeno usualmente conocido como “estrés hidrodinámico” [124-131]. En varios estudios se ha demostrado que las condiciones fluido-dinámicas en el biorreactor pueden desencadenar ciertos problemas como puede ser el estrés oxidativo y el estrés hidrodinámico, afectando al metabolismo de los microorganismos y la viabilidad celular [126, 127]. Por último, mediante el estudio de la fluido-dinámica del biorreactor se pueden obtener ciertos datos como el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}), el cual puede ser utilizado para el cambio de escala del proceso, y así reproducir los resultados obtenidos a escala de laboratorio en escala de planta piloto o a nivel industrial [132-134].

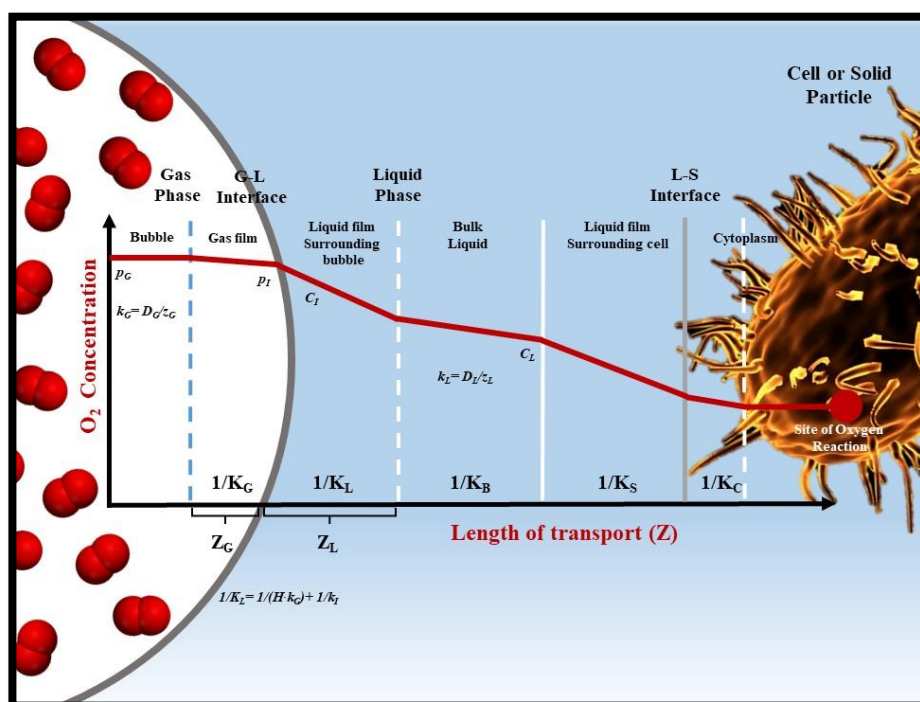


Figura 1.10. Esquema de las resistencias que presenta el oxígeno para llegar desde la fase gaseosa (burbuja) hasta la célula presente en la fase líquida, incluyendo la teoría de la doble capa de Lewis-Whitman. Imagen modificada de García-Ochoa y Gómez, 2009 [135].



2. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

2. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo es el estudio de la producción biotecnológica de isobutanol con un microorganismo modificado genéticamente (GMO), *Shimwellia blattae* (p424IbPSO), a partir de glucosa, que puede ser obtenida de la fracción de celulosa hidrolizada y purificada de la paja del trigo o de otro tipo de biomasa. Para el desarrollo de este trabajo, se va a utilizar glucosa pura como modelo del citado hidrolizado de biomasa.

En este estudio, se aborda primero el desarrollo del proceso: estudio de medio y condiciones de operación; y, posteriormente, se estudian los principales aspectos relacionados con el cambio de escala del proceso: formulación de un modelo cinético de la producción y estudio de la fluido-dinámica, con su influencia en la aparición de un posible estrés hidrodinámico y el efecto de la disponibilidad de oxígeno o de su velocidad de transporte.

En primer lugar, se optimizarán las condiciones de producción a escala de incubadora orbital para, posteriormente, optimizar la producción a escala de biorreactor de laboratorio. Para ello, se empleará la metodología previamente desarrollada y comprobada por el grupo de investigación *Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales* (FQPIMA) del Departamento de Ingeniería Química y de Materiales de la Universidad Complutense de Madrid, en el que se ha llevado a cabo el trabajo que compone esta Tesis Doctoral.

Para la optimización del medio de cultivo, se llevará a cabo un estudio del efecto de la disminución de la fuente de nitrógeno compleja en la producción de isobutanol con células en crecimiento. El principal objetivo de este estudio es la reducción de los costes del proceso ya que las concentraciones de fuente de nitrógeno que se han empleado hasta ahora en la literatura pueden hacer que el proceso no sea económicamente viable a escala industrial. Por otro lado, se estudiará el efecto que tiene el pH durante la producción con células en crecimiento a escala de incubadora orbital, para posteriormente buscar la estrategia de pH óptima para la producción a escala de biorreactor de laboratorio.

Debido a la controversia que se encuentra en la literatura en cuanto a la necesidad de que este proceso deba ser aeróbico o anaeróbico, se realizará un estudio para conocer la influencia y la necesidad del oxígeno en el proceso. En primer lugar, se estudiará el efecto del oxígeno disponible a escala de incubadora orbital, mediante cambios en la cantidad de

aire disponible dentro de las botellas cerradas donde se lleva a cabo la producción con células en crecimiento. Posteriormente, a escala de biorreactor, se estudiará el efecto del oxígeno, alimentando aire de forma continua, para determinar si el proceso se debe llevar a cabo en condiciones aeróbicas o en condiciones limitantes de oxígeno. Así mismo, se estudiará el efecto de las condiciones fluido-dinámicas sobre el crecimiento celular, la viabilidad y la integridad de las células, y sobre los flujos metabólicos en este microorganismo. La modificación de las condiciones fluido-dinámicas se conseguirá mediante la modificación de la velocidad de transferencia de oxígeno cambiando la velocidad de agitación mecánica en el reactor, manteniendo el caudal de aire alimentado constante.

Por otro lado, se estudiará la producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*. Esta forma de producción de isobutanol, con células en *resting cells*, no ha sido reportada anteriormente en la literatura. En este trabajo, se van a estudiar las condiciones de crecimiento de la biomasa, para obtener células con la mayor capacidad de producción de isobutanol. En este punto, se estudiará el efecto que tiene sobre la fase de producción de isobutanol la composición del medio de cultivo durante el crecimiento de las células, especialmente la fuente de nitrógeno, así como el efecto de la temperatura y el efecto de la concentración del IPTG, usado como inductor. También, ya a escala de biorreactor, se estudiará el efecto que tienen las condiciones fluido-dinámicas durante el crecimiento de la biomasa para su posterior uso en estado de *resting cells*.

Otro de los objetivos de este trabajo es la formulación de modelos cinéticos para el bioproceso de producción de isobutanol con *S. blattae* p424IbPSO como biocatalizador utilizando la glucosa pura como sustrato. Estos modelos, además de imprescindibles para el diseño del reactor, tienen como objetivo ayudar a comprender el metabolismo del biocatalizador y así entender mejor el desarrollo del proceso. Los modelos cinéticos propuestos describirán, al menos, las siguientes respuestas: crecimiento de la biomasa, consumo del sustrato carbonado, producción de isobutanol y de subproductos.

Por último, con un mayor conocimiento del proceso, se propondrán diversas modificaciones genéticas a realizar sobre el microorganismo *S. blattae* para intentar mejorar los rendimientos en isobutanol. Estas cepas modificadas se van a construir con la ayuda del grupo de Biotecnología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

0,75

0,5 L

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se recogen, de forma resumida, los materiales, equipos de laboratorio, procedimientos experimentales y los métodos de análisis y cálculo que han sido empleados para la realización del trabajo recogido en las publicaciones que conforman esta Tesis Doctoral.

3.1. MATERIALES

La descripción de los materiales que han sido empleados para llevar a cabo los experimentos se ha estructurado en tres sub-apartados: biocatalizador empleado, reactivos y medios de cultivo; y, por último, equipos empleados para llevar a cabo tanto los experimentos como el análisis de las muestras.

3.1.1. Microorganismo empleado

El microorganismo empleado como biocatalizador en este trabajo ha sido *Shimwellia blattae* p424IbPSO [95]. Se trata de un microorganismo modificado genéticamente, el cual fue proporcionado por el Grupo de Investigación *Biotechnología Medioambiental* del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Es una enterobacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa y que fue aislada por primera vez del intestino de las cucarachas. Una de las características más importantes de esta bacteria es que no es patógena para el ser humano, por lo tanto, tiene un nivel de bioseguridad de Tipo 1. La modificación genética que presenta esta cepa es la inserción de algunos genes exógenos para combinar la ruta de síntesis de la valina con la ruta de Ehrlich, obteniendo, como producto final de dicha ruta, el isobutanol. Debido a su similitud con la modificación propuesta por James C. Liao et al 2008 [83], el esquema de la ruta metabólica puede verse en la *Figura 1.8* del apartado de Introducción de la presente Memoria. Los genes que fueron introducidos en la cepa son *alsS* de *B. subtilis*, *ilvCD* de *E. coli*, y *kdc* de *L. lactis*. Estos genes se incorporan a la bacteria dentro del vector pSEVA424, el cual, a su vez, contiene genes de resistencia a estreptomicina y el represor *lacI* del operón de la lactosa, este último inducible con IPTG. Una de las principales características de esta construcción genética es que, a diferencia de otras, no se ha realizado la inserción del gen que codifica para la enzima alcohol-deshidrogenasa: esta bacteria utiliza una alcohol-deshidrogenasa endógena. En estudios previos, se observó que esta cepa podía producir hasta 5,5 g.L⁻¹ de isobutanol a escala de incubadora orbital y en botellas cerradas. Así

mismo, esta cepa es más tolerante al isobutanol que otras cepas y también es capaz de producirlo a partir de hidrolizados reales de paja de trigo diluidos en agua al 40 % [95].

3.1.2. Reactivos y medios de cultivo

Los reactivos empleados para la formulación de los medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos, en los distintos experimentos realizados se muestran en la *Tabla 3.1*. Los medios de cultivo utilizados en esta Tesis Doctoral han sido el **medio complejo LB** (10 g.L⁻¹ de Triptona, 5 g.L⁻¹ de extracto de levadura y 5 g.L⁻¹ de NaCl en agua ultra-pura Milli-Q) y el **medio mínimo M92X** (2 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 6 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 12 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 1 g.L⁻¹ NaCl, 0,246 g.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O y 0,011 g.L⁻¹ de CaCl₂ en agua ultra-pura Milli-Q), este último medio es suplementado con extracto de levadura (5 g.L⁻¹), glucosa (20 g.L⁻¹) y con una solución de metales traza cuya composición se presenta en los apartados de materiales y métodos de las publicaciones que forman este trabajo. Como se detalla en dichos artículos, el empleo de estos medios se justifica por su uso en estudios similares, aunque con algunas modificaciones [84, 95, 100].

En la *Tabla 3.2*, se recogen los reactivos empleados para la realización de los calibrados para cuantificar la concentración de sustrato y productos, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); así como los reactivos empleados para la identificación de compuestos mediante el empleo de distintas técnicas de análisis como cromatografía de gases masas (GC-MS) o cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC-MS).

En la *Tabla 3.3*, se muestran los reactivos empleados en las distintas técnicas de Biología Molecular empleadas para los diferentes estudios que conforman la presente Tesis Doctoral.

3.1.3. Equipos empleados

En este subapartado se muestran de forma resumida los equipos empleados para la realización de los experimentos que se recogen en las publicaciones científicas que forman este trabajo.

Tabla 3.1. Listado de reactivos empleados en la formulación de los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo.

Reactivo	Casa comercial	CAS	Pureza (%)
Ácido cítrico	Sigma-Aldrich	77-92-9	>99
Agar	Sigma-Aldrich	9002-18-0	-
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	10043-52-4	97
CoSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich	10026-24-1	>98
CuSO ₄	Sigma-Aldrich	7758-98-7	>97
Estreptomina sulfato	Panreac AppliChem	3810-74-0	-
Extracto de levadura	Sigma-Aldrich	8013-01-2	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich	7782-63-0	>97
Gentamicina sulfato	Panreac AppliChem	1405-41-0	-
Glicerol	Sigma-Aldrich	56-81-5	>99.5
Glucosa	Panreac AppliChem	50-99-7	>97
H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich	10043-35-3	>98
Isopropil-β-D-1-galactopiranosido	Panreac AppliChem	367-93-1	-
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	Sigma-Aldrich	7784-24-9	>97
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	7778-77-0	>99
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich	7487-88-9	>99
MnSO ₄	Sigma-Aldrich	10034-96-5	>98
NaCl	Sigma-Aldrich	7647-14-5	>99
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	7558-79-4	>99
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Sigma-Aldrich	7631-95-0	>98
NaSeO ₃ ·5H ₂ O	Sigma-Aldrich	10102-18-8	>99
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich	12125-02-9	>99
NiCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma-Aldrich	7718-54-9	>98
Ácido nitrilotriacético	Sigma-Aldrich	139-13-9	>97
Peptona bacteriológica	Sigma-Aldrich	91079-38-8	-
Silicona antiespumante	Sigma-Aldrich	85390 (Código producto)	-
Citrato de sodio	Sigma-Aldrich	6132-04-3	>97
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich	7733-02-0	>99

Tabla 3.2. Reactivos y disolventes empleados para el análisis mediante HPLC, como patrones, o en la identificación de compuestos mediante GC-MS y HPLC-MS.

Reactivo	Casa Comercial	CAS	Pureza
2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	513-85-9	97
1,3-propanodiol	Sigma-Aldrich	504-63-2	98
Acetoína	Sigma-Aldrich	513-86-0	99
Ácido acético glacial	Sigma-Aldrich	64-19-7	99
Ácido isobutírico	Sigma-Aldrich	79-31-2	99
Ácido láctico	Sigma-Aldrich	50-21-5	99
Ácido succínico	Sigma-Aldrich	110-15-6	99
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich	7664-93-9	98
Etanol	Sigma-Aldrich	64-17-5	99
Isobutanol	Sigma-Aldrich	78-83-1	99
Isobutiraldehído	Sigma-Aldrich	78-84-2	99

Tabla 3.3. Listado de reactivos empleados en técnicas de Biología Molecular.

Reactivo	Casa Comercial	CAS	Pureza
Acrilamida	Sigma-Aldrich	79-06-1	>98
Azul bromofenol	Sigma-Aldrich	115-39-9	
Blue Star Prestained Protein Marker	Nippon Genetics	-	-
B-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	60-24-2	99
SDS	Sigma-Aldrich	151-21-3	-
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	1185-53-1	>97
Endonucleasas restricción	New England Biolabs	-	-
NZYTaq II 2X Green Master Mix	Nyztech genes & enzymes	-	-
PrimeSTAR® GXL DNA polymerase	TaKaRa	-	-
T4DNA ligase	New England Biolabs	-	-
High Pure Plasmid Purification Kit	Roche	-	-
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche	-	-
Red Safe	Labotaq	-	-

- ***Incubadora orbital***

Tanto los pre-inóculos e inóculos, necesarios como etapas previas de acondicionamiento de las células, llevados a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 250 ml con tapones de algodón que facilitan el intercambio de gases; como los experimentos de producción llevados a cabo en botellas de diferente volumen y cerradas para evitar la evaporación del producto, se colocan en incubadoras orbitales Sartorius modelo CERTOMAT® IS. La incubadora orbital dispone de una plataforma giratoria, con movimiento orbital de 25 mm de diámetro, que permite trabajar en un rango de agitaciones desde 40 hasta 400 rpm. Tiene un sistema de calefacción por circulación de aire, que permite trabajar como máximo con una temperatura de 60 °C.

- ***Estufa***

Para el crecimiento en medio sólido (en placa de Petri) de las células, se ha empleado una estufa termostatzada por convección natural de la casa comercial HERAEUS (B6). Equipada con un controlador de temperatura, que permite la incubación entre un rango de temperaturas que va de 5 °C a 70 °C.

- ***Biorreactor comercial***

Para los experimentos que han sido realizados a escala de biorreactor de laboratorio, se han utilizado reactores de la casa comercial Sartorius BBI Systems. En la *Figura 3.1* se presenta el biorreactor comercial empleado en esta Tesis Doctoral. El modelo de los equipos empleados como biorreactor en este trabajo es BIOSTAT® B-Plus. Estos equipos están compuestos por una cuba de vidrio con capacidad para 1,5 o 3 L, y por otro lado por una estación que funciona como unidad de medición y control de pH, oxígeno disuelto, caudal de aire, agitación y temperatura. El equipo electrónico utiliza el software MFCS/WIN 3. La cuba de vidrio, que está encamisada, tiene una tapa metálica. La tapa metálica tiene acoplado un eje metálico cilíndrico, que se acopla a un motor eléctrico, lo cual permite la agitación en el caldo de reacción. Por otro lado, la tapa presenta diferentes orificios, por los cuales, se pueden introducir distintos sensores (oxígeno, pH, temperatura) u otros dispositivos, como son el difusor de aire, el tubo para la toma de muestras, el condensador o los baffles deflectores. La agitación se obtiene con la ayuda de turbinas de tipo *Rusthon* de 6 palas planas. La agitación se mide en la estación del fermentador con ayuda de un tacómetro, y se controla, con ayuda del eje metálico descrito anteriormente a través de un lazo PID ejercido sobre el motor eléctrico.

La temperatura se mide con un sensor Pt100 y se controla gracias a un circuito cerrado de agua desionizada que proviene de un sistema de refrigeración de la casa Sartorius (FRIGOMIX® 1000). Además, para evitar las pérdidas por evaporación de agua se dispone de un condensador en la tapa del fermentador.

El pH del caldo se mide gracias a un sensor de pH de la casa comercial Hamilton (Suiza), que se introduce por la tapa de la cuba y que está conectado a la estación del fermentador. Esta tiene un sistema de control PID, y activa dos bombas peristálticas, las cuales son capaces de bombear una disolución ácida o una disolución básica, para mantener la reacción al pH deseado. Por otro lado, el oxígeno disuelto se mide mediante otro sensor de la casa Hamilton, se trata de un electrodo polarográfico que tiene dos electrodos, un ánodo de plata y otro de platino en una disolución de cloruro potásico, y separados del caldo de fermentación por una membrana permeable al oxígeno. El equipo es capaz de medir desde un 0% hasta un 100%, cuando el caldo está saturado por oxígeno. El equipo también puede controlar el oxígeno disuelto, mediante órdenes de aumento o disminución del caudal del gas de alimentación o por el aumento o la disminución de la agitación. Ambos sensores son esterilizables en autoclave.

La corriente del gas de salida está conectada a un medidor de composición de gases (O₂ y CO₂), permite cuantificar el oxígeno y el dióxido de carbono que componen esa corriente de gas de salida. El equipo de medición de gases empleado es de la casa comercial Sartorius Stedim Biotech, el modelo del equipo de medida es BioPAT® Xgas.

- ***Termociclador para PCRs***

Para llevar a cabo las PCRs, utilizado para la transformación bacteriana, se empleó un termociclador modelo Mastercycler Gradient de la casa comercial Eppendorf. Este equipo se encuentra en los laboratorios del grupo de Biotecnología Medioambiental del Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del CIB-CSIC.

- ***Electroporador***

Para llevar a cabo la electroporación de las bacterias se empleó el electroporador modelo Gene Pulser de la casa comercial Biorad. Este equipo se encuentra en los laboratorios del grupo de Biotecnología Medioambiental del Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del CIB-CSIC.



Figura 3.1. Fotografía del biorreactor comercial empleado para llevar a cabo la producción de isobutanol (estación de control y la cuba del biorreactor).

- **Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Para el seguimiento del sustrato y de los distintos metabolitos producidos durante la fermentación, se ha usado un cromatógrafo de líquidos de alta resolución de la casa Agilent, serie 1100. En la *Figura 3.2* se puede observar una imagen del equipo HPLC empleado en esta Tesis Doctoral. El equipo está formado por 6 módulos en serie, estos son: desgasificador, bomba cuaternaria, sistema de inyección automático, horno para la columna, detector de diodo de array (*DAD*) y, por último, el detector de índice de refracción (*RID*). El equipo se controla desde un ordenador con el software Agilent ChemStation, el cual permite fijar las condiciones para cada uno de los módulos, así como procesar los datos obtenidos de los dos sensores que tiene el equipo. Este software guarda los datos de cada muestra en distintos cromatogramas, con los que se puede llevar a cabo la cuantificación de los distintos compuestos que forman la muestra. Este software también permite realizar

pruebas para conocer el estado del equipo, así como la creación de rectas de calibrado para cada uno de los compuestos deseados.



Figura 3.2. Fotografía del cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Agilent 1000 series empleado para el análisis de sustrato y metabolitos en la producción de isobutanol.

- *Cromatógrafo de líquidos con detector de masas (LC-MS)*

Para la identificación de compuestos desconocidos en algunas muestras, se ha empleado un cromatógrafo de líquidos, modelo HCT ULTRA PTM Discovery System of Bruker, acoplado a un espectrómetro de masas, modelo Bruker-type *ion trap mass spectrometer* (Esquire-LC). El rango de masas que permite analizar este equipo es de 15 a 1000 μm . Este tipo de análisis se llevó a cabo en el Centro de Apoyo a la Investigación

(CAI) de Espectrometría de Masas, situado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

- ***Cromatógrafo de gases-masas (GC-MS)***

Para la identificación y cuantificación de algunos compuestos se ha utilizado un cromatógrafo de gases-masas (GC-MS) modelo GC-2010 con el detector de masas GCMS-QP2010 Plus de la casa comercial Shimadzu.

- ***Espectrofotómetro UV-visible***

El seguimiento de la biomasa se ha llevado a cabo por medidas de absorbancia y su relación con el peso seco. El equipo empleado es de la casa comercial Shimadzu, modelo UV1603. Está formado por dos lámparas, una de deuterio para medir en el espectro ultravioleta, y otra de tungsteno, para medir en el espectro visible y en el infrarrojo próximo.

- ***Microscopio electrónico de transmisión (TEM)***

En algunos trabajos que componen esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo observaciones y toma de fotografías de las células, para evaluar posibles cambios morfológicos y la aparición de distintas estructuras intracelulares. Estas observaciones se han hecho con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) e Instalación Científico Tecnológica Singular (ICTS), Centro Nacional de Microscopía Electrónica situado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. Este microscopio está equipado con una cámara modelo Gatan782 (Erlangsheb ES500W).

- ***NanoPhotometer Pearl***

Para llevar a cabo la cuantificación de ADN se empleó el equipo NanoPhotometer Pearl de la casa comercial Implen GmbH (Alemania). Este equipo se empleó en los trabajos de transformación bacteriana y este equipo se encuentra en los laboratorios del grupo de *Biología Medioambiental* del Departamento de Biología Microbiana y de Plantas del CIB-CSIC.

Equipos auxiliares empleados

Además de los equipos descritos anteriormente se han utilizado otros equipos auxiliares de uso común que se recogen en la *Tabla 3.4*.

Tabla 3.4. Equipos auxiliares empleados.

Equipo	Casa Comercial	Modelo
Autoclave	JP Selecta	Presoclave II 80
Centrífuga	Sigma	4-16K
Balanzas de precisión	Sartorius	Handy
Estufa de secado	Selecta	S-202
Cámara de flujo laminar	Telstar	MicroV/PCR
pHmetro	Crison	pH Basic 20
Ultracongelador	Sanyo	VIP serie MDF U33V
Equipo de purificación de agua	Sartorius	Arium 611UV

3.2. MÉTODOS

En este apartado se exponen, de forma resumida, los procedimientos experimentales, los métodos de análisis y los métodos matemáticos empleados para la obtención de los resultados que se muestran en las publicaciones que conforman este trabajo. Estos métodos se detallan en cada una de las publicaciones científicas que se encuentran en el Anexo de esta Memoria.

3.2.1. Obtención y conservación del microorganismo

Las bacterias empleadas para realizar los experimentos que forman esta Tesis se recibieron en el laboratorio en medio LB-agar (medio LB con 13 g.L⁻¹ de agar) en una placa Petri. Éstas fueron inoculadas en 50 mL medio complejo (LB-caldo con los antibióticos necesarios), en matraces *Erlenmeyer* de 250 ml, y se cultivaron en incubadora orbital a 37 °C y 250 rpm durante 14 horas. Posteriormente, las células fueron centrifugadas (9000 rpm durante 10 minutos), lavadas con suero salino y resuspendidas en una solución conservadora (compuesta por glicerol al 50% y suero salino), a una concentración de 10 g.L⁻¹ de biomasa. Las células en la solución conservadora fueron rápidamente congeladas a -80 °C en microtubos *Eppendorf* de 1,5 mL.

Para obtener el biocatalizador para realizar los experimentos de producción, las células deben ser descongeladas rápidamente, pasando posteriormente un volumen determinado del *stock* a un matraz *Erlenmeyer* con 50 mL de medio de cultivo (M92X o

LB en función del experimento) y se crecen a 37 °C y 250 rpm en incubadora orbital durante 13 horas. De este **pre-inóculo**, se toma el volumen necesario para hacer un segundo crecimiento, que será el **inóculo**, a una concentración inicial de biomasa predeterminada y en las mismas condiciones que el pre-inóculo, con el fin de que las células que se empleen posteriormente en la producción estén en el mismo estado metabólico. En el esquema presentado en la *Figura 3.3* se pueden observar estas etapas de pre-inóculo e inóculo. Estas etapas han sido establecidas previamente por el grupo de investigación donde se ha desarrollado la Tesis, ya que se ha demostrado que, realizando la inoculación en dos etapas, preinóculo e inóculo, los resultados de los experimentos son repetitivos y reproducibles. Los detalles de la composición de los medios de cultivo para el pre-inóculo y el inóculo se pueden ver detallados en el apartado de materiales y métodos de cada una de las publicaciones.

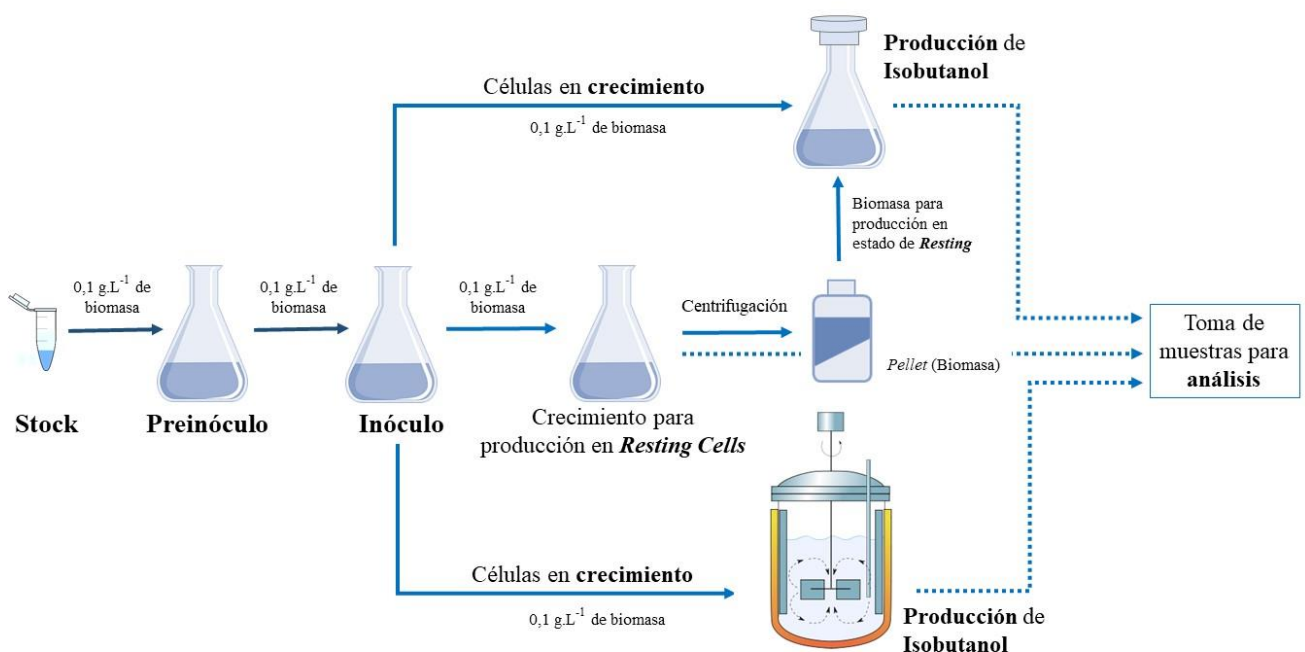


Figura 3.3. Esquema del procedimiento experimental para la producción de isobutanol con células en estado de crecimiento y de resting cells.

3.2.2. Cultivos en incubadora orbital y en biorreactor

Para llevar a cabo los experimentos de producción, ya sea en botellas cerradas en incubadora orbital, o en biorreactor de laboratorio; se toma la cantidad de biomasa deseada del inóculo, con el fin de fijar la concentración inicial de biomasa del experimento, y se

transfiere al dispositivo experimental donde se lleva a cabo el mismo. En el caso de los experimentos realizados a escala de incubadora orbital, se emplearon botellas de distintos tamaños, de 70 a 130 mL de volumen que, tras ser inoculadas con $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasa, se ponen a crecer a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 250 rpm. Tras dos horas de crecimiento aeróbico, se añade IPTG, utilizado como inductor de los genes introducidos en la modificación genética, se cierran las botellas con tapones con septum, y se cambian las condiciones de temperatura y agitación, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 200 rpm. Tras añadir IPTG, las células comienzan a expresar las enzimas insertadas. Debido a que el isobutanol es un alcohol que se evapora con mucha facilidad se cierran las botellas, para así poder cuantificarlo. Por otro lado, el cambio de las condiciones de temperatura y agitación se realiza para favorecer el plegamiento correcto de las enzimas durante su producción, y que así se consiga una actividad óptima de las mismas. El procedimiento experimental es común en la mayoría de los estudios se encuentran en la literatura; en particular, se utilizó el protocolo establecido por el grupo proporcionó la cepa modificada [95]; el cual, se utilizó para los estudios previos de optimización de medio de cultivo y en los estudios del efecto del oxígeno disponible realizados en el presente trabajo.

Para los experimentos llevados a cabo en biorreactor de 1 o 2 L, el procedimiento experimental es similar, pero cambiando el dispositivo donde se lleva a cabo la reacción. Estos reactores se llenan con un volumen predeterminado de medio M92X, en función del experimento. Los fermentadores se inoculan con $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasa, que corresponde aproximadamente a un volumen de inóculo del 10 % del volumen del medio de cultivo empleado en el reactor. En los trabajos realizados a esta escala se estudió la influencia del oxígeno, de la agitación, del medio de cultivo, del caudal de aire y de la concentración inicial de sustrato, entre otros. Por ello, el procedimiento experimental empleado a escala de reactor es específico de cada estudio y se describen en los apartados de materiales y métodos de cada una de las publicaciones que se presentan en el Anexo de esta memoria.

Para los experimentos de producción con células en estado de *resting cells*, se lleva a cabo una fase previa de producción de biomasa. La etapa de producción de biomasa se realiza a dos escalas distintas. Para algunos experimentos, los crecimientos se llevaron a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL con tapones de algodón, conteniendo 50 mL de medio de cultivo, en incubadora orbital. Otros crecimientos se realizaron en biorreactor, manteniendo el caudal de aire (1vvm) y la temperatura ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) constantes. En estos experimentos el IPTG se añade al comienzo del experimento y se crecen en condiciones

aeróbicas, ya que el interés de esta etapa no es la producción de isobutanol, sino el crecimiento óptimo de la biomasa. Una vez obtenida la biomasa, esta se centrifuga a 9000 rpm y se lava con tampón citrato a pH 6,5 y con una fuerza molar de 65 mM. El proceso de centrifugado y lavado se realiza dos veces para asegurar que no quedan componentes del medio de crecimiento. Del concentrado de células obtenido, se toma el volumen necesario para obtener la concentración de células deseada en la fase de producción. Esta se lleva a cabo en botellas cerradas, conteniendo 20,5 mL de tampón citrato 65 mM (pH 6,5) y 36 g.L⁻¹ de glucosa, a 30 °C y 200 rpm.

En la *Figura 3.3* se puede observar un esquema del procedimiento experimental empleado para llevar a cabo los cultivos en botellas y en biorreactor comercial.

3.2.3. Métodos de Análisis

Para el seguimiento de la evolución con el tiempo de los experimentos realizados, a lo largo de los mismos se fueron tomando muestras del caldo para cuantificar la biomasa, el sustrato y los diferentes metabolitos producidos. Así mismo, en los experimentos que lo requieren, se determinó la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo, así como la concentración de oxígeno en la corriente de salida del gas del reactor.

- *Biomasa*

El seguimiento de la biomasa se realizó mediante medidas espectrofotométricas de las muestras. Para ello es necesario realizar un calibrado que relacione la absorbancia de la muestra con el peso seco de la biomasa que contiene. Para obtener la recta de calibrado se obtiene un cultivo con alta concentración celular, el cual se separa en varias alícuotas teniendo en cuenta el volumen total del cultivo. Tres de estas se centrifugan a 9.000 rpm durante 10 minutos, se lavan con suero salino, se centrifugan de nuevo a 9.000 rpm durante 10 min, se elimina el sobrenadante y se seca el *pellet* a 105 °C, hasta obtener un valor de pesada constante. Con el valor de peso seco, y teniendo en cuenta el volumen de la alícuota, podemos conocer la concentración en cada una. Por otro lado, con el resto del volumen, se llevan a cabo diluciones seriadas, midiendo la absorbancia en cada una de ellas. Aplicando a cada muestra su correspondiente valor de dilución se establece un conjunto de pares de

valores concentración de biomasa-absorbancia y se ajustan mediante regresión lineal. De esta forma se obtiene una constante de calibrado, recogida en la ecuación (3.1):

$$C_X = 0,489 \pm 0,01 \cdot Abs_{600nm} \quad (3.1)$$

- **Sustrato y productos**

En todos los experimentos se realiza un seguimiento del sustrato, producto y otros metabolitos producidos como subproductos. La cuantificación de estos compuestos se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución o *HPLC*. Para determinar la concentración de todos los compuestos es necesario realizar calibrados de cada uno de ellos: se preparan soluciones de cada compuesto puro a distintas concentraciones, y se obtiene una relación entre el área del pico del cromatograma y la concentración conocida de cada solución. Se realiza un ajuste para obtener la recta de calibrado, esta nos servirá para conocer la concentración de cada compuesto en función del área del pico que obtengamos en el análisis. La columna empleada para el análisis de los metabolitos es Rezex ROA-Monosaccharide H⁺ (8%, 300x7,8 mm) de la casa comercial Phenomenex. La fase móvil empleada está compuesta por H₂SO₄ 1,19 mM en agua ultrapura, con un caudal de 0,5 mL.min⁻¹; la temperatura del horno de la columna es de 80 °C; el volumen de inyección es de 15 µL; y, el tiempo de análisis de 45 min.

Otros métodos de análisis, como la cromatografía de gases-masas o la cromatografía líquida masas se emplearon para la identificación de compuestos desconocidos en las fermentaciones.

En el caso del análisis por cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC-MS), se empleó la columna Rezex ROA-Monosaccharide H⁺ (8%, 300x7,8 mm) de la casa comercial Phenomenex. Las condiciones del análisis son las siguientes: volumen de inyección de muestra de 15 µL; como fase móvil agua ácida con ácido acético al 1 mM; a un caudal de 0,2 mL.min⁻¹; y, una temperatura de 30 °C para la columna.

En el caso del análisis por cromatografía de gases-masas (GC-MS), se empleó una columna Zebtron ZB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), compuesta por un 100 % de polietilenglicol. Como gas portador se empleó Helio, a un caudal de 0,7 mL.min⁻¹. La

temperatura del inyector es de 230 °C y la temperatura del detector es de 250 °C. La temperatura del horno es de 35 °C durante los 10 primeros minutos y después, aumenta a una velocidad de 2 °C.min⁻¹ hasta una temperatura final de 250 °C, que posteriormente se mantiene constante hasta el final del análisis. El volumen de inyección es de 1 µL. Los procedimientos para estos análisis se detallan en el apartado de materiales y métodos del artículo correspondiente.

- **Oxígeno disuelto en el caldo y oxígeno en fase gaseosa**

Como se ha comentado anteriormente para la determinación de la concentración de oxígeno disuelto (C_{O2}) en el caldo de cultivo se ha empleado un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto. La respuesta de este electrodo se ofrece en forma de porcentaje de oxígeno disuelto, el 100 % corresponde a la concentración de saturación de oxígeno en el caldo, en las condiciones experimentales con las cuales se ha llevado a cabo la reacción.

La concentración de oxígeno en la fase gaseosa en la corriente de entrada en el reactor se ha asumido que permanece constante (21 % de oxígeno), ya que ésta proviene de una botella de aire industrial comprimido. Para la determinación de la concentración de oxígeno en la fase gaseosa en la corriente de salida de gases del reactor se ha empleado un medidor de gases. Este medidor proporciona el valor del porcentaje de oxígeno contenido en dicha corriente a cada momento (χ_{O_2}).

3.2.4. Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión y análisis de la viabilidad celular

Con el fin de estudiar la morfología de las células y la formación de algunas estructuras intracelulares se llevó a cabo la toma de muestras y preparación de las mismas para ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Las muestras fueron llevadas al Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) e Instalación Científico Tecnológica Singular (ICTS), Centro Nacional de Microscopía Electrónica situado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Para la observación de posibles **estructuras intracelulares** (cuerpos de inclusión) las células se fijaron y fueron embebidas en una resina. En primer lugar, las células se centrifugaron y se fijaron con una solución de para-formaldehído purificado al 4 % y glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato. Tras la fijación de las células, éstas se lavan

hasta 4 veces con tampón fosfato. Posteriormente se hace una post-fijación con tetróxido de osmio diluido al 1% en agua desionizada. Después, las células se lavan 3 veces y se comienza con la deshidratación en presencia de concentraciones crecientes de acetona, comenzando por acetona al 30% y acabando con acetona al 100%, para eliminar toda el agua asegurando la integridad de las células. Por último, se retira la acetona y se añade resina Spurr, dejando polimerizar la muestra en la estufa a 70 °C durante 48 horas. Una vez polimerizada la resina, se lleva al Centro de Microscopía Electrónica, donde realizan cortes ultrafinos. Estos cortes se colocan en rejillas para realizar las observaciones. Todo el material necesario para la preparación de las muestras fue proporcionado por el Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

Para poder estudiar la **morfología de las células**, las muestras se prepararon usando la técnica de tinción negativa. Para ello, se pone en contacto la rejilla para el microscopio electrónico con una gota del cultivo celular. Esta rejilla se pasa por una solución de acetato de uranilo. La rejilla se seca y posteriormente se hacen las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión. Durante toda la tinción se debe evitar la exposición de las muestras a la luz solar. Igual que para el procedimiento anteriormente descrito, todo el material necesario para llevar a cabo la tinción negativa fue proporcionado por el Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

La **viabilidad celular** se estudió mediante la técnica de contaje de viables en placa. Para ello, se emplea una dilución seriada de las muestras del cultivo en suero salino. Se lleva a cabo la siembra en placa de algunas de las diluciones por triplicado. Las placas utilizadas son de medio LB-agar con estreptomycinina, y se incuban a 37 °C durante 24 h en la estufa. Pasadas las 24 horas se realiza el contaje de unidades formadoras de colonias (UFC), en las placas que presenten entre 30 y 300 colonias. Con el factor de dilución y las UFC se puede determinar la concentración de células viables en el cultivo.

3.2.5. Análisis de proteínas totales

El trabajo con técnicas de Biología Molecular para el análisis de proteínas totales se ha llevado a cabo en los laboratorios del Grupo de *Biotecnología Medioambiental*, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), bajo la supervisión del Profesor José Luis García López y la Dra. Carmen Felpeto-Santero.

El análisis de las proteínas totales producidas por las células se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS). Los análisis de proteínas llevados a cabo en esta Tesis Doctoral son de carácter cualitativo, por lo que no se realiza la cuantificación de las proteínas producidas. En este tipo de electroforesis, las proteínas se desnaturalizan en presencia de docecil-sulfato sódico (SDS) y se emplean geles de poliacrilamida (PAGE) al 10 % (v/v). Para llevar a cabo la preparación de la muestra se centrifugó 1 mL del medio de cultivo a 13000 rpm durante 3 min. El *pellet* obtenido se resuspende en tampón Tris-HCl 20 mM y NaCl 150 mM (pH de 7,5), con el volumen necesario para obtener soluciones concentradas de biomasa a 13 g.L⁻¹. Posteriormente se emplea un *buffer* de carga, conteniendo por 100 mL (4X): 10 mL de Tris-HCl 2,5 mM (pH 6,8); 9,2 mL glicerol al 87 %; 40 mL de SDS al 20 %; 0,02 mL azul de bromofenol al 0,2 %; 10 mL β-mercaptoetanol y 30,8 mL ddH₂O. Se mezclan 4 μL de esta solución con 2,5 μL del concentrado celular. Las electroforesis se llevan a cabo a temperatura ambiente empleando un tampón de electroforesis cuya composición es la siguiente: Tris-HCL 25 Mm, en glicerol 192 mM y un 0,1 % de SDS. Para teñir las proteínas del gel se emplea el colorante azul de coomassie. Como patrón de tamaños moleculares se emplea *BlueStar Prestained Protein Marker*, que contiene proteínas conocidas unidas covalentemente a fluoróforos de tamaños moleculares que van de 10 kDa a 180 kDa.

3.2.6. Manipulación de ADN: transformación bacteriana

El trabajo con técnicas de Biología Molecular, para la creación de nuevas cepas mediante transformación bacteriana se ha realizado en los laboratorios del Grupo de *Biotecnología Medioambiental*, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la supervisión del Profesor José Luis García López y la Dra. Beatriz Galán Sicilia.

La manipulación de ADN, así como la mayoría de las técnicas de Biología Molecular empleadas, se llevan a cabo según la metodología de trabajo del grupo de investigación del Prof. José Luis García-López [136]. Las distintas enzimas de restricción empleadas (endonucleasas de restricción) son de la casa New England Biolabs, así como cada uno de los *buffers* específicos de cada enzima. Las enzimas polimerasas NZYTM II 2X Green Master Mix y PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase son empleadas para la amplificación de material genético por PCR. La enzima empleada para llevar a cabo la ligación de los fragmentos de ADN es la enzima T4DNA ligase de la casa New England Biolabs. Todas estas enzimas se utilizan en función de las especificaciones proporcionadas por las casas

comerciales. Para la purificación de material genético amplificado se emplea el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y, para la purificación y extracción de plásmidos, el kit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Para cuantificar la concentración de ADN se emplea el equipo NanoPhotometer Pearl de la casa Implen GmbH.

Vector empleado para clonar genes y para la transformación de bacterias

El plásmido empleado como vector para la clonación de los distintos genes en *S. blattae* p424IbPSO, fue el plásmido pIZ1016. Este plásmido, tiene un origen de replicación (pBBR1) de amplio espectro de uso, con un número de copias medio (de 15 a 20 copias del plásmido) y resistencia a gentamicina. Se seleccionó este plásmido ya que es compatible con el plásmido pSEVA, el cual ya tiene la cepa modificada *S. blattae* p424IbPSO. Las cepas resultantes contendrán dos plásmidos: el pSEVA con el operón IbPSO, descrito por Felpeto-Santero et al 2015 [95], y el plásmido pIZ1016, con los genes que se desea introducir. El vector se obtiene mediante el protocolo de purificación de plásmidos del kit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) de la cepa *E. coli* pIZ, según las indicaciones de la casa comercial.

En el plásmido seleccionado, pIZ, se pretende introducir el gen *adhA* de la cepa *Lactococcus lactis* IL1403, y los genes *pntAB* de la cepa *Escherichia coli* MG1655. Estos plásmidos se emplearán posteriormente para transformar la cepa *S. blattae* p424IbPSO. Además, se hará una cepa control la cual contenga el plásmido p424IbPSO y el plásmido pIZ sin la inserción de ningún gen.

Oligonucleótidos empleados en la amplificación de ADN

Para poder extraer los genes, que se desean introducir, de las cepas que los contienen y proceder a su amplificación, es necesario diseñar oligonucleótidos que sirvan como cebadores de la polimerasa en las PCRs. Los oligonucleótidos diseñados para extraer el gen *adhA* de *Lactococcus Lactis* IL1403 y el gen *pntAB* de *Escherichia coli* MG1655, son los siguientes:

- Oligo Forward (F) *adhA*: 5'-CCCCCGGGTGACTAAGGAGGTGAATAATGAAAGCAGCAGTAGTAAGACAC-3'

- Oligo Reverse (R) *adhA*: 5'GCTCTAGATTATTTAGTAAAATCAATG ACCATTTCGGC- 3'
- Oligo F *pntAB*: 5'-CGCTGCAGTCATCAATAAAACCGATGGAAGGG -3'
- Oligo R *pntAB*: 5'-CGAGCTCAGCAGAGGCCGTCAGGG- 3'

Para la construcción de los oligos, se debe tener en cuenta las que las enzimas de restricción estén en la región *Multiple Cloning Site* (MCS) del vector pIZ1016 y que no se encuentren en el gen que se desea clonar. Para el gen *adhA* se han empleado las enzimas de restricción XmaI y XbaI. Para el gen *pntAB* se han empleado las enzimas de restricción PstI y SacI. Los oligos son sintetizados por la casa Sigma Aldrich a partir de la secuencia propuesta.

Extracción gen *adhA* de *Lactococcus lactis* II1403

El gen *adhA* se obtendrá de la cepa de *L. lactis* II1403. El gen *adhA* tiene 1023 nucleótidos. En primer lugar, se crece un cultivo de *L. lactis* II1403, con este crecimiento se obtendrá un molde para realizar la extracción y amplificación del gen de interés. Para llevar a cabo la PCR se emplean: 5 µL del oligo F-*adhA*, 5 µL del oligo R-*adhA*, 5 µL de molde, 25 µL de NZYTaQ II 2X Green Master Mix y agua desionizada hasta un volumen final de 50 µL. Una vez finalizada la PCR se lleva a cabo la purificación del material genético obtenido con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), según el protocolo proporcionado por la casa comercial. El producto de cada PCR se analiza en geles de agarosa.

Extracción gen *pntAB* de *Escherichia coli* MG1655

El gen *pntAB* se obtendrá de la cepa de *E. coli* MG1655. El gen *pntAB* tiene 2932 nucleótidos. En primer lugar, se crece un cultivo de *E. coli* MG1655, con este crecimiento se obtendrá un molde para realizar la extracción y amplificación del gen de interés. Se mezclan 5 µL del oligo F-*pntAB*, 5 µL del oligo R-*pntAB*, 5 µL de dNTPs, 10 µL de buffer de polimerasa PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (5X), 5 µL del molde de células preparado, 2,5 µL de DMSO, 1 µL de la enzima PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase y agua desionizada hasta un volumen final de 50 µL. La amplificación del gen se lleva a cabo mediante PCR en un equipo Mastercycler Gradient de la casa comercial Eppendorf. La purificación del material genético obtenido se realiza con el kit High Pure PCR Product

Purification Kit (Roche), según el protocolo proporcionado por la casa comercial. El producto de cada PCR es analizado en geles de agarosa.

Análisis de fragmentos de ADN: electroforesis en gel de agarosa

Como método de análisis de ADN se empleó la electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica permite ver los fragmentos de ADN, y la principal finalidad es hacer un seguimiento de los fragmentos de ADN que se extraen de distintas cepas bacterianas y se insertan en los distintos vectores. Los geles preparados contienen un 0,7 % de agarosa (p/v) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, a pH 8,1). El mismo tampón se empleó como electrolito o buffer para correr los geles. A todas las muestras se le añade un 25 % de su volumen de tampón de carga. El tampón de carga está compuesto por un 30% (p/v) de Ficoll 400, 0,2 % (p/v) de azul de bromofenol, 0,2 % (p/v) de xilencianol y EDTA 40 mM a un pH de 8,0. Las electroforesis se llevan a cabo a 100 V durante 25 minutos, y, una vez acabada, se tiñe el gel con el colorante Red Safe. Para observar los fragmentos de ADN se emplea radiación ultravioleta en un transiluminador. Como patrones de tamaño molecular se empleó ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción BstEII.

Secuenciación de los genes extraídos

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en la empresa SECUGEN SL, del servicio de Secuenciación Automática de DNA (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). La secuencia de nucleótidos se analiza con el software *Geneious*, con el fin de comprobar que no hay mutaciones.

Transformación de la cepa *S. blattae* p424IbPSO

Los genes obtenidos se introducen en el vector pIZ1016, mediante la digestión del vector y los genes con las enzimas de restricción seleccionadas para cada gen, comentadas anteriormente, y su posterior ligación con la enzima T4-DNA ligasa. Una vez obtenido el plásmido con el nuevo gen, éste se introduce mediante electroporación en la cepa de *S. blattae* p424IbPSO. A un volumen de 200 μ L de células electrocompetentes se añade 1 μ g del DNA con el que se van a transformar. Esta mezcla se dispone en una cubeta de electroporación (Cell Projects, 50 x 2 mm) y se incuba durante 10 min en hielo. La

electroporación se hace en un electroporador a 2.5 kV, 25 μ F y 1000 Ω y se incuba la cubeta en hielo otros 10 min. En la cubeta también se añade 1 mL de medio LB y se incuba durante dos horas a 37 °C. Posteriormente, se realizan cultivos en medio sólido LB con gentamicina y estreptomycinina, para seleccionar las cepas que contienen los dos plásmidos, durante 24 h a 37 °C. Pasadas estas 24 horas, las colonias que hayan crecido se resuspenden individualmente en medio líquido LB con estreptomycinina y gentamicina, y se incuban 24 h a 37 °C. Transcurridas estas 24 horas, se procede a la extracción de los plásmidos con el kit de purificación de plásmidos. Con el material purificado se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa y la secuenciación genética de los mismos. La electroforesis y la secuenciación servirán para comprobar que la transformación con el nuevo plásmido se ha realizado con éxito, sin mutaciones, y que las cepas resultantes contienen ambos plásmidos con los genes introducidos.

Las cepas resultantes se preparan para su conservación a -80 °C mediante el procedimiento o protocolo para la conservación de microorganismos comentado anteriormente.

3.2.7. Métodos matemáticos y herramientas informáticas

A continuación, se exponen de manera breve, los métodos matemáticos y el software empleado con distintos fines de cálculo y de diseño experimental.

Diseño experimental por el método Taguchi

El método Taguchi es un método de diseño experimental que permite conocer la influencia de múltiples variables en un proceso de forma simultánea [137]. Es decir, permite estudiar la influencia de los factores seleccionados para el estudio, y el efecto de los niveles de los mismos, sobre una respuesta seleccionada con anterioridad. Para el diseño experimental este método combina métodos de estadística y de ingeniería para optimizar procesos. La metodología Taguchi permite reducir al máximo el número de experimentos a realizar para conocer la influencia de los factores seleccionados y sus niveles [138]. Con los factores (por ejemplo, temperatura, agitación, concentración de extracto de levadura) y sus niveles seleccionados (por ejemplo 25, 30 y 35 °C en el caso de la temperatura), y la respuesta que se pretende optimizar (por ejemplo, rendimiento en isobutanol o productividad), el método Taguchi emplea un diseño ortogonal estandarizado y ofrece una

matriz de experimentos, con los niveles que se deben emplear en dichos experimentos para cada factor. La principal diferencia con otro tipo de diseño experimental, es que este método permite reducir de manera considerable el número de experimentos a realizar para conocer la influencia de distintos factores. La matriz de experimentos en el caso de este trabajo, se obtuvo mediante el uso del software *Statgraphics Centurion XVII*. Así mismo, los resultados obtenidos se analizaron con esta herramienta informática. Tras el análisis de los resultados, la herramienta proporciona la información relativa a los experimentos de confirmación que se deben realizar, en dichos experimentos el resultado obtenido debe ser mejor o, al menos, mantenerse igual que la mejor respuesta obtenida en todo el estudio.

Predicción de k_La y cálculo de OTR, OUR, k_La y q_{O_2}

La determinación de la velocidad de transporte del oxígeno (OTR), la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}), se ha llevado a cabo con el fin de extraer conclusiones tanto de los requerimientos como el efecto del propio oxígeno en este proceso. Es necesario, en primer lugar, conocer el flujo molar de oxígeno a la entrada y a la salida del reactor. Como se ha comentado anteriormente, la concentración de oxígeno a la entrada del reactor se mantiene constante (21 %), ya que el aire se ha alimentado a partir de una botella de aire industrial comprimido. La concentración de oxígeno a la salida del reactor se ha medido con un equipo que proporciona el porcentaje de oxígeno contenido en dicha corriente (χ_{O_2}). Asumiendo que el oxígeno se comporta como un gas ideal, se puede aplicar la ecuación de los gases ideales, en función de la temperatura (T), la presión (P), y el caudal volumétrico (Q), en la corriente de entrada y en la corriente de salida, se pueden obtener el flujo molar a la entrada ($F_{O_2}^{IN}$) y a la salida del reactor ($F_{O_2}^{OUT}$), según la ecuación (3.2):

$$F_{O_2} = \chi_{O_2} \cdot \frac{P \cdot Q}{R \cdot T} \quad (3.2)$$

Conociendo el volumen de caldo donde se lleva la reacción (V) se puede aplicar la siguiente ecuación para obtener OTR:

$$\frac{F_{O_2}^{IN} - F_{O_2}^{OUT}}{V} = OTR = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (3.3)$$

Como se muestra en la ecuación (3.3), OTR también se puede calcular si se conoce la concentración de saturación de oxígeno disuelto ($C_{O_2}^*$) en la fase líquida, la concentración de oxígeno disuelto en cada momento (C_{O_2}) en la fase líquida y el coeficiente

volumétrico de transferencia de materia (k_{LA}). En el caso de este trabajo, los valores de k_{LA} se han obtenido mediante un método predictivo [139]. Los pasos que se deben llevar a cabo para obtener este coeficiente volumétrico de transferencia de materia se desarrollan con profundidad en trabajos previos del grupo y en la Publicación 4 del Anexo de esta Memoria [127, 134, 135].

Conocida la concentración de oxígeno disuelto y su evolución con el tiempo, así como la velocidad de transporte de oxígeno, se puede determinar la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) mediante la siguiente ecuación:

$$OUR = OTR - \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad (3.4)$$

Por último, conocida la concentración de biomasa (C_x) durante toda la fermentación, se pueden obtener valores discretos de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) mediante la siguiente ecuación (3.5):

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{C_x} \quad (3.5)$$

Métodos matemáticos y software empleado para la modelización cinética del proceso

La estimación de los parámetros del modelo cinético propuesto se obtiene mediante el ajuste del mismo a los datos experimentales. Dado que los datos obtenidos en este estudio son integrales (C vs. t), el cálculo de los parámetros se ha llevado a cabo empleando métodos integrales, para lo que es necesario integrar las ecuaciones diferenciales utilizando un algoritmo de integración acoplado a uno de regresión no lineal [140]. Para ello, se ha empleado el software *Aspen Custom Modeler*®, que incluye distintos algoritmos de cálculo. La integración de las ecuaciones diferenciales de los modelos se ha realizado utilizando el método implícito de Euler, mientras que para el ajuste no lineal de los modelos a los datos experimentales se ha empleado el algoritmo NL2SOL (*non-linear least-squares solver*), cuya función objetivo es minimizar la suma de los cuadrados de los residuos (SRC).

La suma de residuos al cuadrado, da información acerca de la calidad de ajuste del modelo a los datos experimentales, cuanto menor sea su valor, mejor es el ajuste. La SRC está definida por la siguiente ecuación (3.6):

$$SRC = \sum_{j=1}^N (C_j^{exp} - C_j^{cal})^2 \quad (3.6)$$

La validación de los modelos y la bondad de los distintos ajustes también se han determinado mediante el criterio estadístico F de Fisher (3.7), que da información acerca del ajuste global en función de los grados de libertad y para un nivel de confianza (del 95 % por defecto en la herramienta informática).

$$F_{Fisher} = \frac{\sum_{j=1}^N \frac{(C_j^{cal})^2}{Pa}}{\sum_{j=1}^N \frac{SRC}{Nd - Pa}} \quad (3.7)$$

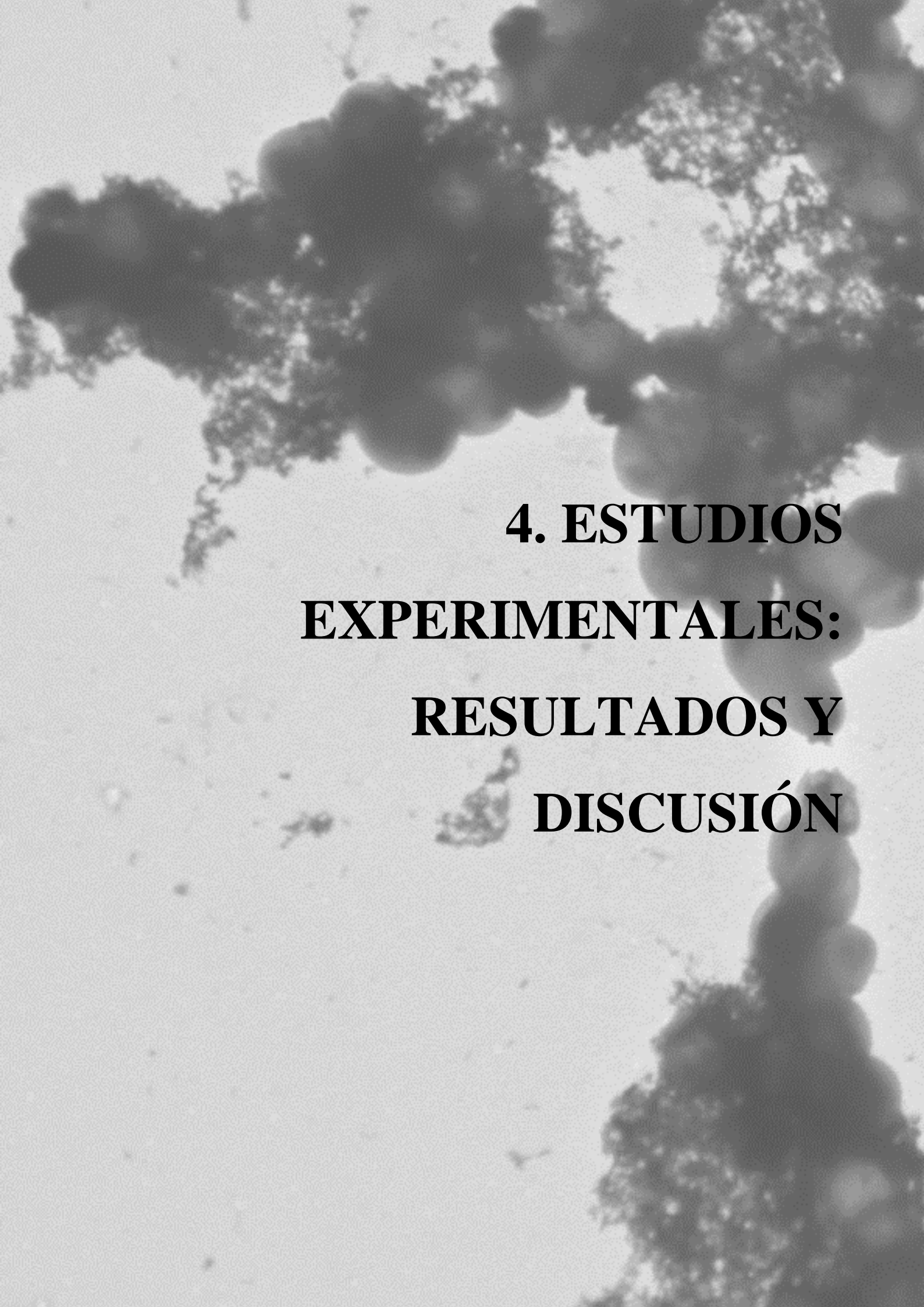
dónde: Pa es el número de parámetros y Nd el número total de datos experimental.

El porcentaje de variación explicado (%VE), indicador de la semejanza entre los datos experimentales y la reproducción por el modelo. La capacidad explicativa del modelo será mayor cuanto más se acerque este parámetro al 100 %, y se obtiene mediante la siguiente ecuación (3.8):

$$VE (\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{j=1}^N \frac{(C_j^{exp} - C_j^{cal})^2}{C_j^{cal}}}{\sum_{j=1}^N \frac{(C_j^{exp} - \bar{C}_j^{exp})^2}{C_j^{cal}}} \right) \quad (3.8)$$

donde:

$$\bar{C}_j^{exp} = \frac{\sum_{j=1}^N \frac{C_j^{exp}}{(C_j^{cal})^{1/2}}}{\sum_{j=1}^N \frac{1}{(C_j^{cal})^{1/2}}} \quad (3.9)$$



**4. ESTUDIOS
EXPERIMENTALES:
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN**

4. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En este apartado se comentan de forma resumida los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral, los resultados se han dividido en tres bloques, que son los siguientes:

- **Producción de isobutanol con células en crecimiento.** Los resultados dieron lugar a las **publicaciones 1, 2 y 3**, que se presentan en el Anexo de esta Memoria.

- **Publicación 1.**

Autores: Miguel G. Acedos, Alberto Ramón, Susana de la Morena, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions.

Revista: *Biochemical Engineering Journal* (2018), 133:21-27.

- **Publicación 2.**

Autores: Miguel G. Acedos, Pedro Yustos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: Carbon flux distribution in the metabolism of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) for isobutanol production from glucose as function of oxygen availability.

Revista: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2018), 94(3):850-858.

- **Publicación 3.**

Autores: Miguel G. Acedos, Isabel de la Torre, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: Kinetic modelling of the isobutanol production from glucose using *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) strain: effect of initial substrate concentration.

Revista: *Industrial & Chemical Engineering Research* (2019), 58 (4): 1502-1512.

- **Producción de isobutanol con células en estado de *resting cells***. Los resultados se pueden ver en las **publicaciones 4 y 5**, en el Anexo de la presente Memoria.

- **Publicación 4.**

- Autores: Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

- Título: Resting Cells Isobutanol Production by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Influence of Growth Culture Conditions.

- Revista: *Biotechnology Progress* (2018) 34 (5): 1073-1080.

- **Publicación 5.**

- Autores: Miguel G. Acedos, Andrea Hermida, Emilio Gómez, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

- Título: Effects of fluid-dynamic conditions in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) cultures in Stirred Tank Bioreactors: Hydrodynamic stress and change of metabolic routes by oxygen availability.

- Revista: *Biochemical Engineering Journal* (Aceptado el 21 de mayo de 2019)

- **Nuevas construcciones genéticas** para la mejora de la producción de isobutanol. Este trabajo se está desarrollando actualmente, por lo que se incluyen en este apartado los resultados obtenidos hasta el momento.

Los experimentos, para la construcción de nuevas cepas de *S. blattae*, han sido realizados en colaboración entre el Grupo *Biotecnología Medioambiental* del Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el grupo FQPIMA del Departamento de Ingeniería Química y de Materiales de la Universidad Complutense de Madrid. El trabajo ha sido desarrollado por Miguel G. Acedos, bajo la supervisión de la Dra. Beatriz Galán Sicilia y el Prof. José Luis García López del CIB-CSIC, y la Prof. Victoria E. Santos y el Prof. Félix García-Ochoa Soria del grupo FQPIMA de la UCM.

4.1. Producción de isobutanol con células en crecimiento

El primer bloque de este estudio está formado por los estudios realizados para la optimización de la producción de isobutanol empleando células en crecimiento, en primer lugar, en escala de matraz en incubadora orbital y posteriormente a escala de reactor de 1 y 2 L. Los resultados de este bloque, como se ha apuntado previamente, se recogen en las publicaciones científicas 1, 2 y 3, que se pueden encontrar en el Anexo de esta memoria. A continuación, se detallan los resultados obtenidos y mostrados en cada una de las citadas publicaciones.

4.1.1. Publicación 1: Estudio de las condiciones de operación

Miguel G. Acedos, Alberto Ramón, Susana de la Morena, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa. *Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions*. *Biochemical Engineering Journal* (2018), 133:21-27.

En este primer trabajo, se abordan los estudios preliminares sobre la composición del medio de cultivo, el efecto del oxígeno disponible y el efecto de pH, en la producción de isobutanol empleando células en crecimiento. Los experimentos sobre el estudio del medio de cultivo se llevaron a cabo en botellas cerradas para evitar la evaporación del isobutanol y empleando el medio de cultivo más ampliamente utilizado para este proceso encontrado en la literatura, el medio mínimo de sales M9. Lo primero que se probó fue aumentar la concentración de las sales fosfato de este medio, obteniendo así el medio mínimo M92X. Las sales fosfato forman un tampón natural en el medio que amortigua la bajada de pH durante la fermentación. De esta forma se aumenta la producción de isobutanol en 1 g.L^{-1} aproximadamente, desde $2,69 \text{ g.L}^{-1}$ a $3,68 \text{ g.L}^{-1}$, y el rendimiento de $0,14 \text{ g}_{\text{ib}}.\text{g}_{\text{GC}}^{-1}$ hasta $0,18 \text{ g}_{\text{ib}}.\text{g}_{\text{GC}}^{-1}$. El rendimiento máximo teórico para el isobutanol con esta cepa usando glucosa como fuente de carbono es de $0,41 \text{ g}_{\text{ib}}.\text{g}_{\text{GC}}^{-1}$, este valor refleja la cantidad máxima de isobutanol que se puede producir por cada gramo de glucosa consumido y fue obtenido mediante el balance de electrones y grados de reducción del carbono [141]. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el pH durante la fermentación afecta a la producción de isobutanol, y que debe ser estudiado con mayor profundidad, como se aborda en esta publicación.

Debido a que la fuente de nitrógeno supone una parte importante de los costes del proceso, en este trabajo también se estudió la posibilidad de reducir la concentración del extracto de levadura empleada en el medio de fermentación M92X. En la introducción del artículo se muestra una tabla comparativa (*Tabla 1* de la Publicación 1) de las concentraciones de distintas fuentes de nitrógeno de los procesos de producción de isobutanol llevados a cabo en condiciones similares. Como se puede apreciar, la mayoría de los estudios encontrados en literatura emplean concentraciones de fuente de nitrógeno elevadas, lo que puede llevar a que el proceso no sea económicamente viable. Por tanto, se probaron 3 concentraciones decrecientes de extracto de levadura en el medio M92X (5, 3 y 1,5 g.L⁻¹). Los resultados se muestran en la *Tabla 2* de la publicación 1. Como se puede ver, la concentración máxima de isobutanol y el rendimiento obtenido son similares para las 3 concentraciones de extracto de levadura probadas, aproximadamente 3,6 g.L⁻¹ de isobutanol y un rendimiento de 0,17 g_{ib}.g_{GC}⁻¹. Por lo tanto, la concentración de extracto de levadura se puede reducir 3,3 veces sin que tenga efecto sobre la producción.

Debido a la importancia del oxígeno en el proceso de producción de isobutanol, en este trabajo se estudió el efecto de la cantidad de oxígeno disponible. Para ello, se utilizaron botellas cerradas de distintos volúmenes con distintos volúmenes de caldo de cultivo; de esta manera, se consigue obtener cámaras de aire de distinto volumen cambiando la cantidad de oxígeno disponible. Se emplearon cámaras de aire de 16,0, 33,3, 50,0, 66,7, 71,7 y 91,7 % dentro de las botellas. Los resultados también se pueden observar en la *Tabla 2* de la Publicación 1. Como se puede observar, la concentración de isobutanol obtenida es mayor a medida que se aumenta la cantidad de oxígeno dentro de la botella, pasando de 0,81 g.L⁻¹ de isobutanol con un 16,0 % de gas, hasta 5,71 g.L⁻¹ de isobutanol con un 91,7 % de gas dentro de la botella. Por lo tanto, se puede concluir que el oxígeno disponible para los microorganismos es otra de las variables con mayor influencia en el proceso. Como muchos autores apuntan, el oxígeno es necesario en este proceso debido a que la ruta metabólica precisa de cofactores reducidos, que sólo se producen en condiciones aeróbicas (NADPH); una vez se acaba el oxígeno, se produce un desbalance de cofactores reducidos y oxidados NADPH/NADP⁺ y se detiene la ruta metabólica, y, por consiguiente, la producción de isobutanol también se detiene. Por otro lado, la cantidad de oxígeno disponible también afecta a la distribución de los distintos metabolitos producidos por la bacteria, como el ácido láctico, el ácido acético y el etanol. Como se puede ver en la *Figura 3* de dicha publicación, para concentraciones bajas de oxígeno, se produce una mayor

cantidad de ácido láctico y etanol. A medida que se aumenta la cantidad de oxígeno disponible, la concentración de estos dos subproductos disminuye, y aumenta la concentración de isobutanol y de ácido acético. Esto vuelve a indicar que el oxígeno es un compuesto indispensable en el proceso de producción de isobutanol y que su influencia debe ser estudiada con mayor profundidad a escala de reactor, donde se puede controlar la velocidad de transferencia de oxígeno (lo que se aborda en las Publicaciones 2 y 5 del Anexo de esta Memoria)

Por último, en este artículo se muestran los estudios de pH llevados a cabo en reactores de 1 L cerrados, para evitar las pérdidas de isobutanol por evaporación. Se plantearon 5 estrategias de pH: desde su control en el valor inicial del medio de cultivo, 6,8; pasando por dejarlo evolucionar libre desde el valor inicial y controlarlo en distintos valores (6,3, 6,0 y 5,7); hasta dejarlo evolucionar libre durante toda la fermentación. Los resultados se pueden observar en la *Figura 4* de la publicación 1. En la que se puede observar que, con la estrategia de controlar el pH en un valor de 6,0 tras dejarlo evolucionar libre desde un valor de 6,8, se obtuvieron los mejores resultados, aproximadamente 11 g.L⁻¹ de isobutanol. El porcentaje sobre el rendimiento máximo teórico alcanzado es aproximadamente del 70 %, lo que supone uno de los rendimientos mayores reportados en la literatura.

Estos resultados también se mostraron en una comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *Bio.Iberoamérica 2016*, celebrado en la ciudad de Salamanca entre el 5 y el 8 de junio de 2016. Título de la Comunicación: “*Production of isobutanol by a novel recombinant biocatalyst Shimwellia blattae strain: preliminary studies on medium composition and dissolved oxygen influences*”. Autores: Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

4.1.2. Publicación 2: Influencia de la disponibilidad de oxígeno en el flujo de carbono

Miguel G. Acedos, Pedro Yustos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa. *Carbon flux distribution in the metabolism of Shimwellia blattae (p424IbPSO) for isobutanol production from glucose as function of oxygen availability*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology (2018), 94(3):850-858.

Debido a la importancia del oxígeno en el proceso de producción de isobutanol, y teniendo en cuenta las numerosas controversias encontradas en la literatura acerca de si el proceso debe ser llevado o no en condiciones aeróbicas, se llevó a cabo un estudio del efecto del oxígeno disponible durante la fermentación. Estos estudios se llevaron a cabo en reactor tipo tanque agitado de 1 L de volumen. Debido a que el isobutanol se evapora con gran facilidad, y esta evaporación además se ve incrementada cuando se burbujea un gas, por el arrastre que provoca, como paso previo al estudio, fue necesario diseñar un sistema de retención para el alcohol en la corriente de salida del gas. Los experimentos para conseguir un sistema de retención de isobutanol se hicieron con biorreactores de 1 L que contenían agua e isobutanol puro que se alimentaba al reactor a una velocidad de $0,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, simulando una producción real de isobutanol. Como se puede apreciar en la publicación, se probó a utilizar un disolvente orgánico ampliamente empleado para estos fines en la literatura [110], oleil alcohol, en trampas a la salida del reactor, obteniendo porcentajes de retención cercanos al 60 %. El porcentaje de retención de isobutanol era mayor si el oleil alcohol se añadía al caldo de cultivo, obteniendo porcentajes de retención cercanos al 80 %. Uno de los principales inconvenientes que tiene este último sistema es la aparición de emulsiones, que podrían afectar negativamente al crecimiento bacteriano. Por último, se colocaron trampas frías (-14°C) en la salida de gases del reactor, obteniendo porcentajes de retención de isobutanol cercanos al 95 % del isobutanol alimentado en el reactor. Por ello, el sistema que se empleó para los estudios realizados posteriormente con una corriente de aire continua fue el de trampas frías a la salida del reactor.

Con el sistema de retención de isobutanol idóneo, trampas frías a la salida del reactor, se llevaron a cabo 4 experimentos. Uno en condiciones limitantes de oxígeno, en el reactor cerrado, en el cual, una vez consumido el oxígeno contenido en el reactor, no se aporta más oxígeno. Los otros tres experimentos se llevaron a cabo con una alimentación continua de aire, a un caudal constante (1vvm), a tres agitaciones distintas (150, 400 y 600 rpm) con el fin de modificar la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR). La evolución de la biomasa, glucosa, isobutanol y demás subproductos, durante la fermentación se puede ver en la *Figura 2* de la publicación 2. La producción de isobutanol fue mayor para el experimento llevado a cabo en condiciones limitantes de oxígeno, donde se cerraba el reactor, en comparación con los experimentos llevados a cabo en condiciones aeróbicas. Por otro lado, se observó la aparición de un nuevo compuesto, desconocido en este proceso hasta el momento, en el análisis del detector Diodo de Array (DAD) del HPLC para los

experimentos realizados en condiciones aeróbicas. Para determinar si el nuevo compuesto tenía un peso significativo en el balance de carbono, se hizo este balance para los cuatro experimentos con los compuestos cuantificados hasta el momento. El balance sólo cerraba adecuadamente para el caso del experimento llevado a cabo en condiciones limitantes de oxígeno. Por lo tanto, el compuesto que apareció en el análisis por HPLC tiene un peso importante en el balance de carbono.

Para la identificación de este compuesto, se llevaron a cabo distintos análisis de las muestras, tales como cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC-MS) y análisis por RMN. Los resultados obtenidos mediante GC-MS se muestran en la *Tabla 3* de la publicación 2. Mediante este análisis se determinó la presencia de ácido isobutírico y acetoína en condiciones aeróbicas. Además, mediante HPLC-MS, se identificaron dos compuestos que aparecían en las fermentaciones aeróbicas y no en la fermentación llevada a cabo en condiciones limitantes de oxígeno, como se puede ver en la *Figura 4* de la publicación. Con el análisis de espectrometría de masas se pudo determinar qué tipo de compuestos eran: el primero de ellos, con una masa molecular de $154 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, es 3-oxo-1-buten-2-yl, formado por una dimerización de monómeros de diacetilo; el segundo de estos compuestos, de $138 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, se identificó como acetil fosfato, intermedio en la ruta de síntesis del ácido acético, la cual presenta una alta actividad en condiciones aeróbicas. Como puede verse en la *Figura 5* de la publicación, se determinó que, en condiciones aeróbicas, el metabolismo de la célula dirige la producción a ácido isobutírico, 3-oxo-1-buten-2-il éter y acetil fosfato. La cepa *Shimwellia blattae* WT y por lo tanto la cepa *S. blattae* (p424IbPSO), tiene de manera endógena los genes que codifican para la enzima FeaB, capaz de transformar el isobutiraldehído en ácido isobutírico en condiciones aeróbicas. Además, el 2-acetolactato (primer intermedio en la ruta de síntesis de isobutanol) se puede oxidar químicamente (en presencia de oxígeno) a diacetilo, y éste a su vez puede dimerizarse en presencia de NaOH y formar 3-oxo-1-buten-2-il éter. En cambio, en condiciones limitantes de oxígeno, la producción de isobutanol, ácido láctico y etanol se ve favorecida. Con este estudio, se determinó que la producción de isobutanol con la cepa *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) se debe llevar a cabo en condiciones limitantes de oxígeno, para evitar así la aparición de compuestos, de un grado mayor de oxidación, no deseados en dicha producción.

4.1.3. Publicación 3: Efecto de la concentración inicial de sustrato y modelo cinético

Miguel G. Acedos, Isabel De la Torre, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.
Kinetic Modelling of the Isobutanol Production from Glucose Using Shimwellia blattae (p424IbPSO) Strain: Effect of Initial Substrate Concentration. Industrial & Chemical Engineering Research (2019), 58(4): 1502-1512.

Con las condiciones óptimas obtenidas en los estudios previos, mostradas en las publicaciones 1 y 2 del Anexo de esta Memoria, para la producción de isobutanol con células en crecimiento, se llevó a cabo un estudio para optimizar la concentración inicial sustrato. El objetivo principal de este estudio es determinar el efecto de la concentración de glucosa como sustrato carbonado y conocer si existe o no inhibición por sustrato a altas concentraciones del mismo. Para ello, se llevaron a cabo cinco experimentos con concentraciones crecientes de glucosa (30, 40, 45, 50 y 70 g.L⁻¹). Como puede verse en la *Tabla 2* de la publicación 3, el mayor rendimiento en isobutanol, 0,24 g_{ib}.g_{G0}⁻¹, se obtuvo para el experimento llevado a cabo con una concentración inicial de glucosa de 45 g.L⁻¹, en el cual también se obtuvieron los valores de productividad y selectividad más altos, 0,20 g_{ib}.L⁻¹.h⁻¹ y 0,28 g_{ib}.g_{Gc}⁻¹, respectivamente. A partir de esta concentración, tanto rendimiento como productividad y selectividad, disminuyen notablemente. Por lo tanto, se puede decir que para concentraciones mayores de 45 g.L⁻¹ de glucosa la producción de isobutanol es parcialmente inhibida.

Otro de los objetivos de este estudio fue construir un modelo cinético capaz de reproducir la evolución de la biomasa, la glucosa, el isobutanol, y los distintos subproductos con el tiempo de reacción. Los principales subproductos en este proceso son el etanol y diferentes ácidos orgánicos, como el ácido láctico, el ácido acético y el ácido succínico. Para desarrollar el modelo cinético, los ácidos orgánicos fueron agrupados, mediante una técnica conocida como *lumping*, debido a la similitud entre sus curvas de producción. Para ajustar el modelo cinético a los datos experimentales, se empleó la herramienta informática *Aspen Custom Modeler*. En primer lugar, se propuso un esquema general de reacciones que se puede ver en la publicación 3, ecuaciones 5 a 9. A partir de este esquema de reacciones, se definieron las ecuaciones cinéticas para las citadas reacciones, ecuaciones 10 a 15. En el caso de la producción de biomasa, como se puede ver en la *Figura 1* del mismo artículo, ésta tiene una evolución dependiente del oxígeno, una vez este se agota, la biomasa

continúa creciendo durante un cierto tiempo. Para definir la ecuación de la velocidad de reacción del crecimiento de la biomasa se ha hecho la suposición de que la bacteria produce un compuesto intracelular que, cuando se acaba el oxígeno, se emplea para crecer hasta que dicho compuesto se agota. La ecuación empleada es una ecuación tipo Monod modificada, dependiente de la concentración de la glucosa, del oxígeno y del compuesto intracelular a partir del cual es capaz de crecer el microorganismo, ecuaciones 16 a 22. Para el resto de compuestos, se emplearon ecuaciones cinéticas dependientes de la glucosa y la concentración de biomasa como catalizador de la reacción, ecuaciones 23 a 26. Como puede verse en la *Figura 1* del mismo artículo el modelo se ajusta bien a los datos experimentales. Los valores de los parámetros cinéticos, que se muestran en la *Figura 2* y en la *Tabla 3* del artículo, en los que se observa que, según aumenta la concentración de glucosa, el valor de los parámetros cinéticos referentes a la producción de isobutanol y de los diferentes subproductos disminuye. Los parámetros cinéticos referentes a la biomasa muestran que la concentración de sustrato no les afecta, y se puede determinar que, para las concentraciones de glucosa estudiadas, tiene mayor influencia la cantidad de oxígeno disponible que la concentración de sustrato carbonado.

Por último, para llevar a cabo la validación del modelo, se realizó el cálculo de diferentes parámetros estadísticos, que pueden ser observados en la *Tabla 4* de la publicación, entre los que cabe destacar el valor del parámetro F-Fisher para todos los experimentos ajustados con el modelo y el valor del porcentaje de variación explicada, cercano al 100 % en todos los casos. Este modelo cinético es capaz de reproducir con gran fidelidad la evolución de la biomasa, isobutanol y diferentes subproductos en los cinco experimentos antes citados. La aportación de este modelo cinético a la literatura tiene un gran valor, ya que hasta el momento solo se encuentra en la literatura un modelo cinético para la producción de isobutanol con grandes debilidades.

Estos resultados también se presentaron en una comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *3rd ANQUE-ICCE International Congress of Chemical Engineering*, celebrado en la ciudad de Santander entre el 19 y el 21 de junio de 2019. Título de la Comunicación: “*Kinetics on Isobutanol Production from Glucose Using *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) as Biocatalyst*”. Autores: Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

4.2. Producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en los estudios realizados para la producción de isobutanol con células en estado de *resting cells* (en reposo o sin crecimiento), y que se muestran en las publicaciones 4 y 5 del Anexo de esta memoria. Los objetivos principales son, en primer lugar, demostrar la capacidad de producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*, no descrita anteriormente en la literatura; y, en segundo lugar, optimizar el medio de cultivo, las condiciones de operación, y la edad de las células, a la que deben ser recolectadas para llevar a cabo la producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*.

4.2.1. Publicación 4: Influencia de las condiciones de crecimiento

Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa. *Resting Cells Isobutanol Production by Shimwellia blattae (p424IbPSO): Influence of Growth Culture Conditions*. Biotechnology Progress (2018), 34 (5): 1073-1080.

El principal objetivo de este estudio es demostrar la capacidad de producción de isobutanol con la cepa *S. blattae* (p424IbPSO) trabajando con células en estado de *resting cells*. La producción de metabolitos con células en este tipo de operación se divide en dos etapas bien diferenciadas: la primera es la etapa de crecimiento de biomasa; y la segunda, es la etapa de producción del metabolito de interés en la cual, la bacteria no puede crecer por la ausencia de fuente de nitrógeno en el caldo de cultivo y deriva todo el carbono del sustrato a la producción de los distintos metabolitos y a mantenerse energéticamente. En este trabajo, se llevó a cabo la optimización del medio de cultivo para la etapa de crecimiento, de las condiciones de operación en la misma etapa y del tiempo de recolección de las células. Todo ello se abordó mediante un diseño experimental tipo Taguchi. La capacidad de producción de isobutanol de las bacterias se determinó mediante un test de *resting cells* en botellas cerradas. Estos test de *resting* se utilizaron para evaluar la capacidad de producción de isobutanol de las células cultivadas en diferentes condiciones y recolectadas a diferentes tiempos. La respuesta a optimizar elegida es el porcentaje sobre el rendimiento máximo teórico.

El diseño experimental tipo Taguchi se empleó para optimizar la concentración de extracto de levadura como fuente de nitrógeno orgánica (3,0, 1,5 y 0,0 g.L⁻¹), la

concentración de amonio como fuente de nitrógeno inorgánica (1,4, 1,0 y 0,7 g.L⁻¹), la concentración de IPTG como inductor (1,0, 0,5 y 0,1 mM) y la temperatura de crecimiento (35, 30 y 25 °C). El principal objetivo de este estudio es reducir la cantidad de fuente de nitrógeno orgánico necesaria, ya que suele presentar costes elevados y puede hacer que un proceso industrial no sea económicamente viable. Por otro lado, también se estudió la reducción del IPTG como inductor, en primer lugar, para reducir los costes de la producción y, en segundo lugar, porque el empleo de altas concentraciones de IPTG pueden causar la aparición de cuerpos de inclusión que inhiben las células. El empleo de temperaturas altas también puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión, por ello se introdujo en el estudio como una variable con alto peso en el proceso de obtención de biomasa con alta capacidad de producción de isobutanol. Los experimentos propuestos se realizaron para tres edades celulares: células recolectadas en la primera mitad de la fase exponencial del crecimiento, células recolectadas en la segunda mitad de la fase exponencial del crecimiento y, por último, células recolectadas en la fase estacionaria, con el objetivo de determinar el tiempo en el que debían ser recolectadas las células.

La primera conclusión que se obtiene de los resultados es que la producción de isobutanol con esta cepa modificada es posible llevarla a cabo con las células en estado de *resting*. La capacidad de producir isobutanol con células en este estado disminuye a medida que el cultivo envejece, ya que, como puede verse en la *Figura 1* de la publicación 4, los rendimientos obtenidos para las células recolectadas en la fase estacionaria son los menores en todos los casos.

Se analizaron por electroforesis las proteínas totales de células cultivadas con bajas concentraciones de IPTG y bajas temperaturas, y de células cultivadas a altas temperaturas y altas concentraciones de IPTG. Como puede verse en la *Figura 3* del artículo, la concentración de proteínas totales es similar para las células cultivadas bajo condiciones de temperatura y concentración de IPTG diferentes, por lo tanto, se determinó que las proteínas de las células que producían menos isobutanol en *resting cells* no tenían actividad. Para saber si estas proteínas habían formado cuerpos de inclusión y, por tanto, no eran proteínas funcionales, se procedió a la observación de cortes ultrafinos de las células en el microscopio electrónico de transmisión, como se muestra en la *Figura 4* de la publicación. Se observó que las células cultivadas a altas temperaturas y altas concentraciones de IPTG

contenían cuerpos de inclusión: las proteínas mal plegadas son insolubles, se aglomeran y forman los cuerpos de inclusión, estas enzimas, por lo tanto, no son funcionales.

Con el análisis de los resultados, empleando el software *Statgraphics*, y la realización de una serie de experimentos de confirmación, se obtuvieron las condiciones óptimas para producir la biomasa y llevar a cabo la producción con células en estado *resting cells*. Estas condiciones son distintas si las células se recolectan en la primera mitad de la fase exponencial del crecimiento (30 °C, 1,5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 1,4 g.L⁻¹ de amonio y 0,5 mM de IPTG), o si se necesita más cantidad de biomasa y por tanto es necesario realizar la recolección en la segunda mitad de la fase exponencial (30 °C, 0,5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 0,7 g.L⁻¹ de amonio y 0,1 mM de IPTG). Con células recolectadas en la primera mitad de la fase exponencial de crecimiento y cultivadas en las condiciones óptimas determinadas previamente se llegan a obtener rendimientos referidos al máximo teórico del 60 %.

Hasta el momento sólo hay dos estudios en la literatura similares al comentado, donde se lleva a cabo la producción de isobutanol en condiciones de *zero growth production* o producción sin crecimiento. A pesar de esta denominación, la principal diferencia con el estudio que se ha realizado en esta Tesis Doctoral, es que el medio de producción que estos autores emplean contiene distintas fuentes de nitrógeno, entre las que cabe destacar la adición de aminoácidos y vitaminas, y en el caso del presente trabajo el medio de producción está compuesto únicamente por un tampón biológico (tampón citrato 65 mM) y la fuente de carbono. La adición de diferentes compuestos nitrogenados, en especial aminoácidos y vitaminas, puede llevar a que el proceso industrial no sea económicamente viable por el alto coste de estos compuestos. Por lo tanto, estos estudios no presentan las ventajas de la operación en *resting cells* propuestas en este trabajo, ya que tienen mayores costes económicos por el empleo de fuentes complejas de nitrógeno.

Estos resultados también se presentaron en una comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *10th World Congress of Chemical Engineering + 11th European Congress of Chemical Engineering + 4th European Congress of Applied Biotechnology 2017*, celebrado en la ciudad de Barcelona entre el 1 y el 5 de octubre de 2017. Título de la Comunicación: “*Isobutanol Production by Shimwellia blattae p424IbPSO: Improving Culture Medium Composition and Operational Condition through Taguchi Experimental Design*”. Autores: Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

4.2.2. Publicación 5: Efecto de las condiciones fluidodinámicas sobre el crecimiento y las rutas metabólicas

Miguel G. Acedos, Andrea Hermida, Emilio Gómez, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa. *Effects of fluid-dynamic conditions in Shimwellia blattae (p424IbPSO) cultures in Stirred Tank Biorreactors: Hydrodynamic stress and change of metabolic routes by oxygen availability*. Biochemical Engineering Journal (2019) (Aceptado el 21 de mayo de 2019)

En el estudio anterior, cuyos resultados se pueden ver en la publicación 4, se determinó el medio de cultivo óptimo para la etapa de producción de biomasa, así como la temperatura de crecimiento y la edad en la que deben ser recolectadas las células para emplearlas en estado de *resting*. Debido a que la cantidad de biomasa que se necesita para llevar a cabo la producción en biorreactor es elevada, la etapa de crecimiento de biomasa también se debe llevar a cabo en biorreactor de 2 L de volumen. Algunos autores han demostrado que las condiciones fluido-dinámicas pueden tener un efecto importante sobre el crecimiento de las células y su actividad metabólica. Por ello, se realizó un estudio del efecto de las condiciones fluido-dinámicas sobre el crecimiento y sobre la capacidad de producción de isobutanol durante el crecimiento y en la etapa de producción con células en estado de *resting*. En la publicación 5, se muestran los resultados del estudio de la influencia de las condiciones fluido-dinámicas en STBR durante la etapa de crecimiento de la biomasa.

Se llevaron a cabo siete experimentos, en tanque agitado, empleando diferentes velocidades de agitación (100, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 rpm) y burbujeando un caudal constante de aire (1vvm). En todos los experimentos se hizo un seguimiento de la biomasa mediante medidas espectrofotométricas y un seguimiento de células viables por conteo de viables en placa. Así mismo, se realizaron observaciones (con tinción negativa) en el microscopio electrónico y se llevó a cabo el seguimiento de metabolitos por HPLC durante el crecimiento. Para determinar la capacidad de producción de isobutanol, se llevaron a cabo dos test de *resting cells* para cada experimento, uno en la primera mitad de la fase exponencial y otro en la segunda mitad de la fase exponencial. Por otro lado, se estimó teóricamente el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}) para cada experimento. Con el valor de k_{LA} y las medidas de oxígeno disuelto en el caldo

se determinaron la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la tasa específica de consumo de oxígeno (qO_2), como se explicó en el apartado de Materiales y Métodos.

En este trabajo se llevó a cabo la modelización cinética del crecimiento, el ajuste realizado se puede observar en la *Figura 1A* de la Publicación 5. Como se ve el modelo cinético se ajusta con gran exactitud a los datos experimentales. Así mismo, se puede observar que el crecimiento es mayor a medida que se aumenta la velocidad de agitación, hasta 600 rpm, a partir de esta agitación una mayor velocidad de agitación no se traduce en un mayor crecimiento. A 1200 rpm el crecimiento de la biomasa es menor; este hecho también se puede ver claramente observando los valores de los parámetros cinéticos del crecimiento (*Figura 2* de la publicación). La velocidad de crecimiento aumenta hasta un valor de agitación de 600 rpm, se mantiene constante hasta 1000 rpm y decrece para velocidades de agitación de 1200 rpm. Por otro lado, como se observa en la *Figura 1B* de la publicación, a partir de 800 rpm, la viabilidad celular se ve comprometida; y, con una velocidad de agitación de 1200 rpm, la viabilidad celular decrece notablemente. Mediante la observación de las células en el microscopio electrónico, procedentes de los experimentos llevados a cabo con distintas condiciones fluido-dinámicas (resultados que se pueden ver en las *Figuras 3 y 4* del artículo), se observa que, a partir de 800 rpm, las células presentan cambios morfológicos. Se puede observar también que aparecen agregados celulares, algunas células dañadas o rotas, y también una elongación de las mismas. Todos estos efectos han sido reportados para otros procesos previamente en la literatura, y se engloban en el concepto de estrés hidrodinámico. Los resultados muestran que a para velocidades de agitación superiores a 800 rpm, las células presentan estrés hidrodinámico causado por las fuerzas de cizallamiento que se crean a causa del aumento de la agitación. Por otro lado, en los resultados de esta publicación, se puede observar la evolución de los metabolitos producidos durante el crecimiento por la bacteria en los experimentos llevados a cabo a distintas velocidades de agitación (*Figura 5* de la Publicación). Como se puede ver, existe una distribución de los metabolitos diferente en función de la agitación empleada. Para velocidades de transferencia de oxígeno (OTR) bajas (en las cuales la concentración de oxígeno disuelto llega pronto a cero y se mantiene en ese valor durante el resto del experimento), donde la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) es mayor o igual a la OTR, los productos mayoritarios son el ácido láctico y el etanol. En cambio, para agitaciones superiores, donde $OTR > OUR$, la concentración de

oxígeno disuelto no llega a cero, y por lo tanto no es limitante, y se aprecia que se favorece la producción de biomasa, ácido acético, CO₂ y algunos compuestos que se producen en condiciones aeróbicas. El isobutanol, producto objetivo en este bioproceso, presenta una producción máxima a 600 rpm en la etapa de crecimiento de las células. Esta distribución de metabolitos, que es diferente en función de los valores relativos de OTR y OUR obtenidos para cada agitación, es otra de las conclusiones extraídas en este estudio. En función de la agitación se producen cambios metabólicos que se reflejan en la distribución de los compuestos. Estos cambios probablemente se deben a la velocidad de consumo de oxígeno en cada uno de ellos.

Para evaluar las condiciones fluido-dinámicas óptimas para la obtención de biomasa con alta capacidad de producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*, se llevaron a cabo test de producción con células en estado de *resting cells* a dos tiempos distintos: para la primera mitad de la fase de crecimiento exponencial, y otro test en la segunda mitad de la fase de crecimiento exponencial. Estos test, aportan uno de los resultados más relevantes de toda la publicación, ya que las células cultivadas en distintas condiciones fluido-dinámicas, presentan una respuesta diferente en el citado test. Por lo tanto, las células crecidas en diferentes condiciones de OTR, mantienen sus cambios metabólicos cuando se usan en el test de producción en las mismas condiciones. Las células crecidas con OTR más bajos, donde $OUR \geq OTR$, producen mayor cantidad de ácido láctico y etanol en los test que el resto. Por el contrario, cuando $OUR < OTR$, los compuestos mayoritarios obtenidos son el ácido acético y el ácido succínico. El mayor rendimiento en isobutanol se obtiene con células producidas a 400 rpm. Hay que remarcar que, para agitaciones superiores a 1000 rpm, a las cuales el estrés hidrodinámico es evidente, la producción de todos los metabolitos con las células en estado de *resting cells* es menor. Por lo tanto, además de existir estrés hidrodinámico para altas agitaciones, comprometiendo la velocidad de crecimiento de la biomasa, la viabilidad celular y la integridad de las células, se observa que el aporte de oxígeno afecta al metabolismo de la bacteria provocando cambios metabólicos en función de la disponibilidad del mismo. Este estrés causado por el aporte excesivo de oxígeno se puede observar en la distribución de metabolitos en los ensayos de crecimiento y también en los test de producción en *resting cells*.

Estos resultados también se presentaron en una comunicación tipo póster en el Congreso Internacional 12th *European Symposium on Biochemical Engineering Sciences*,

celebrado en la ciudad de Lisboa entre el 9 y el 12 de septiembre de 2018. Título de la Comunicación: “*Isobutanol production in resting cell by Shimwellia blattae (p424IbPSO): influence of fluid-dynamic conditions over biocatalyst growth phase*”. Autores: Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa. Así mismo ha sido aceptada una comunicación tipo oral en el Congreso Internacional *The 5th European Congress of Applied Biotechnology*, que se celebrará en la ciudad de Florencia entre el 15 y el 19 de septiembre de 2019. Título de la Comunicación: “*Influence of fluid-dynamic conditions in STBR on S. blattae (p424IbPSO) cultures for isobutanol production*”. Autores: Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

4.3. Nuevas construcciones genéticas para la mejora de la producción de isobutanol

Los últimos estudios que componen esta Tesis Doctoral tratan de la mejora de la producción de isobutanol mediante la propuesta de nuevas construcciones genéticas. Este trabajo se ha llevado a cabo en los laboratorios del grupo de investigación del Prof. José Luis García López del CIB-CSIC.

Como se ha visto anteriormente, la producción de isobutanol con *S. blattae* (p424IbPSO) no se puede llevar a cabo en condiciones aeróbicas debido a que se forman una serie de compuestos no deseados (como se recoge en la Publicación 2), uno de ellos mediante una reacción química de oxidación (sin la intervención de ninguna enzima), lo que no será posible de cambiar mediante modificación genética de la cepa. Por lo tanto, la producción de isobutanol con esta cepa modificada debe llevarse a cabo en condiciones limitantes de oxígeno o anaeróbicas (Publicaciones 1, 2 y 3), en las que uno de los principales factores identificados que determina la producción de isobutanol, es el agotamiento de los cofactores reducidos (NADPH). Mientras haya oxígeno disuelto en el caldo, se podrán sintetizar cofactores reducidos (NADH y NADPH) pero, una vez que el oxígeno se agota, el NADH se puede sintetizar en condiciones anaeróbicas [85]. Sin embargo, el NADPH no se recicla en condiciones anaeróbicas [85], y se consume en dos de las reacciones de la ruta insertada en *S. blattae* (p424IbPSO); las catalizadas por las enzimas: IlvC y Adh endógena de *S. blattae*. Los niveles de la ruta metabólica donde se emplean estos cofactores reducidos se pueden ver en el esquema de la ruta metabólica insertada en *S. blattae* (p424IbPSO) presentado en la *Figura 4.1*. Todo lo indicado provocará que, en condiciones de ausencia de oxígeno, este cofactor se agote. Debido a

estas limitaciones, en este trabajo, se han propuesto y abordado dos construcciones genéticas nuevas para, por un lado, intentar disminuir la dependencia de NADPH; y, por otro, intentar aumentar la disponibilidad de NADPH. Los nuevos genes se han introducido en *S. blattae* (p424IbPSO) en un nuevo plásmido compatible con el ya existente. Por otra parte, se ha construido una cepa control para determinar la posible influencia de la inserción de un nuevo plásmido en la célula, independientemente de la información que se puede introducir en el mismo. Las construcciones genéticas llevadas a cabo son las siguientes:

- Construcción 1 (Cepa *S. blattae* p424IbPSO-adhA). Inserción del gen *adhA* de *Lactococcus lactis* II1403. Esta enzima emplea NADH para transformar el isobutiraldehído en isobutanol, en lugar de emplear NADPH. Con esta construcción se pretende reducir la cantidad de NADPH consumido y aumentar así la disponibilidad de este cofactor para la enzima IlvC.

- Construcción 2 (Cepa *S. blattae* p424IbPSO-pntAB). Inserción del gen *pntAB* de *Escherichia coli* MG1655. Este gen codifica para una transhidrogenasa, cuya función es balancear la concentración de los dos cofactores reducidos NADH/NADPH. Esta enzima transforma el NADH en NADPH y el NADPH en NADH, para mantener la misma concentración de ambos, en función de la concentración relativa que haya de cada uno de ellos. La inserción de este gen ya ha sido estudiada anteriormente por otros autores en otras especies de bacterias obteniendo buenos resultados [85, 142].

- Cepa control 1 (Cepa *S. blattae* p424IbPSO-pIZ). Se lleva a cabo la transformación de *S. blattae* p424IbPSO con el plásmido pIZ (en el que se han insertado los genes correspondientes a las construcciones 1 y 2) en este caso sin ningún gen, para comprobar si existe algún tipo de estrés causado por la presencia del plásmido adicional.

Las construcciones genéticas se realizaron en el periodo comprendido entre los meses de octubre y diciembre de 2018 en los laboratorios del Prof. José Luis García López y bajo

la supervisión del mismo y de la Dra. Beatriz Galán Sicilia. El procedimiento experimental que se llevó a cabo para la extracción de genes, vectores y transformación bacteriana se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos de esta Memoria. Las cepas modificadas genéticamente que se construyeron se describen en la *Tabla 4.1*. Posteriormente, las nuevas cepas se probaron en biorreactores de 1 L en los laboratorios del grupo FQPIMA de la UCM, estos experimentos se llevaron a cabo en las condiciones óptimas de producción para la cepa empleada en los estudios anteriores (Publicaciones 1 y 3).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con las nuevas cepas construidas. En la *Figura 4.2* se puede ver la evolución de la biomasa, glucosa, isobutanol, así como de los principales subproductos, tales como etanol, ácido láctico y ácido acético, de cada una de las citadas cepas, realizando una comparación con los resultados obtenidos con la cepa original de esta Tesis Doctoral, *S. blattae* p424IbPSO. Como puede apreciarse, tanto el crecimiento de la biomasa como el consumo de glucosa es prácticamente igual para las 4 cepas estudiadas. Aunque la cepa control presenta un crecimiento ligeramente inferior. Cabe destacar que, sin embargo, la producción de isobutanol no es igual para las cuatro cepas: la cepa que mayor cantidad de isobutanol produce es la citada cepa original.

Tabla 4.1. Genotipo cepas modificadas genéticamente de *S. blattae* para la mejora de la producción de isobutanol. (*Sm^R*: resistencia a estreptomicina. *Gm^R*: resistencia a gentamicina).

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>S. blattae</i> p424IbPSO	<i>Sm^R</i> , operón IbPSO en pSEVA424	[95]
<i>S. blattae</i> p424IbPSO-pIZ	El mismo que <i>S. blattae</i> p424IbPSO + <i>Gm^R</i> , pIZ	Este trabajo
<i>S. blattae</i> p424IbPSO-pIZadhA	El mismo que <i>S. blattae</i> p424IbPSO + <i>Gm^R</i> , <i>adhA</i> en pIZ	Este trabajo
<i>S. blattae</i> p424IbPSO-pIZpntAB	El mismo que <i>S. blattae</i> p424IbPSO + <i>Gm^R</i> , <i>pntAB</i> en pIZ	Este trabajo

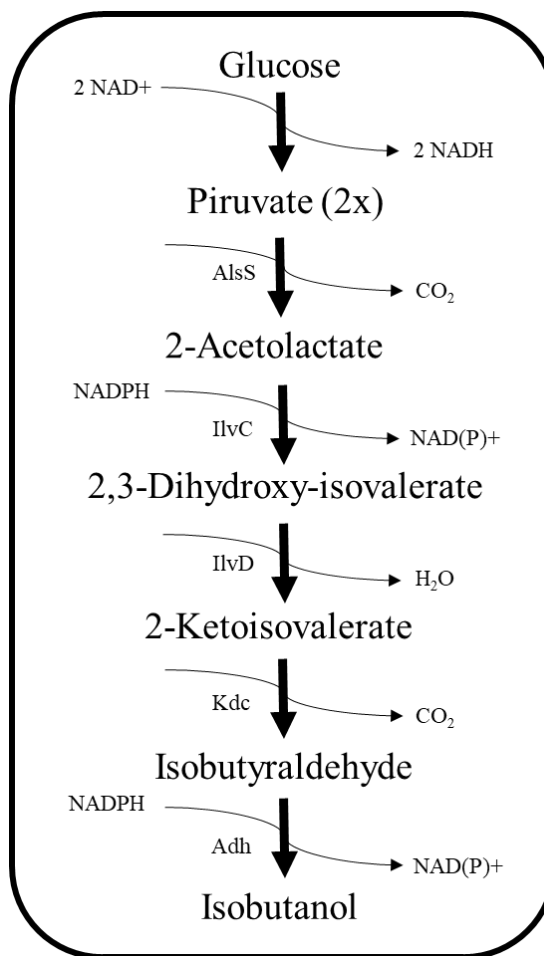


Figura 4.1. Esquema de la ruta metabólica insertada en *S. blattae* (p424IbPSO). Esquema de la ruta metabólica adaptado de [95].

Como se puede ver en la *Figura 4.2C*, la producción de isobutanol es menor para las cepas que contienen dos plásmidos (nuevas construcciones). Una posible hipótesis es que la disminución en la producción de isobutanol pueda deberse al estrés producido por la inserción de un nuevo plásmido. Sin embargo, al comparar las dos cepas nuevas con la cepa control (*S. blattae* p424IbPSO-pIZ), se puede ver que ésta última es la peor productora del alcohol, la producción mejora con la inserción del gen *adhA* y, que la citada producción mejora aún más con la inserción del gen *pntAB*. Es decir, que las actuaciones realizadas para influir sobre el consumo de NADPH o la compensación de las concentraciones de NADH/NADPH muestran que es más efectiva esta última [77, 85, 118, 142]. Es por ello que se puede afirmar que uno de los “cuellos de botella” en la producción de isobutanol es la transformación de 2-acetolactato en 2,3-dihidroxi-iso-valerato, debido al consumo de NADPH, como ya indicaban previamente algunos autores [142, 143].

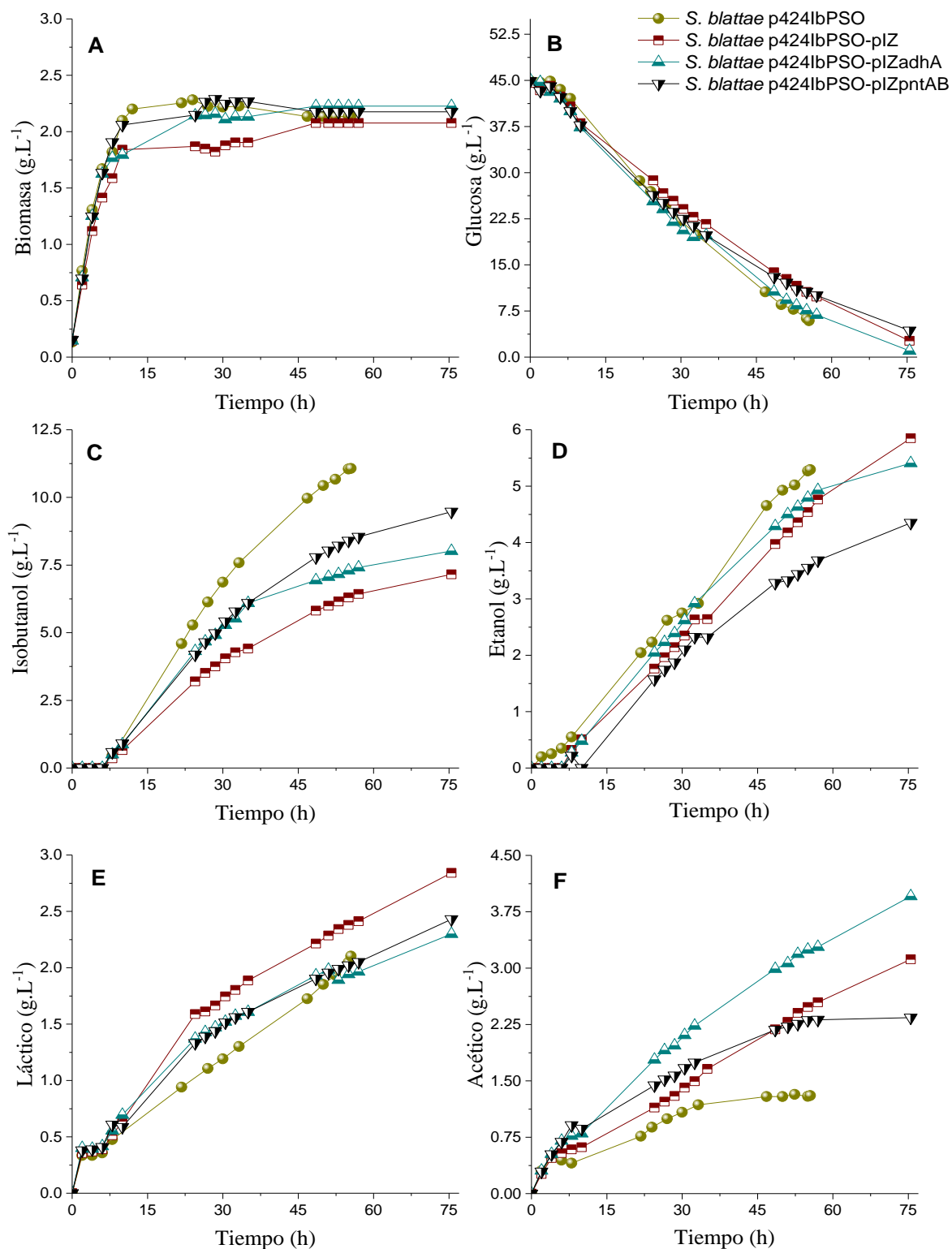


Figura 4.2. Evolución de biomasa (A), glucosa (B), isobutanol (C), etanol (D), ácido láctico (E) y ácido acético (F), para las fermentaciones llevadas a cabo en STBR con la cepa original de esta Tesis Doctoral (*S. blattae* p424IbPSO) y las nuevas cepas construidas (*S. blattae* p424IbPSO-pIZ, *S. blattae* p424IbPSO-pIZadhA y *S. blattae* p424IbPSO-pIZpntAB).

En la *Figura 4.2* también se presentan los resultados experimentales obtenidos para la producción de los diferentes metabolitos considerados como subproductos. En primer lugar, se puede apreciar la producción de etanol (*Figura 4.2D*) no presenta grandes diferencias entre todas las cepas estudiadas, a excepción de la cepa con el gen *pntAB*, en la que hay una clara disminución en su producción. Esto podría deberse a que la concentración de NADPH en esta cepa sea mayor debido la actuación de las enzimas del complejo PntAB, que transforman el NADH en NADPH, para el mantenimiento del equilibrio entre ambos cofactores [77, 85]. Bajo las condiciones a las que se han llevado a cabo las fermentaciones, la evolución de la concentración de NADPH se prevé que sea a disminuir, por lo que las enzimas PntAB transformarán el NADH en NADPH. Un aumento en la cantidad de NADPH disponible puede aumentar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa, desviando así la producción a isobutanol, y reduciendo la producción de etanol.

Los resultados relativos al ácido láctico (*Figura 4.2E*) muestran que, para todas las cepas su producción es inferior la obtenida que para cepa control (*S. blattae* p424IbPSO-pIZ), siendo la cepa original del presente trabajo la que menor cantidad produce.

Por último, los resultados de la producción de ácido acético (*Figura 4.2F*) muestran que su concentración es mayor en la cepa con el gen *adhA* (*S. blattae* p424IbPSO-pIZadhA) que para el resto de cepas construidas; siendo destacable que la cepa original es la que menor cantidad de sustrato desvía a la producción de este metabolito.

En la *Figura 4.3*, se puede observar el valor del rendimiento obtenido de cada uno de los metabolitos producidos respecto de la glucosa consumida. Como de nuevo puede observarse, la cepa que presenta mayor rendimiento en isobutanol es la cepa original empleada en este trabajo (*S. blattae* p424IbPSO), seguramente debido a que solo contiene un plásmido, como se ha comentado anteriormente.

Sin embargo, la producción de isobutanol con la cepa *S. blattae* p424IbPSO-pIZpntAB presenta una notable mejora respecto de la cepa con el plásmido adicional sin genes, *S. blattae* p424IbPSO-pIZ, pero el estrés introducido por el plásmido adicional provoca que la producción de isobutanol sea menor que la cepa original (*S. blattae* p424IbPSO). Además, en la *Figura 4.3*, se puede ver que la selectividad hacia isobutanol en la cepa *S. blattae* p424IbPSO-pIZpntAB es mayor, reduciendo el rendimiento en el resto de metabolitos.

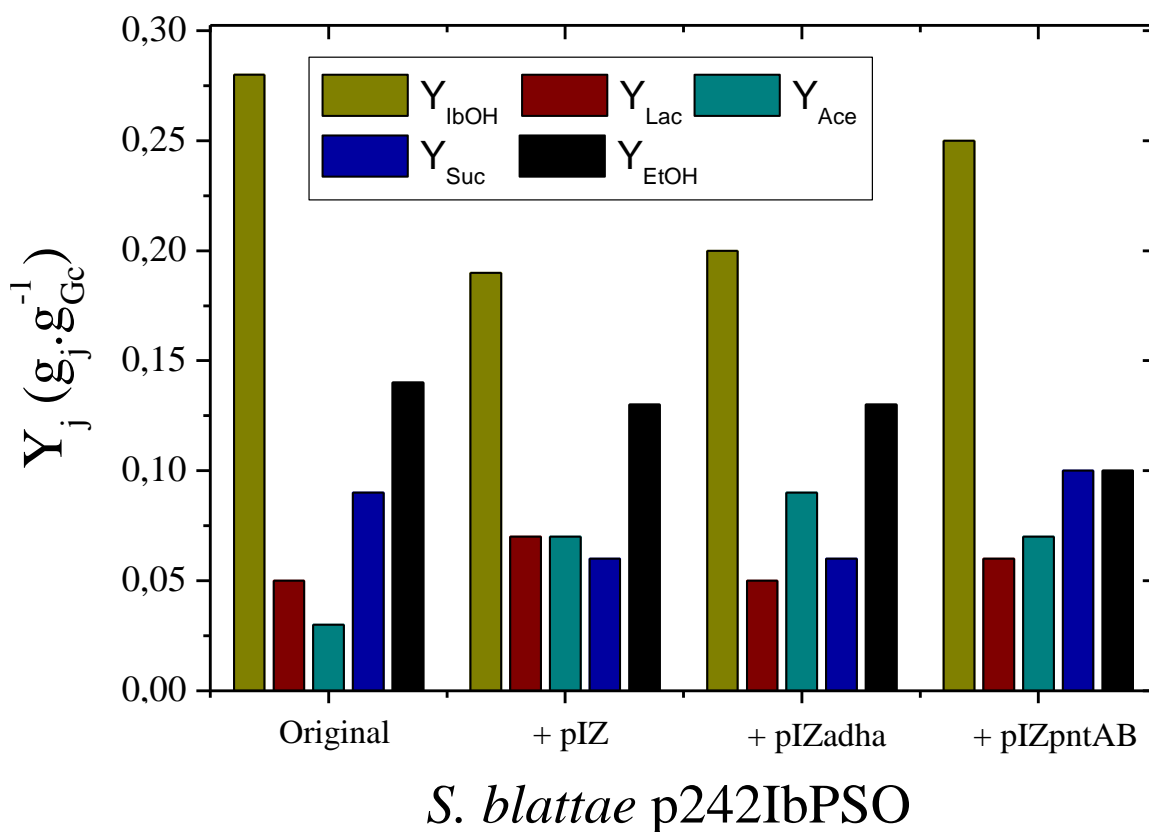
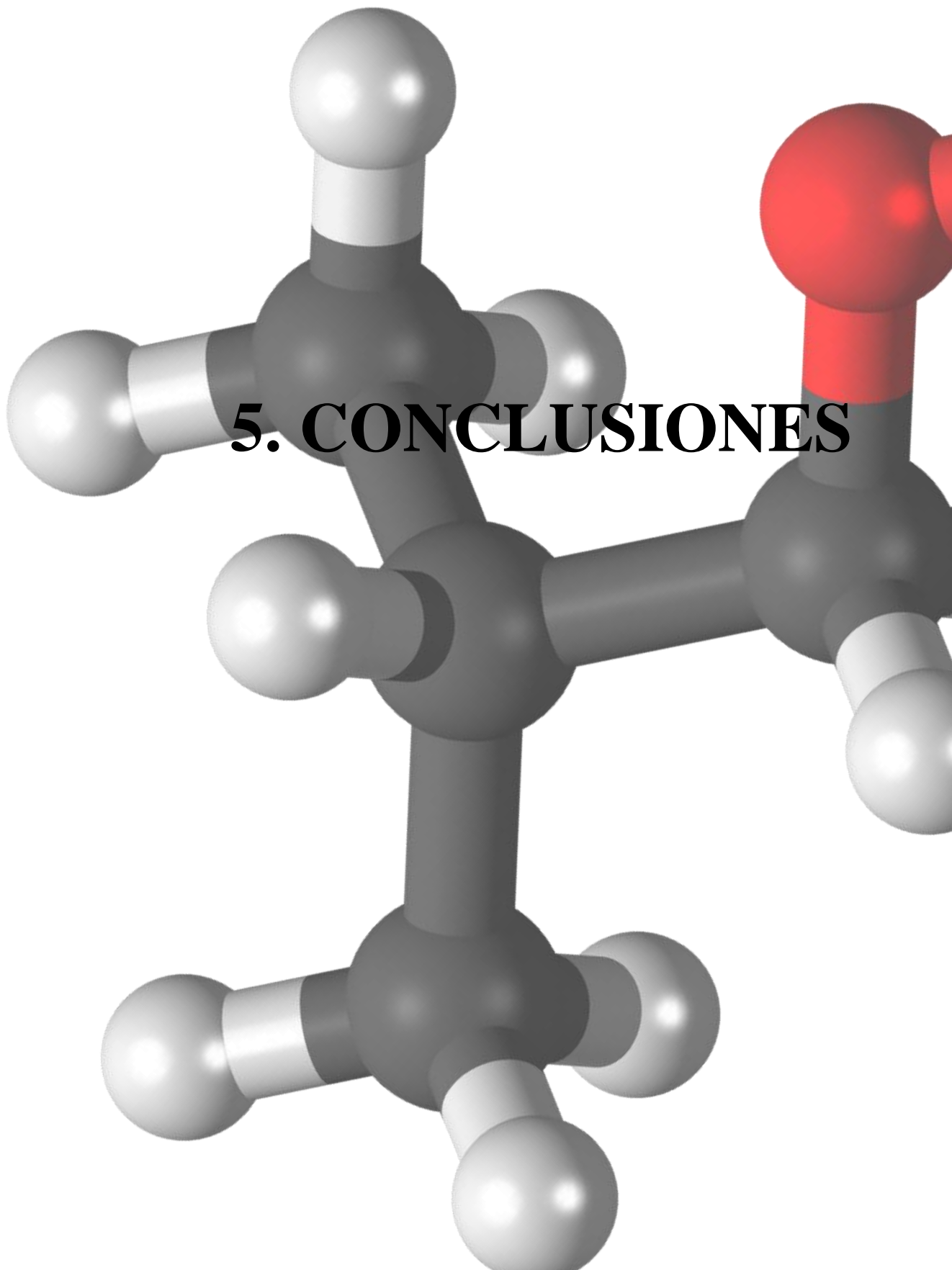


Figura 4.3. Rendimiento (Y_j) para cada metabolito producido por cada una de las cepas estudiadas en este trabajo.

A la vista de los resultados que han sido obtenidos se puede decir que la adición de un segundo plásmido a la cepa *S. blattae* (p424IbPSO) tiene un efecto negativo sobre la producción de isobutanol, aunque la inserción de ciertos genes mejore su síntesis respecto a la cepa control. Este efecto negativo puede deberse al estrés introducido por la presencia de un plásmido adicional, por ello, algunos autores recomiendan realizar construcciones genéticas que presenten mayor estabilidad y que no afecten a las células [144-146]. En la actualidad se está acometiendo este aspecto mediante la construcción de cepas en las que se insertan los genes *pntAB* (que son los que en este trabajo han mostrado ser más efectivo para abordar el problema del agotamiento del NADPH) en el cromosoma de la bacteria. Debido a los plazos de entrega de esta Memoria para poder llevar a cabo su defensa en tiempo y forma, no es posible incluir los resultados de las nuevas cepas (con la información insertada en el cromosoma) en el presente documento.



5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En esta sección se recogen las principales conclusiones que han sido extraídas de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Se resumen por temas, ya que estas conclusiones están en cada una de las publicaciones científicas que forman la Tesis Doctoral y que se muestran en el Anexo I de la presente Memoria.

5.1. Producción de isobutanol con células en crecimiento

Sobre la composición del medio de cultivo y condiciones de operación

- a. El empleo del medio M92x mejora los rendimientos en isobutanol frente al empleo del medio M9. Este medio M92x contiene mayor concentración de sales fosfato, generando un tampón en el medio de cultivo que amortigua la caída de pH, favoreciendo la producción de isobutanol.
- b. La concentración de extracto de levadura puede ser disminuida hasta $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, de esta manera se reducen los costes del medio de cultivo de un posible proceso a mayor escala.
- c. Se ha definido una estrategia óptima de pH para dicha producción, comenzando en un valor de pH de 6,8, que evoluciona libre y se controla en un valor de 6,0.
- d. Se ha determinado que la concentración inicial óptima de glucosa es 45 g.L^{-1} . Concentraciones iniciales superiores a 50 g.L^{-1} provocan la inhibición de la producción de isobutanol.
- e. El crecimiento de la biomasa no se ve influenciado por la concentración inicial de glucosa, al menos, en las concentraciones estudiadas en este trabajo.
- f. Bajo las condiciones óptimas de operación, con *S. blattae* (p424IbPSO) como biocatalizador, se obtienen 11 g.L^{-1} de isobutanol, lo que supone un rendimiento de $0,29 \text{ g}_{\text{Ib}}.\text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$, un 71 % sobre el rendimiento máximo teórico.

Modelo cinético del proceso

- a. Con las condiciones óptimas establecidas se ha propuesto un modelo cinético capaz de reproducir la evolución de glucosa, biomasa, isobutanol, etanol y otros subproductos, en cinco experimentos realizados con diferentes concentraciones iniciales de glucosa ($30 - 70 \text{ g.L}^{-1}$ de glucosa).

- b. El modelo cinético propuesto está definido por las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$R_X = \frac{dC_X}{dt} = r_1 + r_3 = \mu_1 \cdot C_{O_2} \cdot C_X + \mu_2 \cdot \exp(-k_d \cdot t)$$

$$R_{Ib} = \frac{dC_{Ib}}{dt} = r_4 = k_4 \cdot C_G \cdot C_X$$

$$R_{Et} = \frac{dC_{Et}}{dt} = r_5 = k_5 \cdot C_G \cdot C_X$$

$$R_{Ac} = \frac{dC_{Ac}}{dt} = r_6 = k_6 \cdot C_G \cdot C_X$$

$$R_G = \frac{dC_G}{dt} = -v_{G/X} \cdot r_1 - v_{G/Ib} \cdot r_4 - v_{G/Et} \cdot r_5 - v_{G/Ac} \cdot r_6$$

- c. Este nuevo modelo cinético propuesto se ajusta con gran exactitud a los datos experimentales, además, cumple con los criterios estadísticos establecidos para su evaluación. Los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos calculados se pueden observar en la Publicación 3 del Anexo de esta Memoria.

Influencia del oxígeno en la producción de isobutanol

- a. La concentración y disponibilidad de oxígeno determina la distribución de metabolitos producidos por *S. blattae* (p424IbPSO). Con concentraciones bajas de oxígeno, se favorece la síntesis de ácido láctico y etanol. Por el contrario, con una mayor disponibilidad de oxígeno se ve favorecida la síntesis de biomasa, isobutanol y ácido acético.
- b. Con una cámara de aire del 91,7 % del volumen en el interior de la botella cerrada se obtiene un 56,3 % sobre el rendimiento máximo teórico, mientras que con la cámara de aire más pequeña empleada, 16,0 % aire, se obtiene solo un 18,8 % sobre dicho rendimiento máximo teórico.
- c. El flujo de carbono cambia drásticamente en función de la cantidad de oxígeno disponible. En condiciones aeróbicas, en STBR, la producción de isobutanol es baja. En dichas condiciones se han identificado tres compuestos no descritos anteriormente en la literatura para este proceso: 2,3-butanodiona, por oxidación química del 2-acetolactato; la cual en presencia de hidróxido de sodio se dimeriza por una reacción de tautomería cetona-enólica y forma 3-oxo-1-buten-2-il éter; acetyl fosfato, compuesto intermedio en la ruta de síntesis del ácido acético; y,

por último, ácido isobutírico, sintetizado gracias a la enzima endógena de la bacteria FeaB. Toda esta información se puede ver sintetizada en el esquema del metabolismo propuesto, en función de la disponibilidad de oxígeno, en la Publicación 2 del Anexo I de esta Memoria.

- d. La producción de isobutanol en condiciones anaeróbicas se ve limitada por el desbalance entre cofactores oxidados y reducidos. El NADPH no se recicla en condiciones anaeróbicas y, puesto que es necesario para enzimas de la ruta metabólica introducida en esta bacteria para la producción de isobutanol, la ruta se inhibe y se detiene la producción de isobutanol. Por ello, la producción de isobutanol con *S. blattae* (p424IbPSO) mejora cuando se mantienen condiciones aeróbicas durante el crecimiento de la biomasa y posteriormente se utilizan condiciones anaeróbicas.

5.2. Producción de isobutanol con células en estado de *resting cells*

Producción de biomasa: medio de cultivo y condiciones de operación

- a. Se ha demostrado la capacidad de *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) para producir isobutanol en estado de *resting cells*, alcanzando valores de rendimiento sobre el máximo teórico en *resting cells* cercanos al 60 %.
- b. El medio de cultivo y las condiciones de operación óptimas para la obtención de biomasa con la máxima capacidad de producción de isobutanol han sido definidas mediante el empleo de un diseño experimental tipo Taguchi. El medio de cultivo óptimo para la producción de biomasa es el medio M92x suplementado con 1,5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 1,4 g.L⁻¹ de amonio, 0,5 mM de IPTG y una temperatura para el crecimiento de 30 °C.
- c. Se ha determinado que la edad de las células cuando se emplean en estado de *resting cells* influye en la producción de isobutanol. Las células presentan mayor actividad en *resting cells* si se recolectan en la primera mitad de la fase exponencial de crecimiento.
- d. La exposición prolongada a altas concentraciones de IPTG y temperaturas mayores de 30 °C, inducen la formación de cuerpos de inclusión. Dichos cuerpos, que son formados por proteínas insolubles agregadas, inhiben la producción de isobutanol durante la etapa de producción con células en estado de *resting cells*.

Efecto de las condiciones fluido-dinámicas en el crecimiento de la biomasa

- a. El crecimiento de *S. blattae* (p424IbPSO) se ve favorecido al aumentar la velocidad de agitación, desde 100 rpm hasta 600 rpm. Desde 600 rpm hasta 1000 rpm, la velocidad de crecimiento se mantiene en el mismo valor. Para velocidades de agitación superiores a 1000 rpm, la velocidad de crecimiento disminuye.
- b. La viabilidad celular se ve comprometida en los experimentos llevados a cabo a más de 800 rpm. Para los experimentos realizados a 800 rpm y a 1000 rpm, las células se ven afectadas a partir de la hora 15 de crecimiento. Para el experimento llevado a cabo a 1200 rpm, la viabilidad se ve comprometida durante toda su duración.
- c. Se han observado por microscopía electrónica de transmisión (TEM) cambios morfológicos en las células para agitaciones superiores a 800 rpm. También se observa la formación de agregados celulares y una cierta elongación celular. Para una agitación de 1200 rpm, se aprecia que las células están claramente dañadas.
- d. Se ha determinado que para velocidades cizalla superiores a 1300 s^{-1} , que se dan a partir de 800 rpm, se observan signos evidentes de estrés hidrodinámico.
- e. La velocidad de transporte de oxígeno (OTR) y la de consumo de oxígeno (OUR), determinan la disponibilidad de oxígeno en el caldo de cultivo. La distribución de metabolitos durante el crecimiento se ve afectada por los cambios de OTR-OUR y, por lo tanto, por los cambios en las condiciones fluido-dinámicas. La velocidad máxima de consumo de oxígeno aumenta al aumentar la velocidad de agitación hasta 600 rpm, donde este valor es máximo, mientras que, para velocidades de agitación superiores, este valor disminuye. Del mismo modo, el rendimiento en isobutanol aumenta en los experimentos realizados hasta una velocidad de agitación de 600 rpm y, para velocidades de agitación superiores, el rendimiento en isobutanol disminuye. Un aumento en la velocidad de agitación y, por ende, un aumento de OTR, favorece la producción de biomasa, la producción de ácido acético, CO_2 y compuestos con alto grado de oxidación, como el ácido isobutírico y el dímero de 2,3-butanodiona. Por otro lado, para valores de OTR más bajos, se favorece la síntesis de ácido láctico, ácido succínico y etanol. Por lo tanto, las diferentes condiciones de OTR-OUR provocan cambios en la ruta metabólica que sigue el cultivo.

- f. Las células empleadas para la producción de isobutanol en *resting cells*, cuando son cultivadas bajo diferentes condiciones fluidodinámicas durante su crecimiento, presentan un comportamiento diferente cuando se usan en *resting cells*. Las células, aunque son utilizadas ahora en las mismas condiciones, tienen memoria de cómo han sido cultivadas, produciendo una distribución diferente de metabolitos, similar a la distribución observada durante el crecimiento. Por lo tanto, las condiciones fluido-dinámicas durante el crecimiento determinan la distribución de metabolitos durante la operación en *resting cells*. De esta forma, la producción de ácido láctico y etanol en *resting cells*, es mayor para las células producidas con velocidades de agitación bajas, mientras que la producción de isobutanol o ácido acético es mayor para las células obtenidas con mayores velocidades de agitación durante su crecimiento.
- g. El mayor rendimiento en isobutanol en la etapa de *resting cells* se obtiene cuando las células son recolectadas en la primera mitad de la fase de crecimiento exponencial y son cultivadas con una velocidad de agitación de 400 rpm.
- h. Para velocidades de agitación superiores a 1000 rpm, se observa un comportamiento anómalo en la fase de producción con células en estado de *resting cells*, la producción de todos los metabolitos se ve afectada negativamente. Esto se debe al estrés introducido por las condiciones fluido-dinámicas, y la concentración de oxígeno disponible, a la cual están expuestas las células durante el crecimiento.

5.3. Nuevas cepas modificadas genéticamente para producción de isobutanol

- a. Una vez conocidas las limitaciones de la ruta metabólica de *S. blattae* (p424IbPSO), se procedió a la construcción de las nuevas cepas capaces de producir isobutanol a partir de glucosa, en las que se redujo la dependencia del cofactor reducido NADPH o bien se favoreció su síntesis. Las cepas construidas con actividad para sintetizar isobutanol son las siguientes:
 - *S. blattae* p424IbPSO-pIZadhA: en un nuevo plásmido (pIZ), compatible con el plásmido original de *S. blattae* (p424IbPSO), se ha insertado el gen *adhA*; este gen codifica para una enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH.

- *S. blattae* p424IbPSO-pIZpntAB: en el nuevo plásmido (pIZ) se han insertado los genes *pntAB*, que codifican para una enzima transhidrogenasa que regula el equilibrio entre el NADH y el NADPH.
- b. La producción de isobutanol se ve afectada negativamente por la presencia de un plásmido adicional, pIZ. Bajo esta premisa, se puede confirmar que la inserción del gen *adhA*, que elimina la necesidad de emplear NADPH en el último paso de la ruta metabólica, hace que la producción de isobutanol mejore. Pero esta producción se ve notablemente mejorada cuando se introduce el gen *pntAB* en el plásmido adicional (pIZ), la enzima PntAB aumenta la cantidad de NADPH disponible en condiciones anaeróbicas.

5.4. Conclusiones más relevantes de este trabajo

Importancia del oxígeno en la bioproducción de isobutanol

- a. Se ha puesto de manifiesto la importancia del efecto del oxígeno sobre la producción de isobutanol. Por un lado, la producción en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas conlleva un consumo de cofactores reducidos (NADPH), que en estas condiciones no se regeneran, y cuando se agotan, la síntesis de isobutanol se detiene. Por otro lado, bajo condiciones aeróbicas, la producción de isobutanol disminuye debido a la síntesis de otros compuestos, se activan otras rutas metabólicas, teniendo lugar reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Por ello, en el proceso de producción de isobutanol, así como, en otros procesos aeróbicos, el oxígeno es un elemento esencial y juega un papel importante en la distribución de los diferentes metabolitos producidos por las bacterias. Además, la disponibilidad de oxígeno determina la concentración de cofactores oxidados/reducidos, que son necesarios para que las enzimas dependientes de ellos estén activas.

Importancia de las condiciones fluido-dinámicas

- a. Se ha determinado la influencia que tienen las condiciones fluido-dinámicas sobre la evolución del sistema estudiado; en STBR, el empleo de diferente agitación puede provocar la aparición de estrés hidrodinámico y también estrés causado por una concentración excesiva de oxígeno en el caldo de cultivo. Estas

condiciones afectan notablemente al crecimiento bacteriano, a la viabilidad e integridad de las células y a la distribución de los metabolitos producidos por el cultivo de las células.

Producción de isobutanol con células en estado de resting cells

- a. Se ha demostrado que es posible llevar a cabo la producción de isobutanol a partir de glucosa trabajando con células en estado de *resting cells*. Esta forma de operar, una vez optimizada, puede suponer una disminución importante en los costes del posible proceso a mayor escala.
- b. Es de destacar que las condiciones fluido-dinámicas, la combinación de OTR-OUR, empleadas en el crecimiento no solo influye en la conducta de las células cuando son cultivadas en crecimiento, sino que también influyen en el comportamiento de dichas células cuando son empleadas en *resting cells*, obteniéndose una distribución de productos, y por tanto de rutas metabólicas, similar a la obtenida en crecimiento, aunque en el cultivo en *resting cells* no cambian dichas condiciones fluido-dinámicas, ni la relación OTR-OUR.

5.5. Recomendaciones

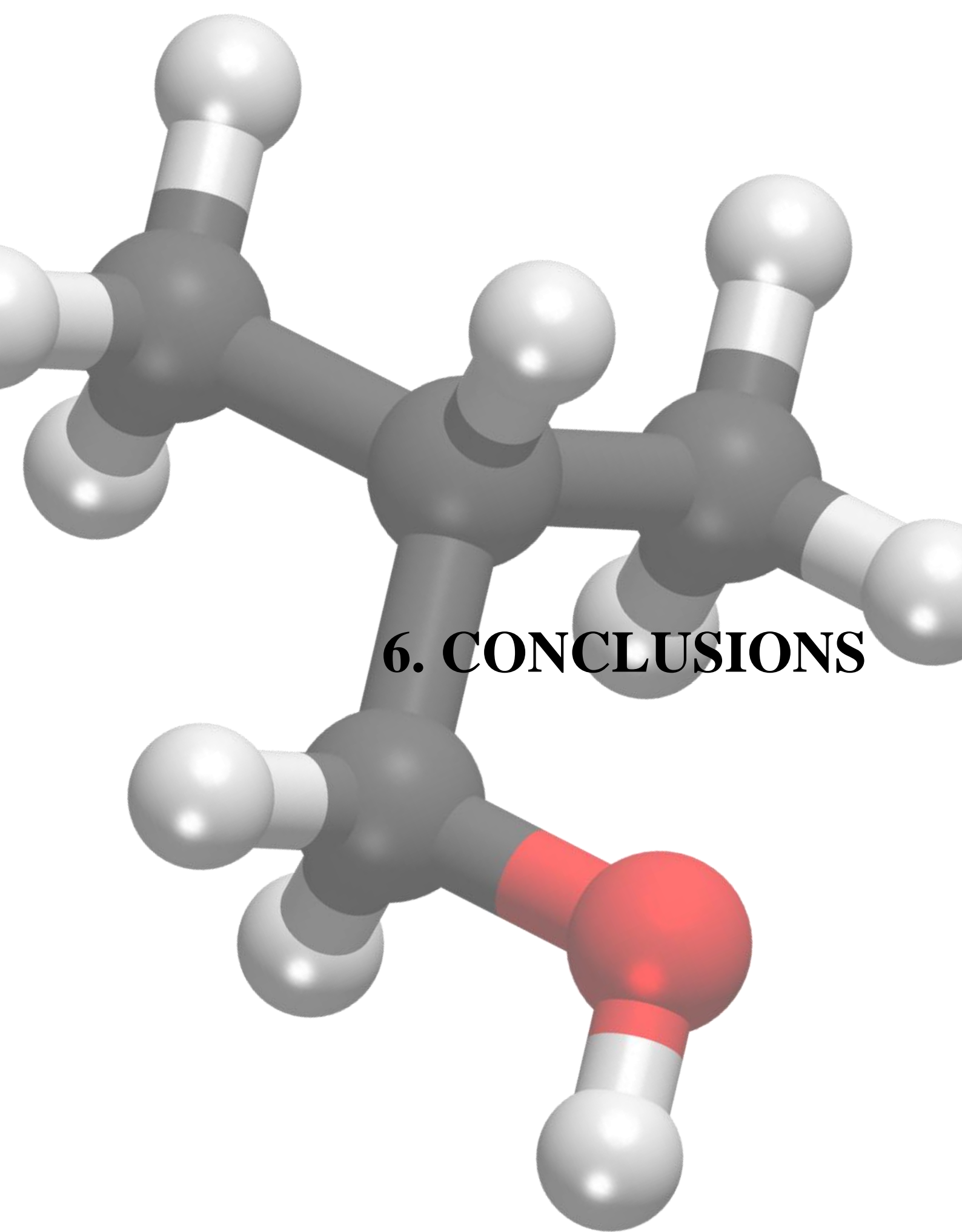
En cuanto a la producción de isobutanol con células en estado de resting cells

En un futuro se pretende continuar con los trabajos de optimización de la etapa de producción de isobutanol en estado de *resting cells*. En primer lugar, se debe determinar una estrategia de pH y comprobar si la adición de determinados compuestos pueden mejorar la producción en esta forma de operación.

En cuanto construcción de nuevas cepas genéticamente modificadas

Debido a que se ha observado una disminución en la producción de isobutanol al introducir un plásmido adicional en la cepa, en primer lugar, se debería llevar a cabo la “curación” de dicha cepa. Se trata de la eliminación del plásmido pIZ y de esta forma obtener una cepa “curada”, resultando una cepa similar a la originalmente empleada en esta Tesis Doctoral. De esta forma, se podría comprobar si realmente la adición del plásmido genera algún tipo de estrés, o si, por el contrario, la disminución en la producción de isobutanol se debe a algún cambio que haya sufrido la cepa antes de haberse llevado a cabo

las modificaciones. Así mismo, se está estudiando la posibilidad de introducir los genes *pntAB* en el cromosoma bacteriano, eliminando así el estrés que genere la presencia de un nuevo plásmido. Por otro lado, para obtener una producción mayor de isobutanol, se podría llevar a cabo la delección de los genes que codifican para las enzimas que compiten con la acetolactato sintasa por el piruvato.



6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

This section contains the main conclusions drawn from the results obtained in this Doctoral Thesis. These conclusions are summarised by subject, as they are included in each of the scientific papers forming this Doctoral Thesis which can be seen in the Annex I.

6.1. Isobutanol production using growing cells

About the composition of the culture medium and operating conditions

- a. The use of the medium M92x improves isobutanol yield compared to the use of the medium M9. The M92x medium contains a higher concentration of phosphate; these salts are a “natural buffer” in the culture medium that buffers the drop in pH, favouring the production of isobutanol.
- b. The concentration of yeast extract can be reduced to 1.5 g.L^{-1} , reducing the costs of the culture medium of a possible larger scale process.
- c. An optimal pH strategy has been defined, starting at a pH value of 6.8, then evolving freely and being controlled at a value of 6.0.
- d. It has been determined that the optimal initial glucose concentration is 45 g.L^{-1} . Initial concentrations higher than 50 g.L^{-1} cause inhibition of the isobutanol production.
- e. Biomass growth is not affected by the initial glucose concentration, at least in the concentrations studied in this work.
- f. Under optimal operating conditions, using *S. blattae* (p424IbPSO) as biocatalyst, 11 g.L^{-1} of isobutanol are obtained, which means a yield value of $0.29 \text{ g}_{\text{Ib}}.\text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$, 71 % of the theoretical maximum yield.

Kinetic model of the process

- a. A kinetic model able to reproduce the evolution of glucose, biomass, isobutanol, ethanol and other by-products has been proposed. Experimental data from five experiments carried out with different initial glucose concentrations ($30\text{-}70 \text{ g.L}^{-1}$ of initial glucose) are well described by the model.
- b. The proposed kinetic model is defined by the following differential equations:

$$R_X = \frac{dC_X}{dt} = r_1 + r_3 = \mu_1 \cdot C_{O_2} \cdot C_X + \mu_2 \cdot \exp(-k_d \cdot t)$$

$$R_{Ib} = \frac{dC_{Ib}}{dt} = r_4 = k_4 \cdot C_G \cdot C_X$$

$$R_{Et} = \frac{dC_{Et}}{dt} = r_5 = k_5 \cdot C_G \cdot C_X$$

$$R_{Ac} = \frac{dC_{Ac}}{dt} = r_6 = k_6 \cdot C_G \cdot C_X$$

$$R_G = \frac{dC_G}{dt} = -v_{G/X} \cdot r_1 - v_{G/Ib} \cdot r_4 - v_{G/Et} \cdot r_5 - v_{G/Ac} \cdot r_6$$

- c. This new kinetic model fits very closely to the experimental data and fulfils the usually established statistical. The values of the calculated kinetic and statistical parameters can be found in the paper 3 of the Annex I.

Oxygen influence on the isobutanol production

- a. The concentration and the availability of the oxygen determines the distribution of metabolites produced by *S. blattae* (p424IbPSO). With low oxygen concentrations, the synthesis of lactic acid and ethanol is enhanced. In contrast, higher oxygen availability favours the synthesis of biomass, isobutanol and acetic acid.
- b. With an air chamber of 91.7 % of the volume inside of the closed bottle, 56.3 % of theoretical maximum yield was reached. With the smallest air chamber used (16.0 %) only 18.8 % of the theoretical maximum yield was achieved.
- c. The carbon flux changes drastically depending on the amount of oxygen available. In STBR, under aerobic conditions, isobutanol production is low. Under these conditions three compounds not previously described in the literature for this process have been identified: 2,3-butanedione, by chemical oxidation of 2-acetolactate, which in the presence of sodium hydroxide is dimerized by a reaction of keto-enolic tautomerism to 3-oxo-1-buten-2-yl ether form; acetyl phosphate, an intermediate compound in the metabolic pathway of acetic acid; and finally, isobutyric acid, synthesized through to the endogenous enzyme of the bacterium FeaB. This information can be seen synthesized in the proposed metabolism scheme, depending on oxygen availability, in the paper 2 of Annex.

- d. The production of isobutanol under anaerobic conditions is limited by the “cofactor imbalance” between oxidized/reduced forms. NADPH is not recycled under anaerobic conditions, but it is necessary for enzymes of the metabolic pathway introduced into this bacterium for isobutanol production; thus, the pathway is inhibited and isobutanol production is stopped. Therefore, isobutanol production by *S. blattae* (p424IbPSO) improves when aerobic conditions are maintained during biomass growth and then deprivation oxygen conditions are employed.

6.2. Isobutanol production using resting cells

Biomass production stage: culture medium and operating conditions

- a. The capacity of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) to produce isobutanol in resting cells state has been demonstrated, reaching values of 60 % of the theoretical maximum yield.
- b. Both, optimal culture medium and optimal operating conditions for obtaining biomass with maximum isobutanol production capacity have been defined using a Taguchi experimental design. The optimal culture medium for biomass production is the M92x medium supplemented with 1.5 g.L⁻¹ of yeast extract, 1.4 g.L⁻¹ of ammonium, 0.5 mM of IPTG and a growth temperature of 30 °C.
- c. It has been determined that the age of the cells influences the production of isobutanol in the resting cells stage. Cells show greater activity in resting cells if they are collected in the first half of the exponential growth phase.
- d. A prolonged exposure to high concentrations of IPTG and temperatures above 30 °C induce the formation of inclusion bodies. These inclusion bodies, which are formed by aggregates of insoluble proteins, inhibit the production of isobutanol during the resting cell stage.

Effect of fluid-dynamic conditions on biomass growth

- a. The growth rate of *S. blattae* (p424IbPSO) increases in runs carried out at stirring speeds from 100 rpm to 600 rpm. In experiments conducted between 600 rpm and 1000 rpm, the growth rate value remains constant. Growth rate decreases in the runs with stirring speeds above 1000 rpm.

- b. Cell viability is reduced in experiments carried out at more than 800 rpm of stirring speed. For experiments carried out at 800 rpm and 1000 rpm of stirring speed, cells are affected from the fifteen hour of growth. For the experiment carried out at 1200 rpm the cell viability is drastically reduced throughout the experiment.
- c. Morphological changes in the cells have been observed by transmission electron microscopy (TEM) for stirring speed above 800 rpm. The formation of cell aggregates and some cell elongation are also observed. The cells are clearly damaged if they are cultured at 1200 rpm stirring speed.
- d. It has been determined that for shear rates higher than 1300 s^{-1} , which correspond to 800 rpm, there are evident signs of hydrodynamic stress.
- e. Oxygen transfer rate (OTR) and oxygen uptake rate (OUR) determine the availability of oxygen in the culture medium. The distribution of metabolites during growth is affected by changes in OTR-OUR and therefore by changes in fluid-dynamic conditions. The maximum oxygen uptake rate grows up to 600 rpm, reaching its maximum value. For higher agitation rates, this value decreases. Likewise, isobutanol yield increases in experiments up to a stirring rate of 600 rpm and, for higher stirring rates isobutanol yield decreases. An increase in the stirring speed, and thus an increase in the OTR, favours the production of biomass, the production of acetic acid, CO_2 and compounds with a high degree of oxidation, such as isobutyric acid and 2,3-butanedione dimer. On the other hand, for lower OTR values, the synthesis of lactic acid, succinic acid and ethanol is favoured. Therefore, different OTR-OUR conditions cause changes in the metabolic pathway followed by the culture.
- f. The cells used in resting cells production show a different behaviour when are cultivated under different fluid-dynamic conditions. The cells, although they are used under the same conditions, have “memory” of how they have been cultivated, producing a different distribution of metabolites, similar to the distribution observed during growth. Therefore, fluid-dynamic conditions during growth determine the distribution of metabolites during operation in resting cells. Thus, the production of lactic acid and ethanol in resting cells is higher for cells produced with low agitation rates, while the production of isobutanol or acetic acid is higher for cells obtained with higher agitation rates during growth.

- g. The highest isobutanol yield resting cells stage is obtained when the cells are collected in the first half of the exponential growth phase and are cultivated with a stirring speed of 400 rpm.
- h. For agitation speeds higher than 1000 rpm, an anomalous behaviour is observed, and the production of all metabolites is negatively affected. This is due to the stress introduced by fluid-dynamic conditions and the concentration of available oxygen to which the cells are exposed during growth.

6.3. New strains for isobutanol production

- a. As a result of the knowledge on the limitations of the metabolic pathway of *S. blattae* (p424IbPSO) new strains capable of producing isobutanol from glucose were built. In these constructions the dependence on the reduced NADPH cofactor was reduced or its synthesis was favoured. The strains with activity to synthesize isobutanol are the following:
 - *S. blattae* p424IbPSO-pIZadhA: the *adhA* gene has been inserted new plasmid (pIZ) compatible with the original *S. blattae* plasmid (p424IbPSO). This gene encode for a NADH-dependent alcohol dehydrogenase enzyme.
 - *S. blattae* p424IbPSO-pIZpntAB: *pntAB* genes have been inserted into a new plasmid (pIZ), the *pntAB* genes encodes for a transhydrogenase enzyme that regulates the balance between NADH and NADPH.
- b. The production of isobutanol is negatively affected by the presence of an additional plasmid (pIZ). Under this premise, it can be confirmed that the insertion of the *adhA* gene, which eliminates the need to use NADPH in the last step of the metabolic pathway, improved isobutanol production. Nevertheless, this production is significantly improved when the *pntAB* genes are introduced into the additional plasmid (pIZ), the PntAB enzyme increases the amount of NADPH available under anaerobic conditions.

6.4. Most relevant conclusions of this work

Importance of oxygen in the isobutanol bio-production

- a. The importance of the oxygen effect in the isobutanol production has been highlighted. On one side, production under microaerophilic or anaerobic conditions leads to a consumption of reduced cofactors (NADPH); under these conditions and when exhausted isobutanol synthesis is stopped. On the other hand, under aerobic conditions isobutanol production decreases due to the synthesis of other compounds. Other metabolic pathways are activated, enzymatic and non-enzymatic reactions take place. Therefore, in aerobic systems, oxygen is an essential element and plays an important role in the distribution of the different metabolites produced by the culture. In addition, the availability of oxygen determines the concentration of oxidized/reduced cofactors, which are necessary for the enzymes dependent on them to be active.

Importance of the fluid-dynamic conditions

- a. The influence of fluid-dynamic conditions on the evolution of the studied system has been determined; in STBR, the use of different stirrer speed can cause the appearance of hydrodynamic stress and also stress caused by an excessive concentration of oxygen in the culture medium. These conditions notably affect bacterial growth, cell viability and integrity and the distribution of metabolites produced by the cells.

Production of isobutanol using resting cells

- a. It has been demonstrated that it is possible to carry out the production of isobutanol from glucose by working in resting cells. This form of operation, once optimized, can lead to a significant reduction in the costs of the possible process on a larger scale.
- b. It should be noted that fluid-dynamic conditions used in growth not only influences the behaviour of the cells when they are cultured in growth, but also influences the behaviour of these cells when they are used in resting cells. In this way, it was obtained a distribution of products and therefore of the metabolic pathway, similar to that obtained in growth, although in the culture in resting

cells do not change these fluid-dynamic conditions neither the OTR-OUR relation.

6.5. Recommendations

Regarding the isobutanol production in resting cells

In the future, it is intended to continue with the optimisation work on the isobutanol production stage of resting cells. First of all, a pH strategy must be determined and it must be checked whether the addition of certain compounds can improve production in this form of operation.

Regarding the construction of new genetically modified strains

Because a decrease in isobutanol production has been observed when an additional plasmid is introduced into the strain, the “healing” of the strain should be carried out firstly. The “healing process” consist in the elimination of the pIZ plasmid, obtaining a strain similar to the one originally used in this work. In this way, it could be checked if the addition of the plasmid really generates some kind of stress or if, on the contrary, the decrease in the production of isobutanol is due to some change that the strain has undergone before the modifications have been carried out. Likewise, the possibility of introducing *pntAB* genes into the bacterial chromosome is being studied, thus eliminating the stress generated by the presence of a new plasmid. On the other hand, in order to obtain a greater production of isobutanol, it would be possible to carry out the deletion of the genes that encode for the enzymes that compete with acetate synthase enzyme for pyruvate.

A long, brightly lit library aisle with rows of bookshelves on both sides, leading to a red chair at the end. The shelves are filled with books of various colors. The floor is made of light-colored tiles. The ceiling is white with recessed lighting. The overall atmosphere is clean and organized.

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- [1] M. Coma, E. Martinez-Hernandez, F. Abeln, S. Raikova, J. Donnelly, T.C. Arnot, M.J. Allen, D.D. Hong, C.J. Chuck, Organic waste as a sustainable feedstock for platform chemicals, *Faraday Discussions*, 202 (2017) 175-195.
- [2] The World Bank Group, GDP growth (annual %). World Bank national accounts data, and OECD National Accounts data files, The World Bank Group, 2018.
- [3] B.K. Ahring, P. Westermann, Biofuels: Coproduction of Bioethanol with Other Biofuels, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108 (2007) 289-302.
- [4] R.K. Pachauri, M.R. Allen, V.R. Barros, J. Broome, W. Cramer, R. Christ, J.A. Church, Q. Dahe, P. Dasgupta, N.K. Dubash, Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, (2014) 151-165.
- [5] T.F. Stocker, D.H. Qin, G. Plattner, M.M.B. Tignor, S.K. Allen, Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report, (2013) 1535.
- [6] N. Watts, W.N. Adger, P. Agnolucci, J. Blackstock, P. Byass, W. Cai, S. Chaytor, T. Colbourn, M. Collins, A. Cooper, P.M. Cox, J. Depledge, P. Drummond, P. Ekins, V. Galaz, D. Grace, H. Graham, M. Grubb, A. Haines, I. Hamilton, A. Hunter, X. Jiang, M. Li, I. Kelman, L. Liang, M. Lott, R. Lowe, Y. Luo, G. Mace, M. Maslin, M. Nilsson, T. Oreszczyn, S. Pye, T. Quinn, M. Svensdotter, S. Venevsky, K. Warner, B. Xu, J. Yang, Y. Yin, C. Yu, Q. Zhang, P. Gong, H. Montgomery, A. Costello, Health and climate change: Policy responses to protect public health, *The Lancet*, 386 (2015) 1861-1914.
- [7] J. Gao, H. Hou, Y. Zhai, A. Woodward, S. Vardoulakis, S. Kovats, P. Wilkinson, L. Li, X. Song, L. Xu, B. Meng, X. Liu, J. Wang, J. Zhao, Q. Liu, Greenhouse gas emissions reduction in different economic sectors: Mitigation measures, health co-benefits, knowledge gaps, and policy implications, *Environmental Pollution*, 240 (2018) 683-698.
- [8] World Health Organization, Quantitative risk assessment of the effects of climate change on selected causes of death, 2030s and 2050s, World Health Organization, 2014.

- [9] A. Costello, M. Abbas, A. Allen, S. Ball, S. Bell, R. Bellamy, S. Friel, N. Groce, A. Johnson, M. Kett, M. Lee, C. Levy, M. Maslin, D. McCoy, B. McGuire, H. Montgomery, D. Napier, C. Pagel, J. Patel, J.A.P. de Oliveira, N. Redclift, H. Rees, D. Rogger, J. Scott, J. Stephenson, J. Twigg, J. Wolff, C. Patterson, Managing the health effects of climate change. Lancet and University College London Institute for Global Health Commission, The Lancet, 373 (2009) 1693-1733.
- [10] Organization For Economic Co-operation and Development, The Economic Consequences of Climate Change, OECD Publishing, OECD iLibrary 2015.
- [11] H. Ritchie, M. Roser, Fossil Fuels: CO₂ and other Greenhouse Gas Emissions, OurWorldInData.org, OurWorldInData.org, 2018.
- [12] Macrotrends, Crude Oil Prices - 70 Year Historical Chart, Macrotrends, 2018.
- [13] C. Dellomonaco, F. Fava, R. Gonzalez, The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology, Microb. Cell. Fact., 9 (2010) 1-15.
- [14] C. Du, X. Zhao, D. Liu, C.S.K. Lin, K. Wilson, R. Luque, J. Clark, Introduction: An overview of biofuels and production technologies, in: R. Luque, C.S.K. Lin, K. Wilson, J. Clark (Eds.) Handbook of Biofuels Production (Second Edition), Woodhead Publishing, 2016, pp. 3-12.
- [15] A. Piebalgs, How the European Union is preparing the " Third Industrial Revolution" with an innovative energy policy, (2009).
- [16] M.A. Peters, P. Venkatesan, Bioeconomy and third industrial revolution in the age of synthetic life, Contemporary Readings in Law & Social Justice, 2 (2011) 148.
- [17] F. Cherubini, The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, Energy Conversion and Management, 51 (2010) 1412-1421.
- [18] OCDE/FAO, "Biocombustibles", en OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026, OECD Publishing, Paris, , 2017.

- [19] L. Tao, E.C.D. Tan, R. McCormick, M. Zhang, A. Aden, X. He, B.T. Zigler, Techno-Economic Analysis and Life-Cycle Assessment of Cellulosic Isobutanol and Comparison with Cellulosic Ethanol and n-Butanol, *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 8 (2014) 30-48.
- [20] C.V.T. Mendes, M.G.V.S. Carvalho, C.M.S.G. Baptista, J.M.S. Rocha, B.I.G. Soares, G.D.A. Sousa, Valorisation of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept, *Food and Bioproducts Processing*, 87 (2009) 197-207.
- [21] D. Schwarz, A.K.J. Schoenenwald, J. Dörrstein, J. Sterba, D. Kahoun, P. Fojtíková, J. Vilímek, D. Schieder, C. Zollfrank, V. Sieber, Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate from grass silage by a two-stage fermentation process based on an integrated biorefinery concept, *Bioresource Technology*, 269 (2018) 237-245.
- [22] K. McCormick, N. Kautto, *The Bioeconomy in Europe: An Overview*, Sustainability, 2013, pp. 2589-2608.
- [23] A. Arundel, D. Sawaya, *The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda*, (2009).
- [24] E. de Jong, A. Higson, P. Walsh, M. Wellisch, *Bio-based chemicals value added products from biorefineries*, IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery, (2012).
- [25] M. de Besi, K. McCormick, *Towards a bioeconomy in Europe: National, regional and industrial strategies*, Sustainability, 7 (2015) 10461-10478.
- [26] F. Bauer, L. Coenen, T. Hansen, K. McCormick, Y.V. Palgan, *Technological innovation systems for biorefineries: a review of the literature*, *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 11 (2017) 534-548.
- [27] M. Kircher, *The transition to a bio-economy: emerging from the oil age*, *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 6 (2012) 369-375.
- [28] P. Levy, J. Sanderson, R. Kispert, D. Wise, *Biorefining of biomass to liquid fuels and organic chemicals*, *Enzyme Microb. Technol.*, 3 (1981) 207-215.
- [29] A.B. Kołtuniewicz, K. Dąbkowska, *Biorefineries—factories of the future*, *Chemical and Process Engineering*, 37 (2016) 109-119.

- [30] B. Kamm, P.R. Gruber, M. Kamm, Biorefineries—industrial processes and products, Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, (2007).
- [31] F. Cherubini, G. Jungmeier, M. Wellisch, T. Willke, I. Skiadas, R. Van Ree, E. de Jong, Toward a common classification approach for biorefinery systems, *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 3 (2009) 534-546.
- [32] A. Demirbas, Biorefineries: current activities and future developments, *Energy Conversion and Management*, 50 (2009) 2782-2801.
- [33] K. Menrad, A. Klein, S. Kurka, Interest of industrial actors in biorefinery concepts in Europe, *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 3 (2009) 384-394.
- [34] National Renewable Energy Laboratory, What is a biorefinery? , National Renewable Energy Laboratory, 2009.
- [35] A. Limayem, S.C. Ricke, Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects, *Progress in energy and combustion science*, 38 (2012) 449-467.
- [36] V. Menon, M. Rao, Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science*, 38 (2012) 522-550.
- [37] C.A. Cardona, Ó.J. Sánchez, Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities, *Bioresource technology*, 98 (2007) 2415-2457.
- [38] M. Knauf, M. Moniruzzaman, Lignocellulosic biomass processing: A perspective, *International sugar journal*, 106 (2004) 147-150.
- [39] F.H. Isikgor, C.R. Becer, Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers, *Polymer Chemistry*, 6 (2015) 4497-4559.
- [40] E.M. Rubin, Genomics of cellulosic biofuels, *Nature*, 454 (2008) 841.
- [41] F.M. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L.C. Duarte, S. Marques, R. Bogel-Lukasik, Hemicelluloses for fuel ethanol: a review, *Bioresource technology*, 101 (2010) 4775-4800.

- [42] J. McMillan, M. Himmel, J. Baker, R. Overend, *Enzymatic Conversion Of Biomass For Fuel Production: Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass*, American Chemical Society, Washington, 1993, pp. 292-323.
- [43] Q. Liu, L. Luo, L. Zheng, *Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants*, *International journal of molecular sciences*, 19 (2018) 335.
- [44] R.B. Hoadley, *Understanding wood: a craftsman's guide to wood technology*, Taunton press, 2000.
- [45] M.E. Himmel, S.-Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady, T.D. Foust, *Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production*, *science*, 315 (2007) 804-807.
- [46] N.W. Ho, S.-F. Chang, *Cloning of yeast xylulokinase gene by complementation of E. coli and yeast mutations*, *Enzyme Microb. Technol.*, 11 (1989) 417-421.
- [47] M. Taherzadeh, K. Karimi, *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review*, *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (2008) 1621-1651.
- [48] C.A. Cardona Alzate, J.C. Solarte Toro, Á.G. Peña, *Fermentation, thermochemical and catalytic processes in the transformation of biomass through efficient biorefineries*, *Catalysis Today*, 302 (2018) 61-72.
- [49] S. Haghghi Mood, A. Hossein Golfeshan, M. Tabatabaei, G. Salehi Jouzani, G.H. Najafi, M. Gholami, M. Ardjmand, *Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment*, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 27 (2013) 77-93.
- [50] V.K. Gupta, C.P. Kubicek, J.-G. Berrin, D.W. Wilson, M. Couturier, A. Berlin, X. Edivaldo Filho, T. Ezeji, *Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass*, *Trends in biochemical sciences*, 41 (2016) 633-645.

- [51] A. Sharma, R. Tewari, S.S. Rana, R. Soni, S.K. Soni, Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 179 (2016) 1346-1380.
- [52] G. Janusz, K.H. Kucharzyk, A. Pawlik, M. Staszczak, A.J. Paszczynski, Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation, *Enzyme Microb. Technol.*, 52 (2013) 1-12.
- [53] L.F.R. Ferreira, A.M.Q. Lopez, R.T. Monteiro, D.S. Ruzene, D.P. Silva, Biodegradation of vinasse: fungal lignolytic enzymes and their application in the bioethanol industry, *Fungal Enzymes*. 1ed. Boca Ranton: Taylor & Francis Group, (2013) 65-93.
- [54] D.B. Menezes, O.A.V. Brazil, L.F. Romanholo-Ferreira, M. de Lourdes T. M. Polizeli, D.S. Ruzene, D.P. Silva, L.P. Costa, M.L. Hernández-Macedo, Prospecting fungal ligninases using corncob lignocellulosic fractions, *Cellulose*, 24 (2017) 4355-4365.
- [55] A.B. Diaz, A. Blandino, I. Caro, Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues, *Trends in Food Science & Technology*, 71 (2018) 52-64.
- [56] W. Parawira, M. Tekere, Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production, *Critical reviews in biotechnology*, 31 (2011) 20-31.
- [57] N. Qureshi, B.C. Saha, R.E. Hector, S.R. Hughes, M.A. Cotta, Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I—Batch fermentation, *Biomass and bioenergy*, 32 (2008) 168-175.
- [58] R.P. John, G. Anisha, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, *Biotechnology advances*, 27 (2009) 145-152.
- [59] H.B. Aditiya, T.M.I. Mahlia, W.T. Chong, H. Nur, A.H. Sebayang, Second generation bioethanol production: A critical review, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 66 (2016) 631-653.
- [60] S.P. Srivastava, J. Hancsok, *Fuels and fuel-additives*, John Wiley & Sons, 2014.

- [61] S.N. Naik, V.V. Goud, P.K. Rout, A.K. Dalai, Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 14 (2010) 578-597.
- [62] P. Havlík, U.A. Schneider, E. Schmid, H. Böttcher, S. Fritz, R. Skalský, K. Aoki, S.D. Cara, G. Kindermann, F. Kraxner, S. Leduc, I. McCallum, A. Mosnier, T. Sauer, M. Obersteiner, Global land-use implications of first and second generation biofuel targets, *Energy Policy*, 39 (2011) 5690-5702.
- [63] B.J. Eikmanns, B. Blombach, Isobutanol, in: V.S. Bisaria, A. Kondo (Eds.) *Isobutanol*, John Wiley & Sons, *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, 2014.
- [64] H. Li, A.F. Cann, J.C. Liao, Biofuels: Biomolecular Engineering Fundamentals and Advances, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1 (2010) 19-36.
- [65] A. Elfasakhany, Investigations on performance and pollutant emissions of spark-ignition engines fueled with n-butanol-, isobutanol-, ethanol-, methanol-, and acetone-gasoline blends: a comparative study, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 71 (2017) 404-413.
- [66] M. Karabektas, M. Hosoz, Performance and emission characteristics of a diesel engine using isobutanol-diesel fuel blends, *Renewable Energy*, 34 (2009) 1554-1559.
- [67] B. Rajesh Kumar, S. Saravanan, Effects of iso-butanol/diesel and n-pentanol/diesel blends on performance and emissions of a DI diesel engine under premixed LTC (low temperature combustion) mode, *Fuel*, 170 (2016) 49-59.
- [68] Y.P. Zhang, Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: opportunities and challenges, *Biotechnology advances*, 33 (2015) 1467-1483.
- [69] B. Rajesh Kumar, S. Saravanan, Use of higher alcohol biofuels in diesel engines: A review, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 60 (2016) 84-115.

- [70] B.M. Masum, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, S.M. Palash, M.A. Wakil, S. Imtenan, Tailoring the key fuel properties using different alcohols (C2–C6) and their evaluation in gasoline engine, *Energy Conversion and Management*, 88 (2014) 382-390.
- [71] Y. Li, Y. Yu, Z. Wang, J. Wang, Physical and chemical properties of isobutanol-gasoline blends, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34 (2015) 908-914.
- [72] A.J. Martyr, M.A. Plint, *Engine testing: The design, building, modification and use of powertrain test facilities*, Elsevier, 2012.
- [73] V.F. Andersen, J.E. Anderson, T.J. Wallington, S.A. Mueller, O.J. Nielsen, Vapor Pressures of Alcohol–Gasoline Blends, *Energy & Fuels*, 24 (2010) 3647-3654.
- [74] J. Lane, The Top 10 advances in renewable butanol: what’s speeding up, where are the slow-downs?, *Biofuels digest*, 2018.
- [75] M. Lapuerta, R. Ballesteros, J. Barba, Strategies to Introduce n-Butanol in Gasoline Blends, *Sustainability*, 9 (2017) 589.
- [76] Gevo, Making Technology Real, Gevo, Gevo Web Page, 2018.
- [77] A. Shi, X. Zhu, J. Lu, X. Zhang, Y. Ma, Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production, *Metab. Eng.*, 16 (2013) 1-10.
- [78] BASF Petronas Chemicals, Isobutanol Technical Leaflet, in: B.P. Chemicals (Ed.), BASF Petronas Chemicals, Technical Leaflet, 2006, pp. 1-4.
- [79] J. Lane, Isobutanol: A New Product from Revamped Ethanol Plants, *Biofuels Digest*, *Biofuels Digest*, 2016.
- [80] Johnson Matthey Group, Process description: Oxo-alcohols, DAVYTM website, Johnson Matthey Group Website, 2017.
- [81] Grand View Research, Isobutanol Market Analysis By Product (Synthetic, Bio-Based), Application (Oil & Gas, Solvents & Coatings, Chemical Intermediates) And Segment Forecasts To 2022, Gran View Research, 2016, pp. 1-120.

- [82] A.I. García, L.A. García, M. Díaz, Fusel Alcohols Production in Beer Fermentation Processes, *Process Biochem.*, 29 (1994) 303-309.
- [83] S. Atsumi, T. Hanai, J.C. Liao, Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels, *Nature*, 451 (2008) 86-89.
- [84] S. Atsumi, J.C. Liao, Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19 (2008) 414-419.
- [85] S. Bastian, X. Liu, J.T. Meyerowitz, C.D. Snow, M.M.Y. Chen, F.H. Arnold, Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*, *Metab. Eng.*, 13 (2011) 345-352.
- [86] J.J. Minty, A.A. Lesnefsky, F. Lin, Y. Chen, T.A. Zaroff, A.B. Veloso, B. Xie, C.A. McConnell, R.J. Ward, D.R. Schwartz, J.-M. Rouillard, Y. Gao, E. Gulari, X.N. Lin, Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*, *Microb. Cell. Fact.*, 10 (2011) 1-38.
- [87] S. Atsumi, T.-Y. Wu, E.-M. Eckl, S.D. Hawkins, T. Buelter, J.C. Liao, Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 85 (2010) 651-657.
- [88] S. Atsumi, Z. Li, J.C. Liao, Acetolactate Synthase from *Bacillus subtilis* Serves as a 2-Ketoisovalerate Decarboxylase for Isobutanol Biosynthesis in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (2009) 6306-6311.
- [89] Y. Yan, J.C. Liao, Engineering metabolic systems for production of advanced fuels, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 (2009) 471-479.
- [90] M.R. Connor, J.C. Liao, Engineering of an *Escherichia coli* Strain for the Production of 3-Methyl-1-Butanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (2008) 5769-5775.
- [91] A. Baez, K.-M. Cho, J.C. Liao, High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with in situ product removal, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 90 (2011) 1681-1690.

- [92] Y. Xiao, X. Feng, A.M. Varman, L. He, H. Yu, Y.J. Tang, Kinetic Modeling and Isotopic Investigation of Isobutanol Fermentation by Two Engineered *Escherichia coli* Strains, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 51 (2012) 15855-15863.
- [93] E.A. Savrasova, A.D. Kivero, R.S. Shakulov, N.V. Stoyanova, Use of the valine biosynthetic pathway to convert glucose into isobutanol, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (2011) 1287-1294.
- [94] M.P. Brynildsen, J.C. Liao, An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*, *Mol. Syst. Biol.*, 5.1 (2009) 277.
- [95] C. Felpeto-Santero, A. Rojas, M. Tortajada, B. Galan, D. Ramon, J.L. Garcia, Engineering alternative isobutanol production platforms, *AMB Express*, 5 (2015) 1-9.
- [96] S.H. Desai, C.A. Rabinovitch-Deere, Z.L. Fan, S. Atsumi, Isobutanol production from cellobionic acid in *Escherichia coli*, *Microb. Cell. Fact.*, 14 (2015) 1-10.
- [97] C.T. Trinh, J. Li, H.W. Blanch, D.S. Clark, Redesigning *Escherichia coli* Metabolism for Anaerobic Production of Isobutanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (2011) 4894-4904.
- [98] S. Atsumi, T.-Y. Wu, I.M.P. Machado, W.-C. Huang, P.-Y. Chen, M. Pellegrini, J.C. Liao, Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*, *Mol. Syst. Biol.*, 6 (2010) 449.
- [99] K.M. Smith, J.C. Liao, An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*, *Metab. Eng.*, 13 (2011) 674-681.
- [100] S.H. Desai, C.A. Rabinovitch-Deere, Y. Tashiro, S. Atsumi, Isobutanol production from cellobiose in *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98 (2014) 3727-3736.
- [101] N. Nakashima, T. Tamura, A new carbon catabolite repression mutation of *Escherichia coli*, *mlc*, and its use for producing isobutanol, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114 (2012) 38-44.
- [102] K.M. Smith, K.-M. Cho, J.C. Liao, Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 87 (2010) 1045-1055.

- [103] B. Blombach, T. Riester, S. Wieschalka, C. Ziert, J.-W. Youn, V.F. Wendisch, B.J. Eikmanns, *Corynebacterium glutamicum* Tailored for Efficient Isobutanol Production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (2011) 3300-3310.
- [104] S. Yamamoto, M. Suda, S. Niimi, M. Inui, H. Yukawa, Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation, *Biotechnol. Bioeng.*, 110 (2013) 2938-2948.
- [105] J. Lange, R. Takors, B. Blombach, Zero-growth bioprocesses: A challenge for microbial production strains and bioprocess engineering, *Engineering in Life Sciences*, 17 (2017) 27-35.
- [106] B. Blombach, B.J. Eikmanns, Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*, *Bioengineered bugs*, 2 (2011) 346-350.
- [107] S. Li, J. Wen, X. Jia, Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 91 (2011) 577-589.
- [108] X.Q. Jia, S.S. Li, S. Xie, J.P. Wen, Engineering a Metabolic Pathway for Isobutanol Biosynthesis in *Bacillus subtilis*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 168 (2012) 1-9.
- [109] H. Su, J. Jiang, Q. Lu, Z. Zhao, T. Xie, H. Zhao, M. Wang, Engineering *Corynebacterium crenatum* to produce higher alcohols for biofuel using hydrolysates of duckweed (*Landoltia punctata*) as feedstock, *Microb. Cell. Fact.*, 14 (2015) 199-199.
- [110] A.M. Varman, Y. Xiao, H.B. Pakrasi, Y.J. Tang, Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp Strain PCC 6803 for Isobutanol Production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (2013) 908-914.
- [111] W. Higashide, Y. Li, Y. Yang, J.C. Liao, Metabolic Engineering of *Clostridium cellulolyticum* for Production of Isobutanol from Cellulose, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (2012) 2727-2733.

- [112] P.P. Lin, L. Mi, A.H. Moriok, M.M. Yoshino, S. Konishi, S.C. Xu, B.A. Papanek, L.A. Riley, A.M. Guss, J.C. Liao, Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*, *Metab. Eng.*, 31 (2015) 44-52.
- [113] X. Chen, K.F. Nielsen, I. Borodina, M.C. Kielland-Brandt, K. Karhumaa, Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism, *Biotechnol. Biofuels*, 4 (2011) 1-12.
- [114] T. Kondo, H. Tezuka, J. Ishii, F. Matsuda, C. Ogino, A. Kondo, Genetic engineering to enhance the *Ehrlich pathway* and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.*, 159 (2012) 32-37.
- [115] F. Matsuda, T. Kondo, K. Ida, H. Tezuka, J. Ishii, A. Kondo, Construction of an Artificial Pathway for Isobutanol Biosynthesis in the Cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 76 (2012) 2139-2141.
- [116] W.H. Lee, S.O. Seo, Y.H. Bae, H. Nan, Y.S. Jin, J.H. Seo, Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 35 (2012) 1467-1475.
- [117] J.L. Avalos, G.R. Fink, G. Stephanopoulos, Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols, *Nat. Biotechnol.*, 31 (2013) 335-341.
- [118] F. Matsuda, J. Ishii, T. Kondo, K. Ida, H. Tezuka, A. Kondo, Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance, *Microb. Cell. Fact.*, 12 (2013) 1-11.
- [119] S. H. Park, S. Kim, J.-S. Hahn, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98 (2014) 9139-9147.
- [120] K. Ida, J. Ishii, F. Matsuda, T. Kondo, A. Kondo, Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell. Fact.*, 14 (2015) 1-9.

- [121] S.K. Hammer, J.L. Avalos, Uncovering the role of branched-chain amino acid transaminases in *Saccharomyces cerevisiae* isobutanol biosynthesis, *Metab. Eng.*, 44 (2017) 302-312.
- [122] H. Qi, S. Li, S. Zhao, D. Huang, M. Xia, J. Wen, Model-Driven Redox Pathway Manipulation for Improved Isobutanol Production in *Bacillus subtilis* Complemented with Experimental Validation and Metabolic Profiling Analysis, *Plos One*, 9 (2014) e93815.
- [123] P.P. Lin, K.S. Rabe, J.L. Takasumi, M. Kadisch, F.H. Arnold, J.C. Liao, Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Metab. Eng.*, 24 (2014) 1-8.
- [124] B.O.Y. Silva-Santisteban, F.M. Filho, Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 36 (2005) 717-724.
- [125] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, A. Alcon, V.E. Santos, The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 36 (2013) 911-925.
- [126] A. Rodriguez, V.E. Santos, E. Gomez, F. Garcia-Ochoa, Influence of fluid dynamic conditions on 1,3-propanediol production from glycerol by *Shimwellia blattae*: carbon flux and cell response, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92 (2017) 2050-2059.
- [127] A. Rodriguez, V. Ripoll, V.E. Santos, E. Gomez, F. Garcia-Ochoa, Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: oxygen transfer and uptake rates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92 (2017) 1266-1275.
- [128] R. Bronnenmeier, H. Märkl, Hydrodynamic stress capacity of microorganisms, *Biotechnol. Bioeng.*, 24 (1982) 553-578.
- [129] H. Märkl, R. Bronnenmeier, B. Wittek, The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress, *Int Chem Eng*, 31 (1991) 185-196.

- [130] J.J. Meijer, H.J.G. ten Hoopen, Y.M. van Gameren, K.C.A.M. Luyben, K.R. Libbenga, Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture, *Enzyme Microb. Technol.*, 16 (1994) 467-477.
- [131] F.G. Camacho, A.C. Gómez, T.M. Sobczuk, E.M. Grima, Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*, *Process Biochem.*, 35 (2000) 1045-1050.
- [132] J.C. Merchuk, Shear effects on suspended cells, *Bioreactor systems and effects*, Springer, 1991, pp. 65-95.
- [133] M.S. Puthli, V.K. Rathod, A.B. Pandit, Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor, *Biochem. Eng. J.*, 23 (2005) 25-30.
- [134] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, V.E. Santos, J.C. Merchuk, Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, *Biochem. Eng. J.*, 49 (2010) 289-307.
- [135] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 153-176.
- [136] C. Felpeto-Santero, Producción de esteroides mediante ingeniería de citocromos, Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, (2016).
- [137] G. Taguchi, Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes, Asian Productivity Organization ; Kraus International, Tokyo, 2001.
- [138] R. Jeyapaul, P. Shahabudeen, K. Krishnaiah, Quality management research by considering multi-response problems in the Taguchi method – a review, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 26 (2005) 1331-1337.
- [139] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks, *Chemical Engineering Science*, 59 (2004) 2489-2501.
- [140] F. Garcia-Ochoa, A. Romero, V. Santos, Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions, *Int. Chem. Eng.*, 32 (1992) 538-551.

- [141] P.M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science, 2012.
- [142] A. Weckbecker, W. Hummel, Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase, *Biotechnology letters*, 26 (2004) 1739-1744.
- [143] A. Shi, X. Zhu, J. Lu, X. Zhang, Y. Ma, Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production, *Metab. Eng.*, 16 (2013) 1-10.
- [144] S.S. Deb, S.M.S. Reshamwala, A.M. Lali, Activation of alternative metabolic pathways diverts carbon flux away from isobutanol formation in an engineered *Escherichia coli* strain, *Biotechnology Letters*, (2019).
- [145] J. Nielsen, Jay D. Keasling, *Engineering Cellular Metabolism*, *Cell*, 164 (2016) 1185-1197.
- [146] K.L. Jones, S.-W. Kim, J. Keasling, Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria, *Metab. Eng.*, 2 (2000) 328-338.

A photograph of a lush, green forest. The trees are tall and have thick, gnarled trunks covered in moss. The canopy is dense with vibrant green leaves, creating a dappled light effect. The overall atmosphere is serene and natural.

8. ANEXO I: PUBLICACIONES

Publicación 1

- **Autores:** Miguel G. Acedos, Alberto Ramón, Susana de la Morena, Victoria E. Santos y Félix García Ochoa.
- **Título:** Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions.
- **Revista:** Biochemical Engineering Journal (2018), 133: 21-27.
- **Índice de impacto** (2017): 3,226
- **Categoría:** Ingeniería Química (Q1), Biotecnología y Microbiología Aplicada (Q2).
- **Enlace:** <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.02.002>
- **Resumen:** En este trabajo, se lleva a cabo el estudio de la influencia del pH y el oxígeno disponible, la optimización del medio de cultivo y la estrategia de pH óptima para la producción de isobutanol a partir de glucosa con *S. blattae* (p424IbPSO). En primer lugar, se estudia el posible efecto del pH sobre la producción de isobutanol, variando la concentración de sales fosfato, las cuales forman un tampón natural en el caldo. De este modo, se observa que al aumentar al doble la concentración de sales fosfato, tanto la producción como el rendimiento eran mayores, determinando así que el pH es una variable con gran importancia en el proceso. Por otro lado, se estudia la posibilidad de reducir la concentración de la fuente de nitrógeno compleja con el fin de reducir los costes de un posible proceso industrial. La concentración de extracto de levadura puede ser reducida 3,3 veces respecto de la concentración más habitual, sin obtener ningún cambio en el valor del rendimiento en isobutanol, que se mantiene en $0,173 \text{ g}_{\text{Ib}} \cdot \text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$. Se estudia también la influencia de la cantidad de oxígeno disponible en la producción de isobutanol. Se determina que a mayor cantidad de oxígeno disponible aumenta la cantidad de isobutanol producida, obteniendo $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de isobutanol con la mayor concentración de oxígeno empleada. Por último, se lleva a cabo un estudio para optimizar la estrategia de pH en STBR, obteniendo como óptima la estrategia de dejar evolucionar libre el pH hasta un valor de 6,0, obteniendo así $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de isobutanol y un rendimiento de $0,286 \text{ g}_{\text{Ib}} \cdot \text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$.



Regular article

Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions

Miguel G. Acedos, Alberto Ramon, Susana de la Morena, Victoria E. Santos*, Felix Garcia-Ochoa

Chemical Engineering Department, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2017
 Received in revised form 29 January 2018
 Accepted 2 February 2018
 Available online 5 February 2018

Keywords:

Isobutanol
 Glucose
Shimwellia blattae
 Medium composition
 Oxygen availability
 pH strategy

ABSTRACT

The potential to produce high isobutanol concentrations from glucose with a new genetically modified microorganism, *Shimwellia blattae* (p424IbPSO), has been studied. The influences of several operating conditions (media composition, oxygen availability and pH) have been studied. Yeast extract concentration can be reduced 3.3 times from the more usual concentration, reducing the cost of the bioprocess, but obtaining no change in isobutanol yield: $0.173 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{GC}}^{-1}$. The influence of the oxygen availability on isobutanol production has also been considered. The use of higher air proportion into sealed bottles led to the best results in isobutanol concentration and productivity: 6 g L^{-1} and $0.19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. The study of the pH strategy shows that the best one is to begin at an initial pH value of 6.8, to let the pH fall freely to a value of 6.0 and then to control the pH at this value, obtaining about 11 g L^{-1} of isobutanol titer and about $0.286 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{GC}}^{-1}$ of yield.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The increase in energy consumption and the forecast about fossil fuels depletion, as well as its environmental impact, have motivated an increasing interest in the search for new alternative biofuels. Nowadays, the studies are usually focused on the quest for the best substitute of bioethanol. Heavier alcohols, of 4–6 carbon atoms, with lower hygroscopy and higher energy density are sought. Among these alcohols, isobutanol is an interesting candidate, because it is a good substitute for bioethanol due to its better properties. Isobutanol can be used as an additive for gasoline, improving its quality as fuel, or even as a replacement in the future. Moreover, isobutanol can be used as a platform chemical to produce other value-added compounds [1].

Isobutanol can be produced by native microorganisms, having been identified as a by-product in beer production [2], but nowadays the efforts are focused on the search of genetically modified microorganisms (GMO) in order to improve isobutanol production, because the low titer of isobutanol obtained from wild type strains would make the industrial bioprocess economically unfeasible [3–12]. Table 1 shows a summary of the works published testing different GMO; these works were carried out in batch operation in

sealed bottles in order to avoid isobutanol evaporation. As can be seen, the highest isobutanol concentration reached was 12 g L^{-1} [13]. Nevertheless, better results can be obtained operating in fed-batch; final isobutanol concentration of 22 g L^{-1} has been reported using *Escherichia coli* JCL206 [3] in runs performed by glucose fed-batch, and around 50 g L^{-1} with the same bacteria strain by *in situ* removal of isobutanol by gas stripping [14].

The production of isobutanol with the GMO cited presents some limitations such as low isobutanol titers, inhibition of bacteria by isobutanol and cell instability. The main factor seems to be the inhibition by isobutanol [15].

A new biocatalyst, *Shimwellia blattae* modified with the plasmid p424IbPSO has been reported to produce 6 g L^{-1} on sealed bottles [7]. This GMO needs oxygen to compensate the imbalance NAD^+/NADH for isobutanol production. In order to reduce the evaporation of isobutanol, the culture bottles were sealed when IPTG was added to culture media, which caused oxygen deprivation in culture bottles, stopping the growth [7]. A scheme of the metabolic pathway of this GMO is shown in Fig. 1.

The main objective of this work is to improve isobutanol production from glucose by this GMO. Accordingly, the medium composition and the values of some variables can be considered in order to improve the rate and selectivity of the bioprocess. A review of the YE concentrations employed in previous works as well as other organic nitrogen sources can be summarized in Table 1. The use of a high YE concentration in the production media for-

* Corresponding author.

E-mail address: vesantos@ucm.es (V.E. Santos).

Nomenclature

A	Percentage of air volume per total volume in the vessel (%)
DCM	Dry cell mass (g L^{-1})
C_j	Concentration of compound j (g L^{-1})
M9	Minimal salts medium 9
ND	Not described
OD_{600}	Optical density at 600 nm
P_{Ib}	Isobutanol productivity ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
$Y_{i/\text{Gc}}$	Yield of the compound i respect to the consumed glucose ($g_i g_{\text{Gc}}^{-1}$)
YE	Yeast extract
YNB	Yeast nitrogen base medium
YPD	Yeast extract peptone dextrose medium

Underscripts

Ac	Referred to acetic acid
Et	Referred to ethanol
Gc	Referred to the consumed glucose
i	Referred to a general compound i ($i = \text{Ac, et, ib, La, X}$)
Ib	Referred to isobutanol
La	Referred to lactic acid
X	Referred to biomass
0	Initial value

Superscripts

*	Referred to the maximum biomass concentration at the stationary growth phase
---	--

mulation is undesirable for the bioprocess economy at industrial scale. It is remarkable that the best results reported in these studies are achieved when YE concentration in the culture medium is about 5 g L^{-1} , although other compounds such as peptone or vitamins and amino acid solutions have been added to the medium in some cases.

As can be observed in Table 1, the initial pH and the pH strategy followed in the previous works are different from each other. Most of these works do not control the value of this variable, pH value changes freely; there is only one work performed controlling pH at shaker scale in a value of 7.0; this work reports the highest titer and yield of isobutanol [13].

The influence of oxygen has not been considered as a target for any of the works showed in Table 1. Nevertheless, oxygen availability is not the same in the different papers, although it is unknown in most of them, maybe due to the fact that the authors do not attach importance to this variable or perhaps due to the difficulty of studying it in bottles in shaker scale, as it happens with pH control.

The aim of this work is to perform a study dealing with the medium composition (trying to reduce the YE concentration), and the influence of pH and oxygen availability in the production of isobutanol with *S. blattae* (p424IbPSO), as a potential industrial isobutanol producer.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and inoculum built-up

S. blattae (p424IbPSO), is the microorganism used in this study. It has been kindly supplied by the Environmental Biotechnology Laboratory of the Biological Research Center (CSIC, Spain). The strain was stored as pellets in 1 mL Eppendorf tubes at -80°C into 50% w/w glycerol/saline serum media prior to inoculation.

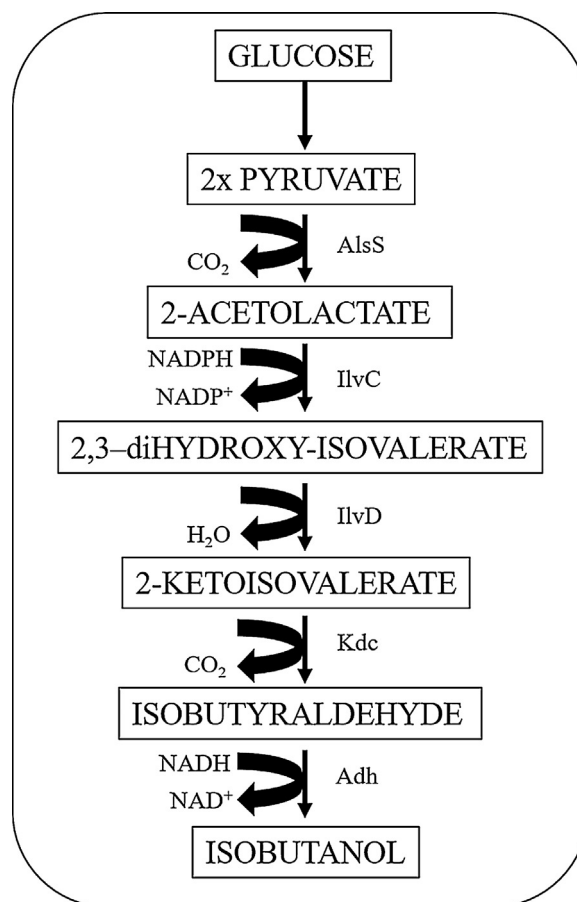


Fig. 1. Isobutanol pathway cloned in *S. blattae* (p424IbPSO). *AlsS*: acetolactate synthase; *IlvC*: acetohydroxy acid isomeroeductase; *IlvD*: dihydroxy-acid dehydratase; *Kdc*: 2-ketoacid decarboxylase; *Adh*: alcohol dehydrogenase. (Adapted from Felpeto-Santero et al. [7]).

Inoculum built-up was carried out in two stages, pre-inoculum and inoculum, in order to obtain cells in the same metabolic state and reduce experimental error, assuring experimental data reproducibility. These steps were performed in 250 mL flasks containing 50 mL of liquid media at 37°C of temperature, in orbital shaker at 250 rpm for 12 and 3 h, respectively. M92X liquid medium containing (for a liter) 2 g NH_4Cl , 6 g KH_2PO_4 , 12 g Na_2HPO_4 , 1 g NaCl , 0.246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.011 g CaCl_2 was used. This medium was supplemented with 5 g L^{-1} YE, 20 g L^{-1} of glucose as carbon source and 1 mL L^{-1} of a 1000X mixture of trace elements (containing per liter: 1.5 mg nitrile-tri-acetic acid, 3 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg NaCl , 0.1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 mg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mg $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.01 mg H_3BO_3 , 0.01 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.025 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). The antibiotic streptomycin sulfate was used for plasmid maintenance at a concentration of 50 g L^{-1} .

2.2. Experimental procedure

The experiments were performed both in closed bottles at an orbital shaker and a stirred tank bioreactor (STBR).

All runs (except those indicated) were performed using M92X medium, which contains (per liter) 2 g NH_4Cl , 6 g KH_2PO_4 , 12 g Na_2HPO_4 , 1 g NaCl , 0.246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.011 g CaCl_2 . This medium was supplemented with $1.5\text{--}5 \text{ g L}^{-1}$ YE (nitrogen source); 34 g L^{-1} of glucose (carbon source) for trials at orbital shaker scale (as used by Atsumi et al.) [16] and 50 g/L for STBR scale runs (according to Baez et al.) [14]; and 1 mL L^{-1} of a

1000X mixture of trace elements (containing per liter: 1.5 mg nitrile-tri-acetic acid, 3 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.18 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5 mg $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 1 mg NaCl, 0.1 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.18 mg $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 mg $NaSeO_3 \cdot 5H_2O$, 0.02 mg $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0.01 mg H_3BO_3 , 0.01 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ and 0.025 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$). The antibiotic streptomycin sulfate was used for plasmid maintenance adding a concentration of 50 mg L^{-1} .

The runs carried out in bottles at an orbital shaker were initially conducted at 37°C of temperature and a speed agitation of 250 rpm; after 2 h of bacterial growth, 1 mM of IPTG was added and operational conditions were changed to a temperature of 30°C and an agitation speed of 200 rpm, and the bottles were sealed to avoid the evaporation of isobutanol, as indicated in the work of Felpeto-Santero et al. [7].

The runs performed in the 1 L STBR (BIOSTAT B-Plus; Sartorius AG, Germany) were conducted using 400 mL of working volume, at an initial temperature of 37°C and a stirrer speed of 600 rpm. In a way similar to experiments in bottles, after 2 h growth, temperature was changed to 30°C , and IPTG (1 mM) was added and the bioreactor vessel was closed to avoid isobutanol evaporation. The pH was controlled at different values by automatic addition of NaOH 2 M.

2.3. Analysis methods

The concentration of biomass was determined by optical density measured at 600 nm (Shimadzu UV-vis spectrophotometer UV-1603), linking dry cell mass (DCM, obtained by drying at 105°C until constant weight) and optical density through the following equation:

$$DCM = 0.49 \cdot OD_{600} \quad (1)$$

Glucose and all the metabolic products concentrations, such as isobutanol, lactate, acetate, ethanol and succinate were determined by HPLC, by means of an Agilent Technologies 1100 series equipment, employing a Rezex ROA-Monosaccharide H+ (8%) column ($300 \times 7.8 \text{ mm}$, Phenomenex), coupled to a Waters 2414 Refractive Index Detector (RID). The volume of sample injection was $5 \mu\text{L}$. Mobile phase employed was H_2SO_4 0.001 M at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} . The temperature of the column was maintained at 80°C and the RID operated at 55°C .

3. Experimental results and discussion

As indicated above, the influences of several operational conditions have been studied. Firstly, the effect of increasing the concentration of phosphate salts, because these salts create a natural buffer; the effect of increasing the strength of this buffer has been studied, in order to know if the pH has any effect on the bio-process. Secondly, the concentration of yeast extract, in the interval from 1.5 to 5 g L^{-1} , has been studied. Also, the effect of oxygen availability has been considered by varying the volume of the gas chamber inside the cylinders, thus modifying the concentration of available oxygen. Finally, the best pH strategy for the production of isobutanol at STBR scale has been studied, controlling the pH at different values. The experimental design is given in Table 2 (medium and oxygen availability) and Table 3 (pH study).

The following parameters have been defined in order to determine the influence of the different variables:

- Yield of each product, according to the following equation:

$$Y_{i/GC} = \frac{C_i}{C_{GC}} \quad (i = Ac, Et, Ib, La, X) \quad (2)$$

Table 1
Literature summary about isobutanol production with different GMO using glucose as substrate in batch operation and sealed vessels as experimental devices.

Microorganism	Culture medium	C_{GC0} (g L^{-1})	Nutritional supplements	pH	Initial value control		Titer Ib (g L^{-1})	$Y_{Ib/GC}$	P_{Ib} ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Reference
					CVE (g L^{-1})	A (%)				
<i>Escherichia coli</i>	M9	40	-	7.0	7.0	ND	12.0	0.280	0.160	[13]
	FM	60	Vitamins Amino acids	ND	-	ND	6.35	0.106	0.093	[20]
<i>Corynebacterium crenatum</i>	Minimal salts media	60	Peptone 10 g L^{-1}	ND	-	86.67	1.26	0.063	0.026	[17]
<i>Pseudomonas sp.</i>	M9	20	Thiamine 0.001%	ND	-	80	0.33	ND	0.011	[18]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SD minimal	20	6.7 YNB	ND	-	50	0.14	0.007	0.001	[11]
	SD minimal	20	Vitamins	ND	-	ND	0.06	0.002	0.001	[21]
	YNB media	100–200	Vitamins	ND	-	ND	0.63	0.006	ND	[22]
	YPD media	40	Peptone 20 g L^{-1}	ND	-	80	0.15	ND	ND	[19]
<i>Shimwellia blattae</i>	M9	20	-	ND	-	90	5.75	0.196	0.119	[7]
	M92X	34	-	6.8	no	91.7	5.71	0.231	0.190	This work
	M92X	45	-	6.8	6*	73.0	11.1	0.286	0.201	

ND: No data available/*Experiment carried out at STBR scale.

Table 2
Experiments carried out for medium composition study: operational conditions (medium, YE concentration and A) and results obtained of maximum biomass concentration, and titer, productivity and yield of isobutanol. Experimental error is indicated as \pm SD ($n=3$).

Run	Culture Media	YE (g L^{-1})	A (%)	Cx* (g L^{-1})	Ib Titer (g L^{-1})	P _{Ib} ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Y _{IbGc} ($\text{g}_{\text{Ib}} \text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$)
1	M9	5	83.33	2.12 \pm 0.10	2.69 \pm 0.19	0.089 \pm 0.022	0.142 \pm 0.003
2	M92X	5	83.33	2.29 \pm 0.05	3.68 \pm 0.14	0.108 \pm 0.030	0.177 \pm 0.002
3	M92X	3	83.33	2.00 \pm 0.09	3.84 \pm 0.16	0.130 \pm 0.013	0.173 \pm 0.003
4	M92X	1.5	83.33	1.69 \pm 0.12	3.43 \pm 0.20	0.118 \pm 0.003	0.174 \pm 0.021
5	M92X	1.5	16.00	1.12 \pm 0.05	0.81 \pm 0.10	0.026 \pm 0.016	0.077 \pm 0.020
6	M92X	1.5	33.33	1.21 \pm 0.04	1.24 \pm 0.30	0.041 \pm 0.020	0.087 \pm 0.030
7	M92X	1.5	50.00	1.31 \pm 0.03	1.99 \pm 0.20	0.066 \pm 0.010	0.127 \pm 0.016
8	M92X	1.5	66.66	1.38 \pm 0.08	2.77 \pm 0.12	0.092 \pm 0.019	0.166 \pm 0.013
9	M92X	1.5	71.71	1.71 \pm 0.10	2.78 \pm 0.15	0.093 \pm 0.020	0.171 \pm 0.016
10	M92X	1.5	91.66	2.98 \pm 0.04	5.71 \pm 0.30	0.190 \pm 0.030	0.231 \pm 0.010

Table 3
Experiments carried out in STBR under different pH strategies and results obtained for maximum biomass concentration and titer, productivity and yield of isobutanol. Experimental error is indicated as \pm SD ($n=3$).

Run	pH control value	Cx* (g L^{-1})	Ib Titer (g L^{-1})	P _{Ib} ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Y _{IbGc} ($\text{g}_{\text{Ib}} \text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$)
11	No control	1.73 \pm 0.05	6.64 \pm 0.15	0.121 \pm 0.017	0.257 \pm 0.016
12	5.7	1.83 \pm 0.07	6.86 \pm 0.22	0.125 \pm 0.022	0.240 \pm 0.022
13	6.0	2.13 \pm 0.11	11.07 \pm 0.13	0.201 \pm 0.011	0.286 \pm 0.017
14	6.3	1.83 \pm 0.13	8.82 \pm 0.30	0.160 \pm 0.024	0.231 \pm 0.011
15	6.8	1.95 \pm 0.12	6.56 \pm 0.19	0.119 \pm 0.013	0.179 \pm 0.014

where the compound yields correspond to acetic acid (Ac), ethanol (Et), isobutanol (Ib), lactate acid (La) and biomass (X)) per gram of consumed glucose.

- Isobutanol productivity was determined using the following equation:

$$P_{\text{Ib}} = \frac{C_{\text{Ib}}}{t} \quad (3)$$

where isobutanol productivity (P_{Ib}) is calculated as the ratio between isobutanol concentration (C_{Ib}) and time (t).

3.1. Medium composition study

The study of the medium composition was initially performed comparing the results obtained employing M9 medium, as used by Felpeto-Santero et al. [7], and the results obtained with M92X medium, the medium used for inoculum built up, which has double the concentration of phosphate salts as M9. Both culture media were supplemented with 5 g L^{-1} of YE and 34 g L^{-1} of glucose, according to the values usually employed in the literature [7,16]. The results of these two experiments are summarized in Table 2 as runs 1 (medium M9) and 2 (Medium M92X). As can be seen, the titer, the isobutanol productivity and yield are higher when M92X medium is employed. Therefore, pH seems to have a significant effect on isobutanol production with *Shimwellia blattae* p424IbPSO, because the medium M92X presents a higher buffer capacity.

Yeast extract is an essential nutrient that provides organic nitrogen for bacterial growth, but it is also an expensive compound for large scale industrial processes. In order to reduce the cost of isobutanol production, the effect of reducing the YE concentration in the culture medium has been checked. The results are given in Table 2, corresponding to runs 2, 3 and 4; three different YE concentrations were considered (5 , 3 and 1.5 g L^{-1}), employing M92X culture basal medium in all the cases. As can be observed, the maximum biomass concentration, reached at the stationary phase is lower as the concentration of YE employed in the experiment gets lower. Nevertheless, the isobutanol titer, productivity and yield obtained when the YE concentration is reduced from 5 to 1.5 g L^{-1} , are not practically affected by the decrease of YE concentration in the culture medium. Therefore, this strain is able to carry out the

biotransformation with low YE concentration (1.5 g L^{-1}). This is in contrast to other works that used 5 or even 10 g L^{-1} of YE concentration [7,13,17–19], or other works that use higher concentrations of other nitrogen sources such as amino acids solutions [11,17–22].

3.2. Influence of the oxygen availability

Oxygen availability has also been studied. A semi-quantitative oxygen availability study was carried out using different volumes of culture medium in the sealed bottles in order to modify the air proportion in them. The experimental design can be seen in Table 2 (runs 4–10), together with the experimental results of these runs.

As can be seen in Table 2, in these experiments the percentage of air in the bottles (A) is changed, from 16.0 to 91.67% of the total volume of the closed bottle. All the parameters given in this table (maximum biomass concentration, isobutanol titer, productivity and yield) increase when the volume of air increases, that is, increasing the oxygen availability increases the biomass growth and the isobutanol production.

As can be observed in Fig. 2A, the growth curves have a very short lag phase time, and it can also be observed the growth limitation by the availability of oxygen in the process (the bottles are sealed to avoid isobutanol evaporation); it is clear that the higher the availability of dissolved oxygen, the higher the growth rate obtained. On the other hand, it is also observed that the production of isobutanol presents a lag stage (more than the two hours before introducing the IPTG in the culture), but also the higher isobutanol concentration, productivity and yield are achieved when the oxygen availability is increased. This can be due to the fact that the enzymes involved in the metabolic pathway of isobutanol production need reduced coenzymes to produce isobutanol from pyruvate, and these coenzymes are reduced in the tricarboxylic acid cycle, which only works when oxygen is present in the broth. Therefore, oxygen is necessary to compensate the imbalance NAD^+/NADH for isobutanol production as previously cited [7].

Available oxygen effect on carbon flux distribution can also be observed in Fig. 3; as can be seen, this variable has not a great influence on biomass yield from glucose; however, if a low air volume is available, lactic acid and ethanol are the main products, there is isobutanol production but with a very low yield and there is no acetic acid production. As the gas percentage (oxygen availability)

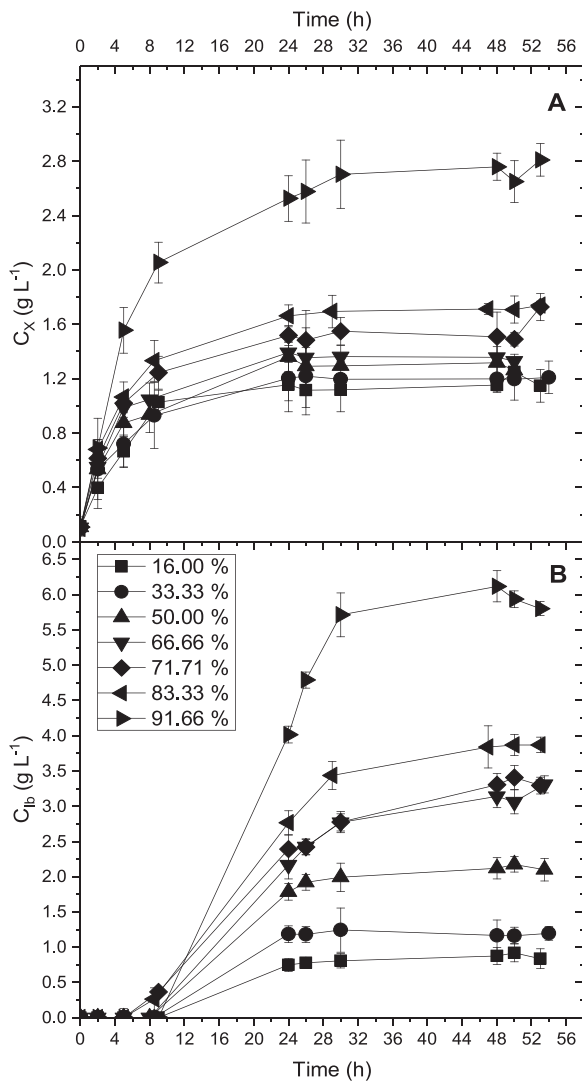


Fig. 2. Effect of available oxygen A (%) on the biomass growth (A) and the isobutanol production (B). Error bars indicate \pm SD ($n=3$).

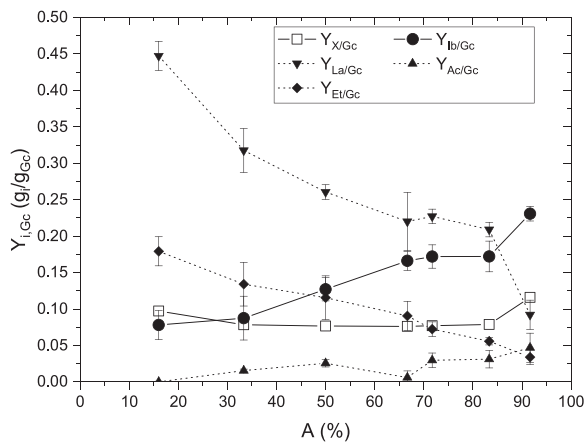


Fig. 3. Values of the yields referred to consumed glucose of biomass ($Y_{X/Gc}$) and the main metabolites ($Y_{Ib/Gc}$ for isobutanol, $Y_{Et/Gc}$ for ethanol, $Y_{La/Gc}$ for lactic acid and $Y_{Ac/Gc}$ for acetic acid) vs. available oxygen (A). Error bars indicate \pm SD ($n=3$).

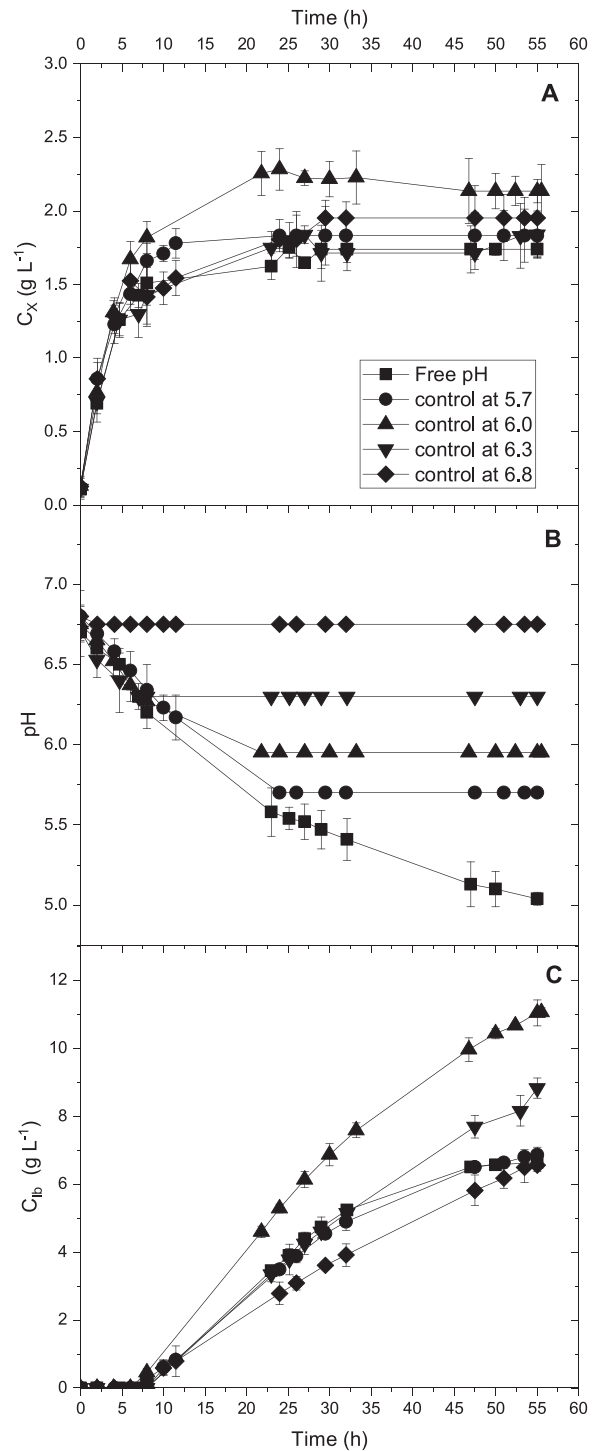


Fig. 4. Results obtained for biomass growth (A) and isobutanol production (C) under different pH strategies (B). Error bars indicate \pm SD ($n=3$).

is increased, both lactic acid and ethanol production decrease and higher yields of isobutanol are obtained.

3.3. Study of the pH strategy

Finally, a study regarding pH influence was carried out in a STBR. Five runs were performed employing an initial pH value of 6.8 in all cases. The evolution of the pH during the run is different among these experiments. The experimental design and some of the results are summarized in Table 3. Run 11 was performed per-

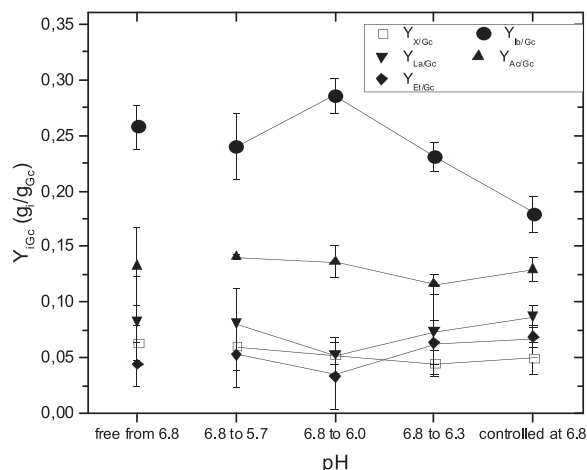


Fig. 5. Values of the yields of biomass ($Y_{X/Gc}$) and the main metabolites ($Y_{lb/Gc}$ for isobutanol, $Y_{Et/Gc}$ for ethanol, $Y_{La/Gc}$ for lactic acid and $Y_{Ac/Gc}$ for acetic acid) referred to consumed glucose vs. pH strategy. Error bars indicate \pm SD ($n = 3$).

mitting free evolution of the pH. Run 15 was carried out controlling the pH at the initial value (6.8); and the other three runs (12–14) were performed letting pH go down to a different value, at which it was controlled throughout the rest of the experiment, being the predetermined values 5.7 (run 12), 6.0 (run 13), 6.3 (run 14) and 6.8 (run 15).

The results obtained for the different runs clearly show that the best strategy is an initial pH value of 6.8, letting that pH go down to a value of 6.0 and then controlling the pH at that value. Under this condition, the highest values for all the variables (isobutanol titer, productivity and yield) are reached.

The evolution with time of pH, biomass and isobutanol concentrations can be followed in Fig. 4. Analyzing the evolution with time, the same conclusions are reached: the control of the pH at the initial value (6.8) does not provide the best results, the results are better when the pH is controlled at lower values. The best profiles for both, biomass growth and isobutanol production, are reached when the pH is controlled at a value of 6.0.

The effect of the pH strategy on carbon flux distribution is shown in Fig. 5. It can be observed that pH does not show a high influence on the product distribution, but the best yield is obtained when pH is controlled and the free evolution reached a value of 6.0.

Finally, Fig. 6 represents the specific productivity as a function of both oxygen availability and the different strategies of pH control previously described. Regarding the influence of the pH strategy, Fig. 6 reinforces the observation of 6.0 being the best value to perform the isobutanol production by *S. blattae* (p424lbPSO).

On the other hand, also in Fig. 6, it can be observed that although isobutanol production is higher as the oxygen availability in the vessel grows higher (as shown in Fig. 2B), the cells obtained for values of A (% of air inside the bottle) from 70% to 83% are the best isobutanol producers, showing a decrease of the specific productivity at higher values of A. This observation points out that maybe there is an optimum value of oxygen consumption for isobutanol production by this strain.

4. Conclusions

S. blattae (p424lbPSO) strain is a good candidate to be used as an isobutanol producer from glucose. It is possible to reduce the yeast extract concentration up to a value of 1.5 g L^{-1} , showing good results for the isobutanol production rate. The use of medium M92X leads to higher yields than medium M9 and increases the production rate, highlighting the importance of pH in this bioprocess. The

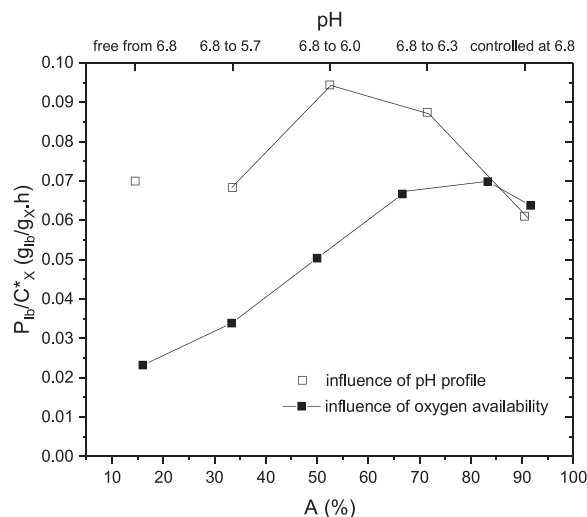


Fig. 6. Values of the specific productivity for the runs carried out under different conditions of oxygen availability (A) and pH strategies.

best pH strategy is to begin at a value of 6.8 and to control it when reaching a value of 6.0. Under the best conditions determined in this work, 11 g L^{-1} of isobutanol titer and about $0.286 \text{ g}_{lb} \text{ g}_{C_c}^{-1}$ of yield are obtained. Likewise, available oxygen concentration during fermentation is also an essential variable.

Acknowledgements

This work was supported by the MINECO under contract CTQ2013-45970-C2-1-R. Grant for MGA with reference BES-2014-068344 is gratefully recognized.

References

- [1] Y.-S. Jang, B. Kim, J.H. Shin, Y.J. Choi, S. Choi, C.W. Song, J. Lee, H.G. Park, S.Y. Lee, Bio-based production of C2–C6 platform chemicals, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 2437–2459.
- [2] A.I. Garcia, L.A. Garcia, M. Diaz, Fusel alcohols production in beer fermentation processes, *Process Biochem.* 29 (1994) 303–309.
- [3] S. Atsumi, J.C. Liao, Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 19 (2008) 414–419.
- [4] A.F. Cann, J.C. Liao, Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 89–98.
- [5] M.R. Connor, A.F. Cann, J.C. Liao, 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 1155–1164.
- [6] K.M. Smith, K.-M. Cho, J.C. Liao, Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 1045–1055.
- [7] C. Felpeto-Santero, A. Rojas, M. Tortajada, B. Galan, D. Ramon, J.L. Garcia, Engineering alternative isobutanol production platforms, *AMB Express* 5 (2015) 32.
- [8] S. Atsumi, Z. Li, J.C. Liao, Acetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as a 2-Ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol biosynthesis in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 6306–6311.
- [9] B. Blombach, B.J. Eikmanns, Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*, *Bioeng. Bugs* 2 (2011) 346–350.
- [10] S. Li, J. Wen, X. Jia, Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 577–589.
- [11] T. Kondo, H. Tezuka, J. Ishii, F. Matsuda, C. Ogino, A. Kondo, Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* 159 (2012) 32–37.
- [12] X. Chen, K.F. Nielsen, I. Borodina, M.C. Kielland-Brandt, K. Karhumaa, Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism, *Biotechnol. Biofuels* 4 (2011) 21.
- [13] S.H. Desai, C.A. Rabinovitch-Deere, Y. Tashiro, S. Atsumi, Isobutanol production from cellobiose in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 3727–3736.

- [14] A. Baez, K.-M. Cho, J.C. Liao, High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with in situ product removal, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011) 1681–1690.
- [15] J. Grimaldi, C.H. Collins, G. Belfort, Toward cell-free biofuel production: stable immobilization of oligomeric enzymes, *Biotechnol. Progr.* 30 (2014) 324–331.
- [16] S. Atsumi, T. Hanai, J.C. Liao, Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels, *Nature* 451 (2008) 86–90.
- [17] H. Su, J. Jiang, Q. Lu, Z. Zhao, T. Xie, H. Zhao, M. Wang, Engineering *Corynebacterium crenatum* to produce higher alcohols for biofuel using hydrolysates of duckweed (*Landoltia punctata*) as feedstock, *Microb. Cell Fact* 14 (2015) 16.
- [18] K. Lang, J. Zierow, K. Buehler, A. Schmid, Metabolic engineering of *Pseudomonas* sp strain VLB120 as platform biocatalyst for the production of isobutyric acid and other secondary metabolites, *Microb. Cell Fact* 13 (2014) 14.
- [19] W.H. Lee, S.O. Seo, Y.H. Bae, H. Nan, Y.S. Jin, J.H. Seo, Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35 (2012) 1467–1475.
- [20] E.A. Savrasova, A.D. Kivero, R.S. Shakulov, N.V. Stoynova, Use of the valine biosynthetic pathway to convert glucose into isobutanol, *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 38 (2011) 1287–1294.
- [21] F. Matsuda, T. Kondo, K. Ida, H. Tezuka, J. Ishii, A. Kondo, Construction of an artificial pathway for isobutanol biosynthesis in the cytosol of *saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 2139–2141.
- [22] J.L. Avalos, G.R. Fink, G. Stephanopoulos, Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 335–341.

Publicación 2

- **Autores:** Miguel G. Acedos, Pedro Yustos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.
- **Título:** Carbon flux distribution in the metabolism of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) for isobutanol production from glucose as function of oxygen availability.
- **Revista:** Journal of Chemical Technology and Biotechnology (2018) 94(3):850-858.
- **Índice de impacto** (2017): 2,587
- **Categoría:** Ingeniería Química (Q2), Biotecnología y Microbiología Aplicada (Q2), Ingeniería Ambiental (Q2), Química Multidisciplinar (Q2).
- **Enlace:** <https://doi.org/10.1002/jctb.5832>
- **Resumen:** En este trabajo se realiza el estudio de la distribución del flujo de carbono en función de la disponibilidad de oxígeno, en un biorreactor tipo tanque agitado, empleando glucosa como fuente de carbono y *S. blattae* (p424IbPSO) como biocatalizador. Este trabajo se motiva en las controversias encontradas en la literatura acerca del empleo de condiciones anaeróbicas o aeróbicas para la producción biotecnológica de isobutanol. Debido a que el isobutanol es un alcohol que se evapora con relativa facilidad, en primer lugar, se desarrolla un sistema de retención en la salida de gases del reactor. En estudios en “físico” se consigue retener un 94 % del isobutanol con trampas frías (-14°C) colocadas a la salida de gases del reactor. Posteriormente, se realizan cuatro experimentos en STBR, uno en condiciones limitantes de oxígeno y los otros tres en condiciones de aerobiosis, pero con diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (OTR), manteniendo el caudal de aire constante y variando la agitación (150, 400 y 600 rpm). Los resultados reflejan que en condiciones aeróbicas la producción de isobutanol es mínima y, que el metabolismo deriva el carbono a la producción de otros compuestos, entre ellos, ácido isobutírico, 2,3-butanodiona, acetoína, 2,3-butanodiol, 3-oxo-1-buten-2-il éter y acetil fosfato. La síntesis de algunos de estos compuestos no se había reportado hasta el momento en la literatura para este bioproceso. Por lo tanto, las condiciones limitantes de oxígeno o anaeróbicas son las óptimas para producir isobutanol, obteniendo alrededor de 12 g.L⁻¹ bajo estas condiciones. A pesar de ello, se demuestra que cierta cantidad de oxígeno es necesaria al menos para el crecimiento de la biomasa.

Carbon flux distribution in the metabolism of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) for isobutanol production from glucose as function of oxygen availability

Miguel G Acedos, Pedro Yustos, Victoria E Santos*  and Felix Garcia-Ochoa

Abstract

BACKGROUND: The carbon flux distribution in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) cultures when glucose is employed as carbon source is studied in a stirred tank bioreactor changing the oxygen availability. The strain has been constructed to produce isobutanol combining the branched-chain amino acids pathway and Ehrlich pathway. The information of many similar genetic modified strains for this bioprocess in the literature presents significant discrepancies on the oxygen influence.

RESULTS: The study carried out in this work pointed out the presence of other metabolites formed under aerobic conditions, such as isobutyric acid, 2,3-butanedione, acetoin, 2,3-butanediol and 3-oxo-1-buten-2-yl ether, not previously reported in the literature on the production of isobutanol with *S. blattae* (p424IbPSO) strain.

CONCLUSION: In this work the routes or the chemical reactions involved in the bioprocess as a function of the availability of oxygen are elucidated. Anaerobic conditions are the best for isobutanol production from glucose employing this strain; around 12 g L⁻¹ of isobutanol are obtained under these conditions. Aerobic conditions are not adequate to produce isobutanol, although the need for oxygen, at least for growth, is also demonstrated.

© 2018 Society of Chemical Industry

Keywords: isobutanol production; *Shimwellia blattae*; oxygen availability; carbon flux

INTRODUCTION

In recent years there has been a growing interest in obtaining biofuels from renewable sources.¹ The third-generation of biorefineries has become a relevant topic because they are an alternative to reducing the environmental impact by using residual biomass. The most abundant biomass residues are lignocellulosic wastes, which are renewable and can be employed to obtain fermentable sugars for the production of biofuels and other more value-added compounds.^{2–4}

More recently, bio-isobutanol has taken on importance in the biofuel field, because it is considered a good candidate to replace gasoline and bioethanol in the future.^{5,6} Isobutanol can also be used as a platform chemical to produce other chemicals of interest, including plasticizer agents.⁷

Considerable effort has been directed towards the creation of genetically modified microorganisms (GMO) for isobutanol production. Most of these GMO have in common the combination of branched-chain amino acid pathway and Ehrlich pathway, being 2-ketoisovalerate a precursor of isobutanol.^{8–17} Pioneers in the use of these synthetic pathways are Liao and co-workers, who introduced this type of metabolic pathway creating different isobutanol-producing strains of *Escherichia coli*.^{5,8} These synthetic pathways have been cloned not only in *E. coli*,^{4,10,18–25} but also in other GMO of different species, such as *Bacillus subtilis*,²⁶ *Corynebacterium glutamicum*,^{12,27} *Saccharomyces*

cerevisiae,^{13,14,28–32} *Clostridium cellulolyticum*,³³ and *Shimwellia blattae*.⁴ All these constructions have in common the use of the same or similar metabolic pathways, it being noticeable that the combination of anabolic and catabolic (Ehrlich pathway) pathways of branched-chain amino acids can cause some problems in the production of isobutanol, because this pathway is anaerobic but requires reduced co-factors to be active.^{25,34} These reduced co-factors are produced in greater quantities under aerobic conditions, while under anaerobic conditions an imbalance between oxidized and reduced co-factors (NAD⁺/NADH) would be produced. This imbalance leads to a reduction in both glucose uptake and production of isobutanol.

Escherichia coli JCL206 is a GMO multiple mutant strain used for the production of isobutanol with the above mentioned metabolic pathways. Working in fed-batch in a stirred tank bioreactor (STBR) under aerobic conditions with this strain a final isobutanol concentration of 50 g L⁻¹ has been reported.³⁵ In this last work, the dissolved oxygen concentration was maintained above 20% with

* Correspondence to: VE Santos, Department of Chemical & Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. E-mail: vesantos@ucm.es

Department of Chemical & Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, Madrid, Spain

respect to the saturation value by increasing the stirring speed. Nevertheless, in a more recent paper, under aerobic conditions, employing the same strain, *E. coli* JCL206 using glucose as carbon source, only around 1.5 g L^{-1} was obtained as maximum isobutanol concentration.³⁶ This discrepancy may be due to the fact that, in this last study, isobutanol is not retained, as commented on later. Other authors have used the GMO re-engineered strain *E. coli* H-81 for the production of isobutanol under aerobic conditions, and in this way about 6.30 g L^{-1} of isobutanol were achieved.³⁷ Several authors claim that oxygen is indispensable for the production of isobutanol, because when oxygen is available the imbalance NAD⁺/NADH is not detected.^{9,18,19,22}

If the bioprocess is carried out with bubbling air, isobutanol stripping can be a problem in the quantification of isobutanol. The need to accumulate high levels of this alcohol in the medium has led to performing the bioprocess under special conditions by using closed bottles, which provokes oxygen deprivation conditions.^{5,38} The strain *E. coli* JCL206 can produce about 7 g L^{-1} of isobutanol in sealed flasks, used to prevent isobutanol evaporation, but under these conditions the cultures suffer oxygen deprivation. Nevertheless, a yield around 86% of the theoretical maximum yield was reached with this strain employing a high glucose concentration and a long fermentation time.^{5,8,9}

In previous work,^{4,39} *S. blattae* (p424lbPSO) strain has been used as an isobutanol producer. In both studies, the runs were conducted in sealed flasks in order to prevent the evaporation of isobutanol. Thus, the bioprocess was carried out under limiting oxygen conditions, which are not the best conditions for bacterial growth and isobutanol production according to previous results.⁴ In the second study,³⁹ the air chamber into the sealed bottle was increased in different experiments, increasing the available oxygen. It has been shown that the greater the amount of air inside closed bottles, the higher the production of isobutanol; thus, greater amounts of available oxygen favored the production of isobutanol.³⁹

Some works have shown that under anaerobic conditions or when the production of isobutanol is carried out under oxygen deprivation conditions, the cofactor imbalance limited isobutanol production.² Furthermore, as suggested by Liao and coworkers,⁵ when limiting oxygen conditions are used, it is necessary to disrupt the coding of a number of genes for pyruvate degrading enzymes that are activated anaerobically. In spite of the fact that the oxygen is necessary for isobutanol production, some authors suggest that, for large-scale isobutanol production, anaerobic conditions would be preferred in order to lower operating costs and to obtain higher yields.²⁵ Nevertheless, these authors recognized that the engineering cofactor dependence can overcome a critical obstacle to next generation biofuel commercialization. They confirmed that limited isobutanol production obtained under anaerobic conditions was caused by cofactor imbalance in the engineered pathway. Several efforts have been made to re-engineer bacteria strains to obtain good isobutanol producers under anaerobic conditions.¹⁰

Therefore, it is clear that the production of isobutanol depends on oxygen supply conditions. Under aerobic conditions, a yield of $0.83 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{G}}^{-1}$ and an isobutanol titer of 4.88 g L^{-1} were reached with *E. coli* AS167³⁴; also, in that work, a yield of $0.62 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{G}}^{-1}$ and an isobutanol titer of 10.73 g L^{-1} were obtained with *E. coli* AS225 under aerobic conditions. The higher glucose uptake and the formation of by-products under aerobic conditions seems to decrease the final isobutanol yield but the titer is increased.

Isobutanol has also been produced under anaerobic conditions working under an operation mode named zero-growth by the

authors.^{12,40,41} These studies were carried out in two steps, an initial aerobic growth and then the cells, after centrifugation, were cultured in anaerobic conditions to produce isobutanol. About $1.21 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{x}}^{-1}$ were produced by *C. glutamicum* Iso7¹² and $1.21 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{x}}^{-1}$ were obtained with *C. glutamicum* IBU8.^{40,41} In a previous work,⁴² several experiments using resting cells under oxygen deprivation conditions were conducted obtaining $2.86 \text{ g}_{\text{ib}} \text{ g}_{\text{x}}^{-1}$. In this case, firstly an aerobic growth stage was carried out and then, in a second stage, isobutanol was produced by using resting cells (without adding any nitrogen source) under oxygen deprivation conditions.

Due to the controversies observed in the literature regarding the influence of oxygen supply on isobutanol production from different strains, the aim of this work is to elucidate the effect of oxygen availability on both the growth of *S. blattae* (p424lbPSO) and the carbon flux distribution when glucose is used as substrate.

EXPERIMENTAL

Bacteria strains and pre-culture procedure

The strains used in this work are *S. blattae* both the wild type (WT) and the recombinant strain transformed with the plasmid p424lbPSO carrying the isobutanol synthetic pathway⁴; both were supplied by the Environmental Biotechnology Laboratory of the Biological Research Center (CIB-CSIC, Spain). The plasmid construction has been described by Felpeto-Santero *et al.*⁴ The bacteria were conserved in 1 mL Eppendorf tubes at $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50% w/w glycerol/saline serum media prior to inoculation.

In all the cases, the inocula built-up was performed in two phases, pre-inoculum and inoculum, in order to obtain cells in the same metabolic state and to ensure reproducibility of the experimental data. These two phases were carried out in 250 mL flasks containing 50 mL of liquid media at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, in an orbital shaker at 250 rpm for 12 and 3 h, respectively, as described in a previous work.³⁹

M9-2x liquid minimal medium was employed in all the experiments, containing: 2 g L^{-1} of NH_4Cl , 6 g L^{-1} of KH_2PO_4 , 12 g L^{-1} of Na_2HPO_4 , 1 g L^{-1} of NaCl , 0.246 g L^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.011 g L^{-1} of CaCl_2 . This medium was supplemented with 1.5 g L^{-1} yeast extract, 50 g L^{-1} glucose as carbon source and 1 mL L^{-1} of a 1000 \times mixture of trace elements (containing per liter: 1.5 mg nitrile-tri-acetic acid, 3 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg NaCl , 0.1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 mg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mg $\text{KAl}[\text{SO}_4]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.01 mg H_3BO_3 , 0.01 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.025 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). For plasmid maintenance, streptomycin was added at 50 mg L^{-1} .

Experimental procedure and set-up

Experiments were carried out in a stirred tank bioreactor (STBR), BIostat B-PLIS (Sartorius AG, Göttingen, Germany). The above described culture medium M9-2x was employed in all runs.

The initial temperature of culture was $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, but after 2 h of growth the temperature was changed to $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1 mmol L^{-1} Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce the expression of genes encoding the isobutanol synthetic pathway. The initial pH was fixed at 6.8, decreasing with time during growth; when pH reached a value of 6.0, it was controlled by the addition of 2 mol L^{-1} NaOH.³⁹ The airflow rate was set at $1 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ from the beginning of the run and the stirrer speed was varied from 150 to 600 rpm in the different runs performed in aerobic conditions in order to change the oxygen transfer rate in

the process. In the run under limiting oxygen conditions, 600 rpm of stirrer speed was used in order to ensure good mixing; when IPTG was added to the broth, the STBR was closed; thus the oxygen available was only that inside the vessel at that time.

On the other hand, isobutanol evaporation is a well-known problem in this bioprocess for the quantitative analysis of this product when STBR and sparging aeration are used. To avoid this evaporation, an isobutanol retention system has to be employed. Three different retention systems were tested in this study: (i) an organic solvent trap (oleyl alcohol as organic solvent) in the gas outlet; (ii) an organic solvent (oleyl alcohol) added into the bioreactor as extracting agent; (iii) cold traps outside the bioreactor at $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, checking the use of one and two traps. For all of these systems pure isobutanol was fed into the water filled STBR using a peristaltic pump at a rate of 0.032 g min^{-1} , and air was bubbled at a flow rate of $1\text{ L L}^{-1}\text{ min}^{-1}$ using a stirrer speed of 600 rpm. Isobutanol was fed till reaching a concentration near 40 g L^{-1} in the water solution, trying to simulate a high production of isobutanol during the bioprocess.

Analysis methods

Biomass measurement

The biomass concentration was measured by optical density at 600 nm (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1603, Kyoto, Japan); cell dry mass (CDM, obtained by drying at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ until constant weight) and optical density were related by calibration according to the following equation:

$$\text{CDM} = 0.49 \cdot \text{OD}_{600} \quad (1)$$

Broth metabolites analysis

Samples were collected at several times from the STBR in the different experiments. Also very small liquid quantities were collected in the trap systems at the STBR outlet. All the samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) for detecting and measuring the metabolites present in the broth. Some of these samples, as indicated later on, were analyzed by means of other analytical techniques in order to identify all the compounds produced.

Analysis by HPLC-IR-DAD

Glucose, isobutanol and some by-products were determined by HPLC, employing an Agilent Technologies 1100 series equipment. A HPLC column Rezex ROA-Monosaccharide H+ (8%) ($300 \times 7.8\text{ mm}$, Phenomenex, Santa Clara, California, USA) was used, together with a Waters 2414 Refractive Index Detector (RID) and a Diode Array Detector (DAD) at 207 nm (Torrance, California, USA). The volume of sample injected was $5\text{ }\mu\text{L}$. The mobile phase used was $0.001\text{ mol L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$ at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} . The temperature of the column was maintained at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the RID temperature was $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analysis by LC-MS

To identify and quantify some unknown peaks detected by HPLC, a Bruker-type ion trap mass spectrometer (Esquire-LC) coupled to a HPLC was used (HCT ULTRA PTM Discovery System of Bruker, Bruker). The equipment has an electrospray interface (ESI) with orthogonal spray, and ion negative polarity. The mass range available was from 15 to $1000\text{ }\mu\text{m}$. A column Rezex ROA-Monosaccharide H+ (8%) column ($300 \times 7.8\text{ mm}$,

Table 1. Isobutanol retention results for the different methods checked. Data collected after 20 h adding isobutanol to a concentration estimated at 50 g L^{-1}

Restraint system	Retention (%)
Traps with oleyl alcohol, air by the top	59.0 ± 43.1
Traps with oleyl alcohol, bottom air	63.9 ± 3.5
Oleyl alcohol into the bioreactor (mixed with the culture medium)	81.0 ± 3.5
One cold trap $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$	94.1 ± 2.5
Two cold traps $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$	94.2 ± 2.4

Phenomenex, Billerica, Massachusetts, USA) was used under the following conditions: volume of sample injection $15\text{ }\mu\text{L}$, 0.001 mol L^{-1} acetic acid was used as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL min^{-1} and column temperature was maintained at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an oven.

Analysis by GC-MS

To identify and quantify some other unknown peaks a GC-MS technique was employed using a GC-2010 with a detector GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan). A Zebron ZB-WAX column of $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm ID} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ (100% Polyethylene Glycol) was used. Helium was used as carrier gas at a flowrate of 0.7 mL min^{-1} ; injector temperature was $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, detector temperature, $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, and oven temperature $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min and then increased at a rate of $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, to a final temperature of $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, which was maintained constant to the end of the analysis. The sample injected was $1\text{ }\mu\text{L}$ and the split ratio was 13.3:1 in all cases.

pH, dissolved oxygen and off-gas analysis

The pH was determined on line using a pH-sensor EasyFerm Plus K8 200 Hamilton (Bonaduz, Switzerland). The dissolved oxygen was measured on line using a polarographic sensor OxyFerm FDA Hamilton 160 (Switzerland). A combined oxygen and carbon dioxide sensor BioPAT[®] Xgas (Sartorius AG, Göttingen, Germany) was employed for analysis of the composition of the off-gas stream from the bioreactor.

EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

Experimental results on the retention device design

To test the different isobutanol retention systems several runs were performed as commented on previously (see Table 1). First, oleyl alcohol was used in an external trap, feeding the air from both the top and bottom of the vessel. Second, the use of oleyl alcohol as extracting agent was tested. Finally, the use of one and two cold traps at $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ was checked. Table 1 shows the results in terms of percentage of isobutanol retention. It can be observed that the use of oleyl alcohol is not a good technique to retain the isobutanol added. However, the use of cold traps yields good results and there is no significant difference in using one or two cold traps. It is necessary to point out that when the isobutanol concentration in the liquid medium is lower than 5 g L^{-1} , isobutanol is not stripped from the vessel in significant quantities, and therefore it is not detected in any trap.

Influence of oxygen availability in batch STBR

In a previous study,³⁹ carried out on sealed bottles using the strain *S. blattae* (p424IbPSO), different gas volumes inside the flasks were

Table 2. Experimental conditions (stirrer speed, air flow rate and strain) employed in the different runs

Run	N(rpm)	Air flow rate(vvm)	<i>S. blattae</i> strain
1	600	0	p424lbPSO
2	600	1	p424lbPSO
3	400	1	p424lbPSO
4	150	1	p424lbPSO
5	150	1	WT

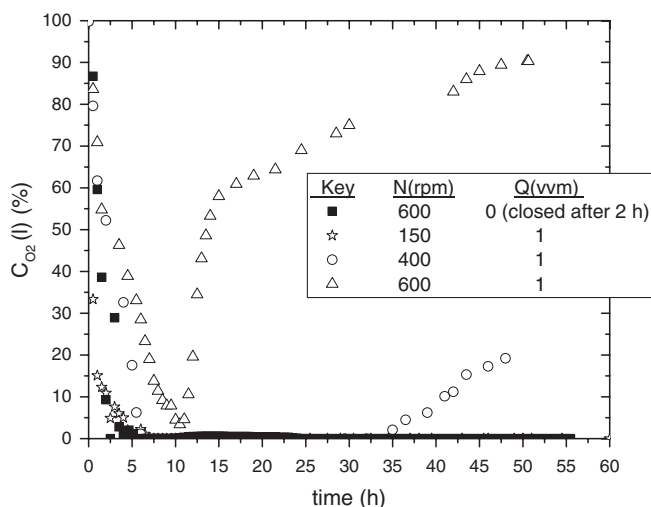


Figure 1. Dissolved oxygen profiles in the runs performed using the GMO strain *S. blattae* (p424lbPSO).

employed in order to change the available oxygen for the cultures. Acetic acid appeared as the main by-product in experiments with the largest air chamber; while lactic acid, ethanol and succinic acid appeared as the main by-products in experiments with smaller gas chambers, results according to those found previously.³⁹ It can also be observed that the higher the availability of oxygen the higher the production of isobutanol.

In the present work, the oxygen availability is studied taking into account the results obtained under the conditions tested in the previous work.³⁹ First of all, a run trying to simulate the conditions employed in the closed bottles³⁹ was conducted in the STBR. Afterwards, several runs changing the oxygen transfer rate conditions in the STBR were performed. Table 2 summarizes the conditions for the experiments carried out in this work and Fig. 1 presents the dissolved oxygen profile measured in each of these runs. As can be seen, the oxygen profiles are clearly different. It is important to point out that although the dissolved oxygen profiles for run 1 and 2 seem to be very close, the value of zero for DO concentration in run 1 means really that the oxygen available is null, because the vessel has previously been closed; whereas, in the case of run 2 (and run 3) the value of zero of DO concentration means that the oxygen uptake rate (OUR) is equal to the oxygen transfer rate (OTR); therefore the cells are consuming oxygen all the time and the oxygen availability is not null and very different from the case of run 1.

The influence of oxygen availability on the carbon flux distribution is shown in Fig. 2. In this figure the time course of the concentrations of biomass (Fig. 2(A)), glucose (Fig. 2(B)) and the expected metabolites: isobutanol (Fig. 2(C)), lactate (Fig. 2(D)),

acetate (Fig. 2(E)), ethanol (Fig. 2(F)), succinate (Fig. 2(G)) and carbon dioxide (Fig. 2(H)) are shown. The influence of the oxygen availability on both the growth and production of the different metabolites is clear. Growth is better (higher biomass concentration is obtained in the stationary growth phase, and growth rate is better) the higher the oxygen availability is (Fig. 2(A)). The glucose uptake rate is also higher the higher the oxygen transfer rate is (higher stirrer speed) but for the two highest values it seems to be similar (Fig. 2(B)). The isobutanol production (Fig. 2(C)), shows a clear influence of the oxygen available: the production is really high when the availability of oxygen is lowest; but when the process is carried out under aerobic conditions there is little production.

On the other hand, the influence on the production of other metabolites is also relevant. Lactate (Fig. 2(D)) is the main 'by-product' when the lower OTR is used and little is produced when no oxygen is available. Regarding acetate (Fig. 2(E)), oxygen availability favors its production. On the other hand, ethanol (Fig. 2(F)) is the more important 'by-product' obtained when no oxygen is available and its production seems to be more or less the same when the process is carried out under aerobic conditions, with no influence of the OTR value. Succinate (Fig. 2(G)) is produced under anaerobic or limiting oxygen conditions, but there is a higher production if there is a low OTR.

The carbon dioxide production (Fig. 2(H)), as expected, is higher as the OTR is increased. The data for run 1 have been calculated from a carbon mass balance because for this run there is no off-gas stream to be analyzed.

Figure 3 shows the carbon mass balance for the four runs commented on previously involving the known compounds from Fig. 2. It has to be pointed out that in run 1 carbon dioxide has not been considered because its analysis and quantification cannot be carried out. It is clear that, assuming a lack of carbon dioxide in run 1, it is the only run in which the carbon mass balance is close to being well balanced. This fact suggests that other compounds must be produced when aerobic conditions are employed, and that the production of other metabolites has not been detected till now. Figure 2 shows information regarding an important peak of an unknown compound (compound X of Fig. 2(I)) appearing in HPLC-DAD analysis that is observed only in the runs performed under aerobic conditions and its area is higher as the OTR is increased.

Identification of the metabolites

In order to identify the possible metabolites synthesized when aerobic conditions are employed different analytical techniques have been employed: HPLC-MS and GC-MS. Two samples from two different runs were analyzed in order to identify all the compounds formed. Sample S1 was obtained in a run carried out under oxygen deprivation conditions (run 1), and a second sample, S2, was obtained in a run conducted under aerobic conditions (run 4).

The physical characteristics of these samples were as follows: (i) sample S1 was an almost translucent liquid slightly yellowish; (ii) Sample S2 had a yellow-brown colour with a certain turbidity, and evolved to a browner colour with time.

Analysis by GC-mass spectroscopy

This analysis was performed to determine the structures of the new compounds present in the S2 sample in comparison with the S1 sample. All the peaks appearing in the GC-MS chromatograms for both samples, S1 and S2, were identified. Table 3 gives the

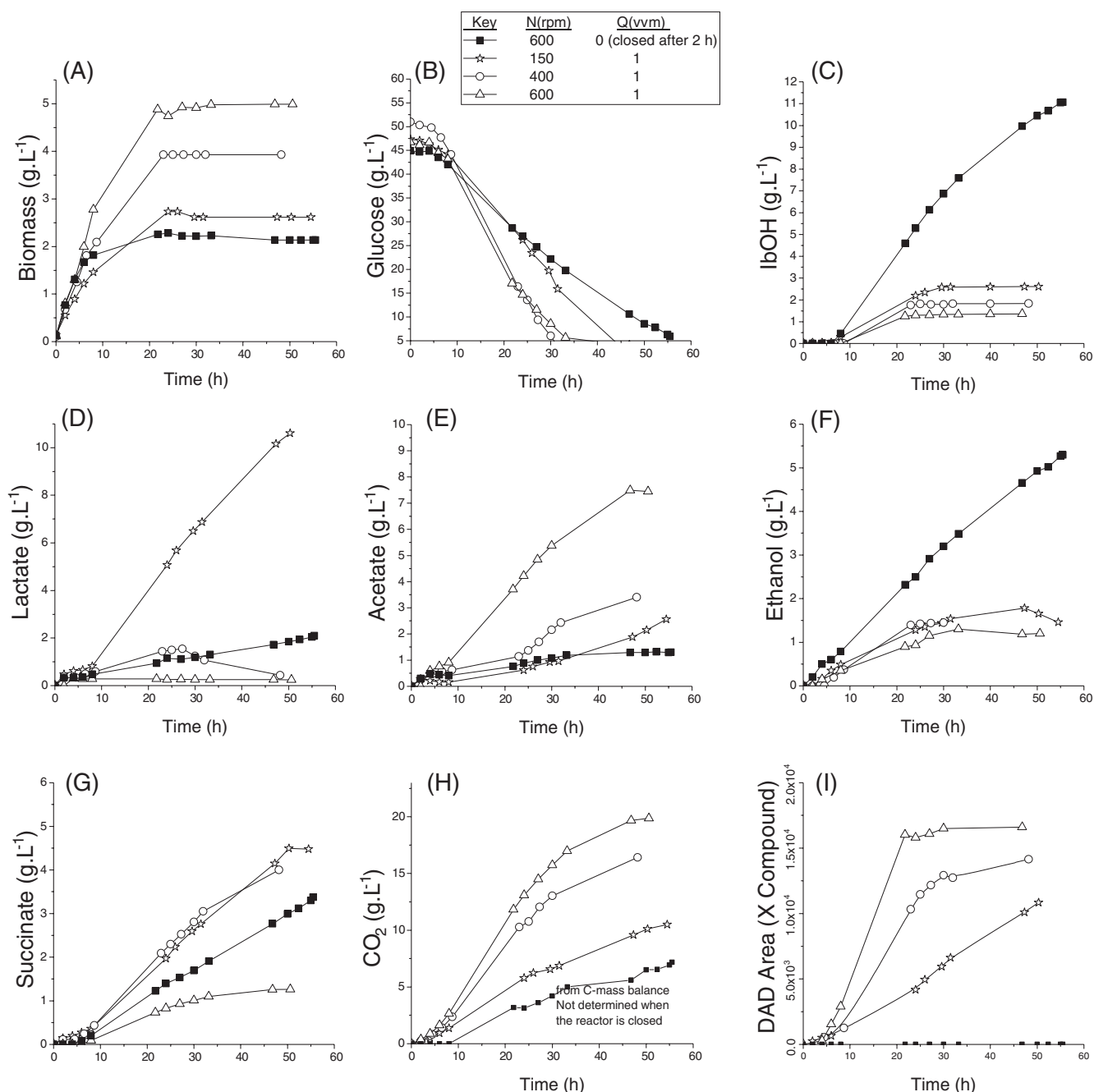


Figure 2. Experimental results of runs 1 to 4. Biomass, glucose and metabolite concentrations detected by HPLC-IR-DAD: (A) biomass; (B) glucose; (C) isobutanol; (D) lactate; (E) acetate; (F) ethanol; (G) succinate; (H) carbon dioxide (for run 1 has been calculated by carbon balance assuming that it is the only compound not detected by HPLC [it is not possible to measure it]); (I) unknown X-compound.

name of each identified compound using this technique. It can be pointed out that besides some compounds previously known for the routes taking place in *S. blattae* (p2421bPSO), cultures (4) are presented on a white background in that table; other compounds have been identified in sample S2, which had not previously been reported for this strain by Felpeto *et al.*⁴; these compounds are presented in the table on grey background, and were isobutyric acid, 2,3-butanedione, 2,3-butanediol and acetoin. Table 3 also shows the area of the chromatographic peaks and the concentrations (as ppm) for all the compounds. The values of the concentration of the compounds appearing in Table 3 were calculated by means of calibrations using pure compounds.

The compounds detected by means of this technique are not able to fit the carbon mass balance. Therefore, other compounds must be synthesized that are not detected by this analytical method.

Analysis by LC-mass spectroscopy

In order to detect and identify more compounds, particularly the 'compound X' detected by means of HPLC-DAD (Fig. 2(I)), another analysis was carried out using a Bruker-type ion trap mass spectrometer, Esquire-LC, coupled to a HPLC-MS for the same two samples S1 and S2. Figure 4(A), (B) show the results for analysis by LC-MS of these samples. All the peaks presented in both

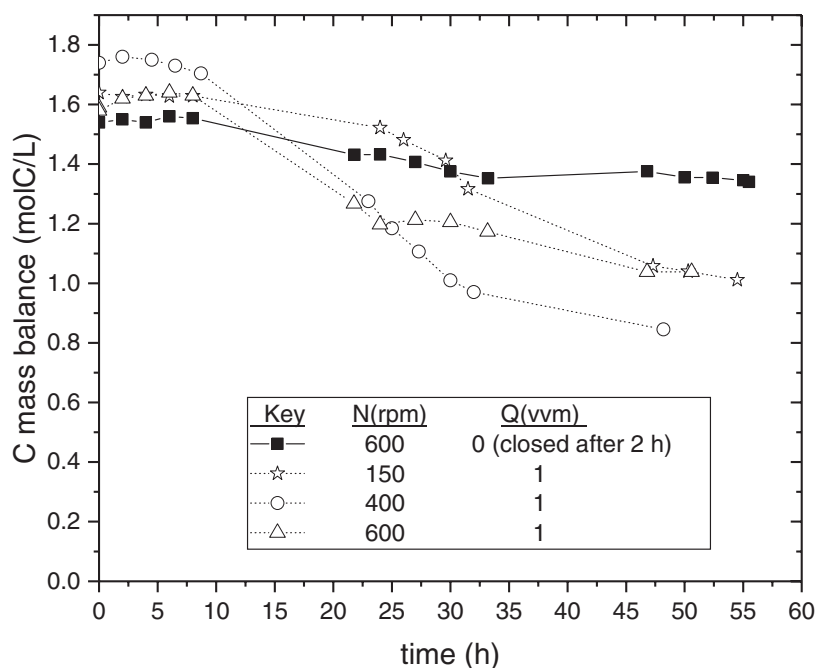


Figure 3. Carbon mass balance taking into account the known compounds in Fig. 2: biomass, glucose, isobutanol, lactate, acetate, ethanol, succinate and carbon dioxide, except in the balance of run without air flow, where carbon dioxide has not been considered because it has not been measured.

Table 3. GC–MS chromatographic results for samples S1 (run 1) and S2 (run 4): peak areas and concentration (ppm) of the identified compounds (concentrations were determined by means of calibration using pure compounds)

Compound	Sample S1		Sample S2	
	Peak area ($\times 10^{-4}$)	Concentration (ppm)	Peak area ($\times 10^{-4}$)	Concentration (ppm)
Ethanol	173.2	1522	18.0	<50
Isobutanol	484.2	4956	48.5	899
Acetic acid or ammonium acetate	125.2	nm	988.2	nm
Isobutyraldehyde	8.3	<5	nd	nd
Isobutyric acid	26.8	533	413.6	5127
2,3-Butadione	0.24	<10	33.4	1125
2,3-Butanediol	25.5	483	86.2	1259
3-Hydroxy-2-Butanone (acetoin)	294.6	1591	428.9	4405

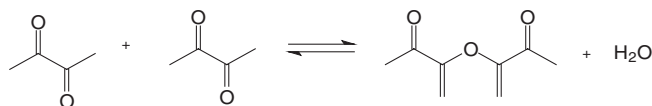
nd, no detected.

nm, no measured, acetic acid is not quantifiable by GC–MS.

Grey background: compounds not reported by other authors in cultures of *S. blattae* (p4241bPSO).

chromatograms have previously been identified by HPLC-IR-DAD and GC–MS; but there are two peaks in Fig. 4(A) (sample S2, aerobic conditions) not presented in Fig. 4(B) (sample S1, no aerobic conditions). The Peak 2 from Fig. 4(A) has not previously been observed in any analytical method employed; but peak 1 appears at the same elution time as the X-compound detected by HPLC-DAD. Figure 4(C) shows the mass spectrum of the compound corresponding to peak 1 (sample S2) using this analytical method, and the prominent ions detected were 59, 115 and 153 $m z^{-1}$: the last ion, corresponding to a $[M-H]^{-}$ of the peak 1 compound, which confirms that his peak corresponds to a compound with 154 $g mol^{-1}$ molar weight. As can be seen in Fig. 4(A), the other unknown compound, named as peak 2 has a $[M-H]^{-}$ ion corresponding to a compound with a molecular weight of 138 $g mol^{-1}$. The mass spectrum of peak 2 is shown in Fig. 4(D). It is possible that this compound is acetyl phosphate, an intermediary of the synthesis route of acetic acid.

The compound (X-Compound) with molecular mass 154 $g mol^{-1}$ (Peak 1 from sample S2), that presents a high area, would correspond to the condensation product of two molecules of 2,3-butanedione through keto-enolic tautomerism, forming 3-oxo-1-buten-2-yl ether that would affect one of the carbonyl groups, which could be formed according to:



This reaction can take place due to the acidity of the hydrogen atoms in position α with respect to the carbonyl group, although the equilibrium is shifted towards the keto form, the presence of NaOH in the reaction medium could favour the formation of the enol form.

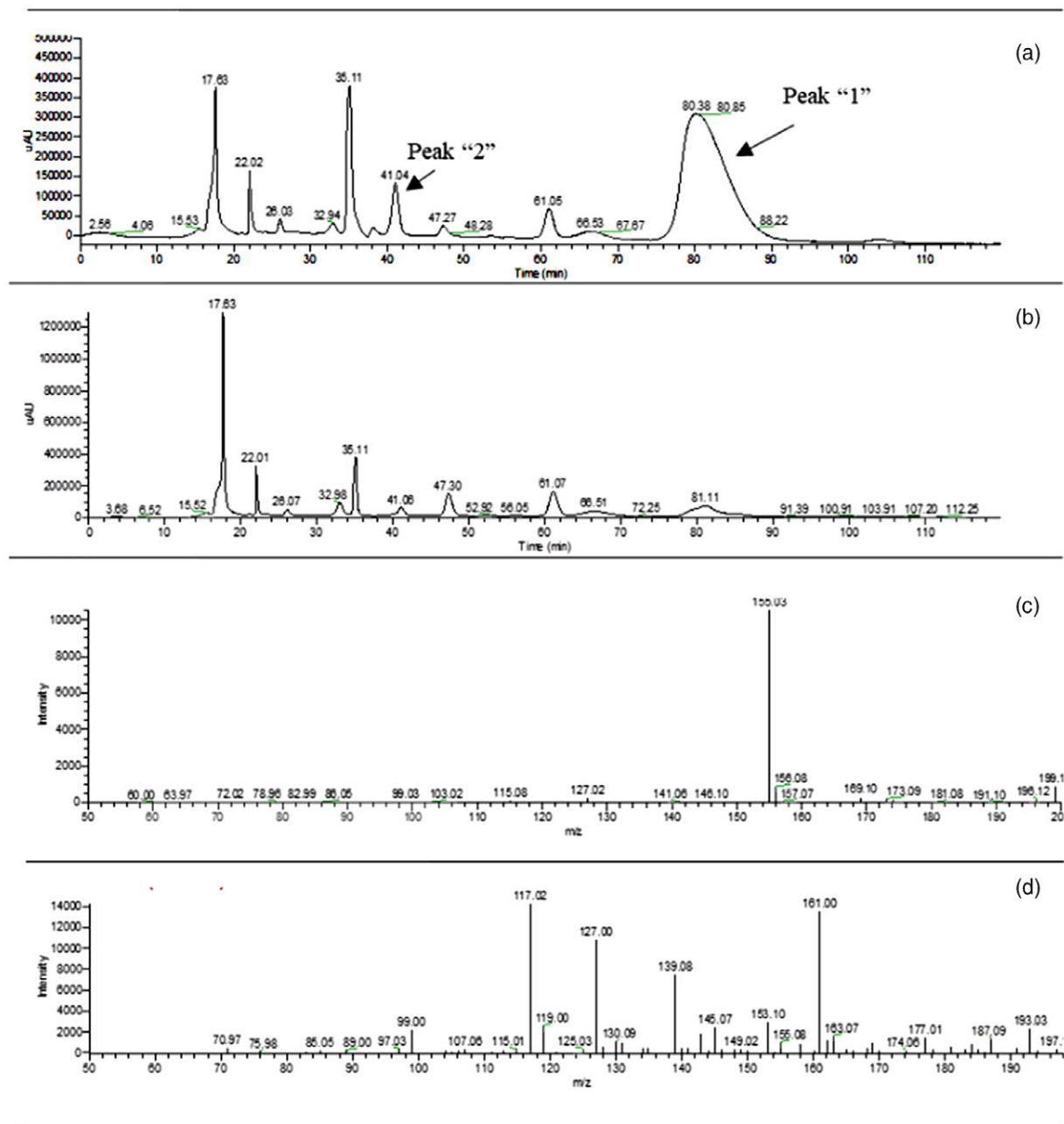


Figure 4. Chromatograms obtained by LC–MS for samples S2 (A) and S1 (B), and the mass spectrum corresponding to peak 1 (C) and peak 2 (D), from the sample S2 obtained under aerobic conditions.

Possible chemical reactions among the metabolites

Taking into account that some products formed in the runs performed under aerobic conditions could react with others also present in the broth or with themselves under the operational conditions, and also considering that there are in the broth potential catalysts (e.g. 2 mol L⁻¹ NaOH used for pH control); some experiments were carried out to check these possibilities. These runs were conducted using pure compounds, checking the possible reaction between 2 mol L⁻¹ NaOH and the following compounds: acetic acid, lactic acid, succinic acid, ethanol, isobutanol, 2,3-butanediol, 2,3-butanedione (diacetyl) and 2-hydroxy-3-butanone (acetoin). Only one of these compounds yielded an appreciable extension of a chemical reaction with NaOH; this compound was diacetyl (2,3-butanedione). In addition,

the analysis by HPLC-DAD at 207 nm of a sample from this reaction shows the presence of a peak at a similar retention time and presenting a similar spectrum to that from peak 1 of the S2 sample previously noted. The reaction media also quickly changed its color into strong dark yellow, which could be a response to the 154 g mol⁻¹ compound as described above. Therefore, this compound is produced by means of a chemical catalyzed reaction within the liquid medium.

Proposed metabolic scheme for *S. blattae* (p424IbPSO) producing isobutanol

The results from the different runs carried out in this work have shown the carbon flux to be distributed through different ways depending on the availability of oxygen and/or the expression

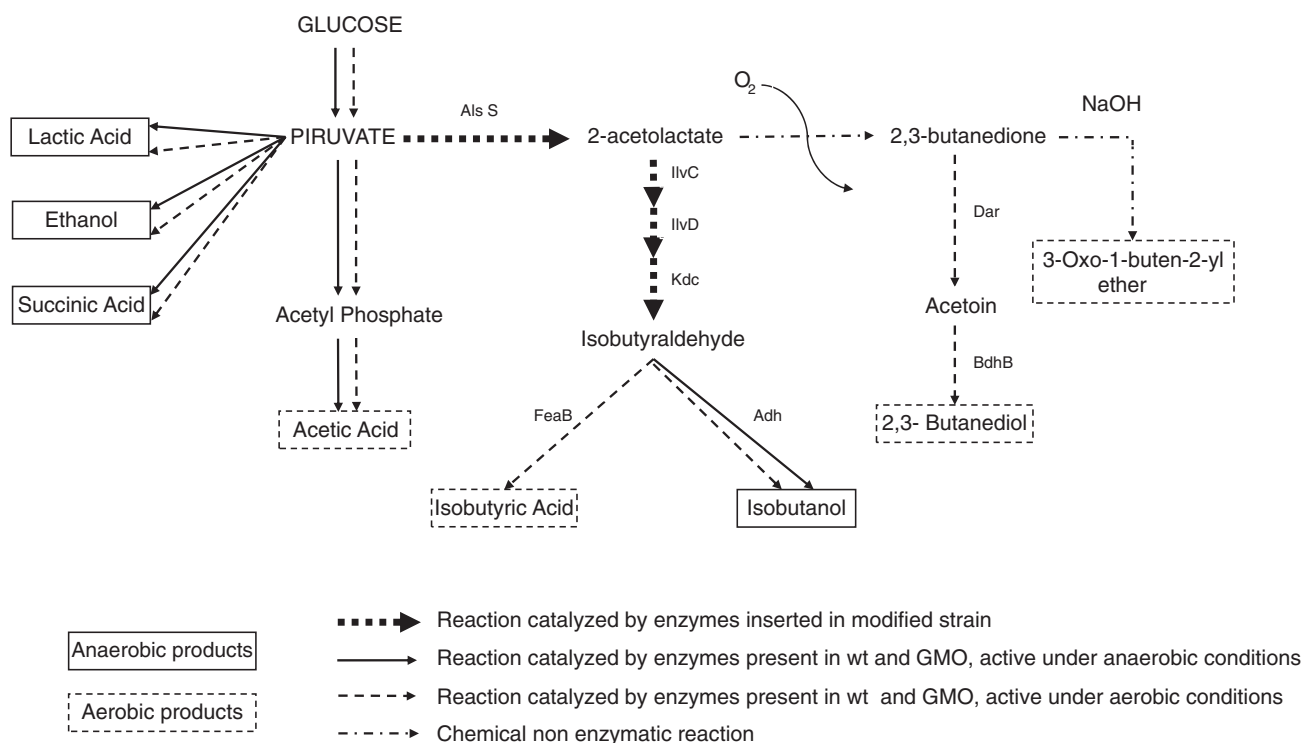


Figure 5. Proposed metabolic scheme of the routes for *S. blattae* (p424IbPSO) as a function of the oxygen availability.

of some enzymes. In order to determine the capacity to produce some of the metabolites identified for the GMO by the wild type strain, a run employing that strain was carried out under the conditions detailed in Table 2 (run 5). In this run 5, carried out under aerobic conditions, the characteristic peak 1 (X-compound), observed in all the runs performed under aerobic conditions but using the GMO, does not appear when the run is carried out using the wild type strain. Therefore, this is further data supporting the hypothesis that the 154 g mol^{-1} compound comes from compounds obtained from the metabolic pathway inserted in the GMO (aldolic condensation of diacetyl, produced by chemical oxidation of 2-acetolactate).

Figure 5 attempts to formulate a proposal of a simplified metabolic/chemical reaction scheme from the results of the different runs performed in this work. In this figure the enzymes involved in the reactions producing the different metabolites identified in this work are shown. It also points out the deviation of the carbon flux when aerobic conditions are used and the combination of chemical and enzymatic reactions when oxygen is available in the broth.

Therefore, when no oxygen is available, the carbon flux goes through the reactions catalyzed by the enzymes inserted in the strain and the 'anaerobic' enzymatic reactions existing in the wild type strain, yielding the following metabolites detected in the broth: isobutanol, ethanol, and lactic, acetic and succinic acids. However, when aerobic conditions are employed, the compounds detected are the same ones quoted for the anaerobic conditions (but at different concentrations, i.e., those reactions change their rates depending on the oxygen availability) and the compounds produced only under aerobic conditions from a combination of enzymatic (isobutyric acid, acetoin and 2,3-butanediol) and chemical reactions (2,3-butanedione and 3-oxo-1-buten-2-yl ether). The production of some metabolites is possible due to the presence

of the genes encoding the enzymes in the wild type strain (information obtained from the data base GenBank of NCBI^{43,44}): BdhB, NADH-dependent butanol dehydrogenase B (2,3-butanediol), Dar, diacetyl reductase (acetoin); Adh, alcohol dehydrogenase (ethanol and isobutanol) and FeaB, phenyl-acetaldehyde dehydrogenase (isobutyric acid).

CONCLUSIONS

Shimwellia blattae (p424IbPSO) is able to produce isobutanol from glucose together with other metabolites such as ethanol, and organic acids (acetic, succinic and lactic acids). The carbon flux of glucose in this strain dramatically changes depending on the oxygen availability. A metabolic scheme of the routes for *S. blattae* (p424IbPSO) as function of the oxygen availability is proposed. Under aerobic conditions isobutanol production is low and, if OTR-OUR are high, other compounds are formed. The presence of chemical non-enzymatic reactions yielding 2,3-butanedione, its dimeric form, and probably acetyl phosphate has been probed, reducing isobutanol yield. Moreover, when aerobic conditions are used, other endogenous metabolic pathways are active and produce other metabolites like isobutyric acid, reducing the isobutanol yield. The production of all these metabolites is also observed by a clear change in the color of the culture broth. The isobutanol production by means of this modified strain is better when very low oxygen is available in the culture broth, but oxygen is needed for growth.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by MINECO under contract CTQ2013-45970-C2-1-R. The grant for one of the authors (MGA) with reference BES-2014-068344 is gratefully recognized.

REFERENCES

- Fava F, Ohtake H and Pesaresi P, Biotechnology for a more sustainable environment decontamination and energy production. *J Biotechnol* **157**:443–445 (2012).
- Desai SH, Rabinovitch-Deere CA, Fan ZL and Atsumi S, Isobutanol production from cellobionic acid in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **14**:1–10 (2015).
- Desai SH, Rabinovitch-Deere CA, Tashiro Y and Atsumi S, Isobutanol production from cellobiose in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:3727–3736 (2014).
- Felpeto-Santero C, Rojas A, Tortajada M, Galan B, Ramon D and Garcia JL, Engineering alternative isobutanol production platforms. *AMB Express* **5**:1–9 (2015).
- Atsumi S, Hanai T and Liao JC, Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451**:86–89 (2008).
- Tao L, Tan ECD, McCormick R, Zhang M, Aden A, He X *et al.*, Techno-economic analysis and life-cycle assessment of cellulosic isobutanol and comparison with cellulosic ethanol and n-butanol. *Biofuels Bioprod Biorefin* **8**:30–48 (2014).
- Jang Y-S, Kim B, Shin JH, Choi YJ, Choi S, Song CW *et al.*, Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnol Bioeng* **109**:2437–2459 (2012).
- Atsumi S and Liao JC, Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **19**:414–419 (2008).
- Atsumi S, Wu T-Y, Eckl E-M, Hawkins SD, Buelter T and Liao JC, Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:651–657 (2010).
- Trinh CT, Li J, Blanch HW and Clark DS, Redesigning *Escherichia coli* metabolism for anaerobic production of isobutanol. *Appl Environ Microbiol* **77**:4894–4904 (2011).
- Blombach B and Eikmanns BJ, Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioengineered Bugs* **2**:346–350 (2011).
- Blombach B, Riester T, Wieschalka S, Ziert C, Youn J-W, Wendisch VF *et al.*, *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl Environ Microbiol* **77**:3300–3310 (2011).
- Matsuda F, Ishii J, Kondo T, Ida K, Tezuka H and Kondo A, Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb Cell Fact* **12**:1–11 (2013).
- Chen X, Nielsen KF, Borodina I, Kielland-Brandt MC and Karhumaa K, Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnol Biofuels* **4**:1–12 (2011).
- Jia XQ, Li SS, Xie S and Wen JP, Engineering a metabolic pathway for isobutanol biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotechnol* **168**:1–9 (2012).
- Lee WH, Seo SO, Bae YH, Nan H, Jin YS and Seo JH, Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**:1467–1475 (2012).
- Avalos JL, Fink GR and Stephanopoulos G, Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat Biotechnol* **31**:335–341 (2013).
- Atsumi S, Li Z and Liao JC, Acetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as a 2-ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **75**:6306–6311 (2009).
- Yan Y and Liao JC, Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:471–479 (2009).
- Connor MR and Liao JC, Microbial production of advanced transportation fuels in non-natural hosts. *Curr Opin Biotechnol* **20**:307–315 (2009).
- Connor MR, Cann AF and Liao JC, 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:1155–1164 (2010).
- Connor MR and Liao JC, Engineering of an *Escherichia coli* strain for the production of 3-Methyl-1-butanol. *Appl Environ Microbiol* **74**:5769–5775 (2008).
- Gronenberg LS, Marcheschi RJ and Liao JC, Next generation biofuel engineering in prokaryotes. *Curr Opin Chem Biol* **17**:462–471 (2013).
- Smith KM and Liao JC, An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **13**:674–681 (2011).
- Bastian S, Liu X, Meyerowitz JT, Snow CD, Chen MMY and Arnold FH, Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **13**:345–352 (2011).
- Li S, Wen J and Jia X, Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**:577–589 (2011).
- Smith KM, Cho K-M and Liao JC, Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:1045–1055 (2010).
- Kondo T, Tezuka H, Ishii J, Matsuda F, Ogino C and Kondo A, Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **159**:32–37 (2012).
- Park S-H, Kim S and Hahn J-S, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:9139–9147 (2014).
- Li X, Yang R, Ma M, Wang X, Tang J, Zhao X *et al.*, A novel aldehyde reductase encoded by YML131W from *Saccharomyces cerevisiae* confers tolerance to furfural derived from lignocellulosic biomass conversion. *Bioenergy Res* **8**:119–129 (2015).
- Ida K, Ishii J, Matsuda F, Kondo T and Kondo A, Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **14**:1–9 (2015).
- Matsuda F, Kondo T, Ida K, Tezuka H, Ishii J and Kondo A, Construction of an artificial pathway for isobutanol biosynthesis in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Biochem* **76**:2139–2141 (2012).
- Higashide W, Li Y, Yang Y and Liao JC, Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. *Appl Environ Microbiol* **77**:2727–2733 (2012).
- Shi A, Zhu X, Lu J, Zhang X and Ma Y, Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production. *Metab Eng* **16**:1–10 (2013).
- Baez A, Cho K-M and Liao JC, High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with *in situ* product removal. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**:1681–1690 (2011).
- Xiao Y, Feng X, Varman AM, He L, Yu H and Tang YJ, Kinetic modeling and isotopic investigation of isobutanol fermentation by two engineered *Escherichia coli* strains. *Ind Eng Chem Res* **51**:15855–15863 (2012).
- Savrasova EA, Kivero AD, Shakulov RS and Stoyanova NV, Use of the valine biosynthetic pathway to convert glucose into isobutanol. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:1287–1294 (2011).
- Minty JJ, Lesnfsky AA, Lin F, Chen Y, Zaroff TA, Veloso AB *et al.*, Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **10**:1–38 (2011).
- Acedos MG, Ramon A, de la Morena S, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): study of the operational conditions. *Biochem Eng J* **133**:21–27 (2018).
- Yamamoto S, Suda M, Niimi S, Inui M and Yukawa H, Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol Bioeng* **110**:2938–2948 (2013).
- Lange J, Takors R and Blombach B, Zero-growth bioprocesses: a challenge for microbial production strains and bioprocess engineering. *Eng Life Sci* **17**:27–35 (2017).
- Acedos MG, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Resting cells isobutanol production by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): influence of growth culture conditions. *Biotechnol Progr* **34**:1073–1080 (2018).
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J and Wheeler DL, GenBank. *Nucleic Acids Res* **33**:D34–D38 (2005).
- Coordinators NR, Database resources of the National Center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* **44**:D7–D19 (2016).

Publicación 3

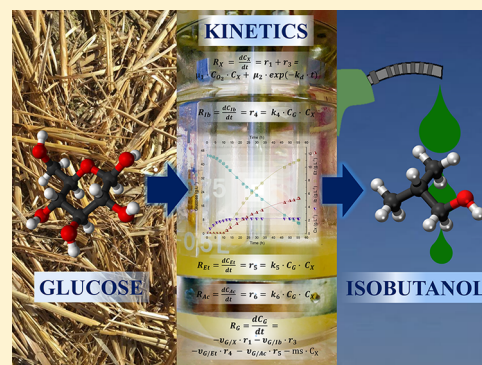
- **Autores:** Miguel G. Acedos, Isabel de la Torre, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.
- **Título:** Kinetic modelling of the isobutanol production from glucose using *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) strain: effect of initial substrate concentration.
- **Revista:** Industrial & Chemical Engineering Research (2019), 58 (4): 1502-1512.
- **Índice de impacto** (2017): 3,141
- **Categoría:** Ingeniería Química (Q1).
- **Enlace:** <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.8b05121>
- **Resumen:** El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto de la concentración inicial de glucosa, como sustrato carbonado, para la producción de isobutanol con *S. blattae* (p424IbPSO) en las condiciones de operación óptimas determinadas previamente. Se llevan a cabo cinco experimentos con concentraciones iniciales crecientes de glucosa (30, 40, 45, 50 y 70 g.L⁻¹). Los mayores valores de rendimiento, productividad y selectividad se obtienen con una concentración inicial de glucosa de 45 g.L⁻¹. A partir de dicha concentración de glucosa, un aumento de la misma produce inhibición en la producción de isobutanol por *S. blattae* (p424IbPSO). Además, en este trabajo se propone un modelo cinético no estructurado y no segregado para describir la velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo de glucosa y la velocidad de producción de isobutanol, etanol y otros metabolitos. El modelo cinético propuesto en este trabajo se ajusta con gran exactitud a los datos experimentales, y los parámetros cinéticos calculados presentan la relación entre la concentración inicial de glucosa y su efecto en la velocidad de producción de los diferentes metabolitos y en la velocidad de consumo de glucosa. No es así en el caso de la biomasa, que parece tener más dependencia de la cantidad de oxígeno disponible, y no está influenciada por la concentración inicial de glucosa, al menos en las concentraciones iniciales de glucosa estudiadas. El modelo cinético propuesto cumple con los criterios estadísticos, lo cual refuerza la idea de idoneidad de dicho modelo cinético.

Kinetic Modeling of the Isobutanol Production from Glucose Using *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) Strain: Effect of Initial Substrate Concentration

Miguel G. Acedos, Isabel de la Torre, Victoria E. Santos, and Felix Garcia-Ochoa*[✉]

Chemical & Materials Engineering Department, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ABSTRACT: Isobutanol production from glucose using *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) has been studied. Experiments were carried out under conditions previously determined: medium M92X, in a stirred tank bioreactor closed after 2 h. Growth was carried out under aerobic conditions, and the production occurred under anaerobic conditions. Five runs were conducted employing different initial substrate concentrations, between 30 and 70 g·L⁻¹. A kinetic model is proposed describing growth rate, metabolite production rates (isobutanol, ethanol, and organic acids), and glucose consumption rate. The kinetic model fits very well all the experimental data, and the kinetic parameter values calculated are consistent with the initial glucose concentration employed in each run. Both substrate (glucose) and product (isobutanol) inhibition are evident. Biomass growth rate depends on oxygen availability but is not influenced by glucose concentration in the interval studied. Maximum yield and productivity on isobutanol are reached in the experiment carried out employing 45 g·L⁻¹ as the initial glucose concentration.



1. INTRODUCTION

New alternatives to fossil fuels with better properties than bioethanol have been driving numerous studies in recent years.^{1,2} Isobutanol is an alcohol that can be used as an additive in gasolines, improving its properties, and can also be a potential substitute used directly as fuel.^{1,3} Other authors have shown the comparison of different characteristics among gasoline (fossil fuel) and three biofuels (*n*-butanol, isobutanol, and ethanol).⁴ According to this comparison, isobutanol has higher energy density than ethanol, higher octane number than the other fuels, and lower boiling point than *n*-butanol and gasoline, among other properties. However, the minimum selling price of isobutanol is higher than the selling price of ethanol.⁴ Moreover, isobutanol can also be used as chemical platform to produce plasticizer agents, among other compounds.⁵

On the other hand, the low yields and lower productivity of the isobutanol bioprocess, as well as the process costs, can affect economic feasibility. Due to these facts, several authors have built genetically modified strains (GMO) which are high producers of isobutanol from glucose using diverse strategies,^{6–11} but all of them use non-native metabolic pathways through 2-keto acid precursors. Several GMO have been used, such as *Escherichia coli*,^{3,6,11–19} *Bacillus subtilis*,^{20–22} *Corynebacterium glutamicum*,^{23–26} *Sacharomyces cerevisiae*,^{10,27–31} *Clostridium cellulolyticum*,^{32,33} and *Shimwellia blattae*.³⁴

Shimwellia blattae (p424IbPSO) has been used in previous works for isobutanol production,^{34–36} where the medium composition and the operational conditions were studied. In the first work,³⁵ the culture medium and operational

conditions were optimized. The optimal culture medium was M92X (minimal salts medium). The best strategy of pH was determined as free evolution from an initial pH 6.8—and then controlled at 6.0. It has been demonstrated that isobutanol can be produced by resting cells;³⁶ the optimal operating conditions of growth phase and cell collection time that maximize isobutanol production with resting cells were determined.³⁶ About 60% attainment of the theoretical maximum yield was obtained with resting cell cultures. Following this, the influence of oxygen availability was studied,³⁷ and the existence of hydrodynamics and the effect of excess of oxygen availability were analyzed.³⁸ In these works, it has been proved that a low oxygen concentration in the broth yields more isobutanol. Under strong aerobic conditions, the carbon flux yields other metabolites, reducing the amount of isobutanol produced. In addition, it has been proven that the growth rate is affected when high stirring speeds are employed (>1000 rpm). Above 800 rpm, the cell viability decreased and cell damage was observed; not only hydrodynamic stress was observed in this study, but also the effects of oxygen transfer or uptake rates were pointed out.³⁸ For large stirring speeds, higher concentrations of acetic acid, CO₂, and other compounds with high oxidation degree were obtained; at low stirring speeds, the concentrations of ethanol, lactic acid, and isobutanol were higher.³⁸

Received: October 16, 2018

Revised: December 30, 2018

Accepted: January 3, 2019

Published: January 3, 2019

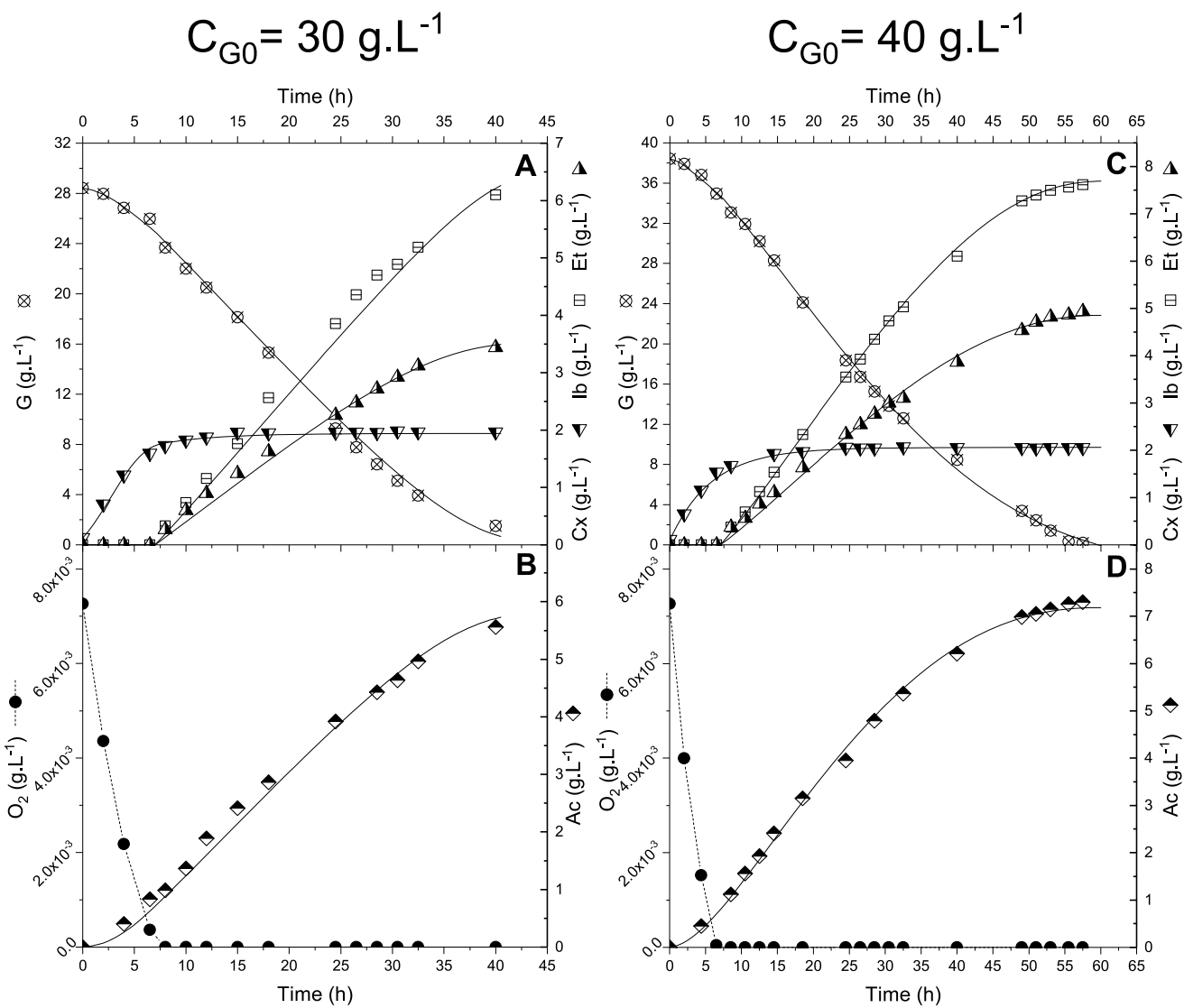


Figure 1. continued

$C_{G0} = 45 \text{ g.L}^{-1}$

$C_{G0} = 50 \text{ g.L}^{-1}$

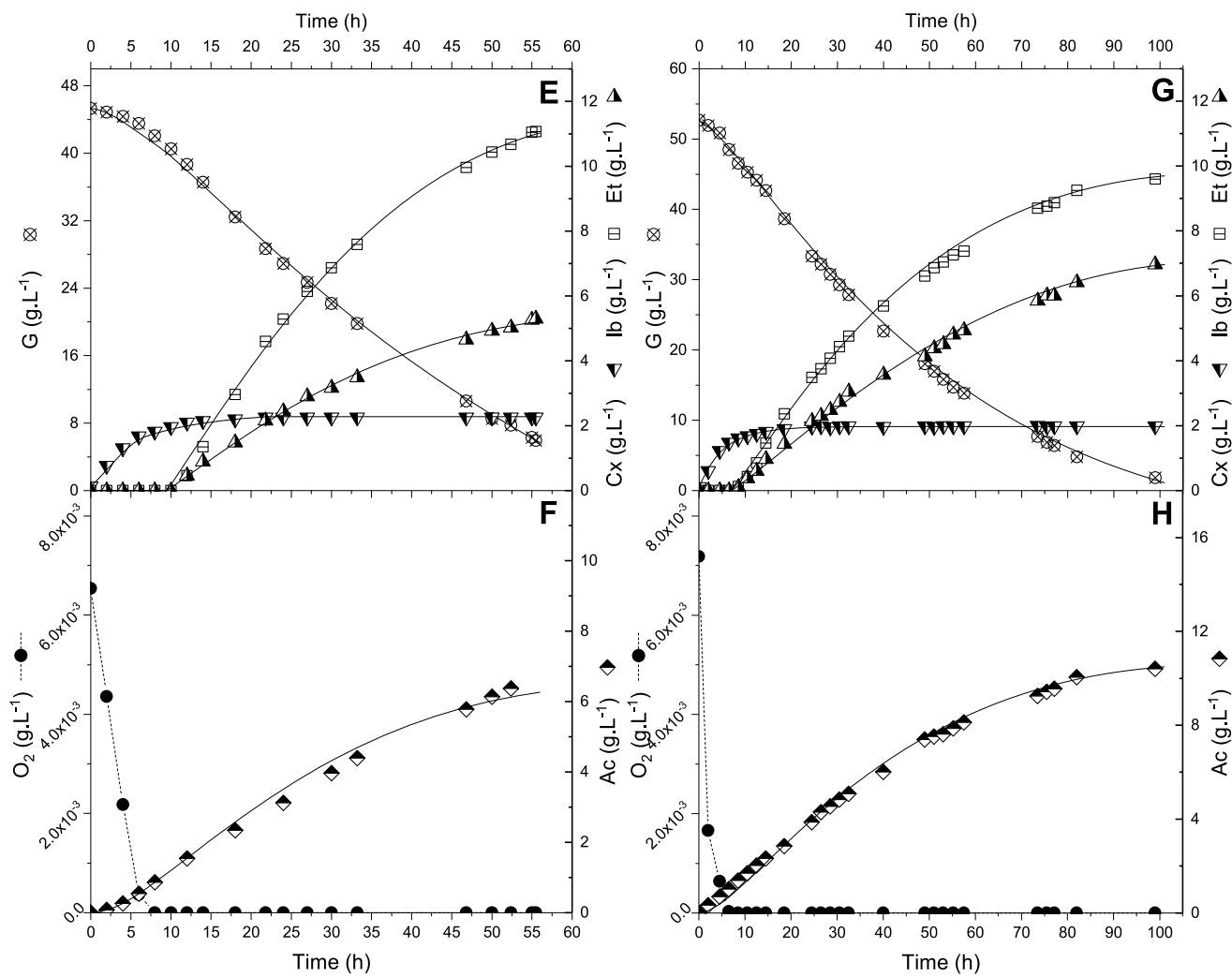


Figure 1. continued

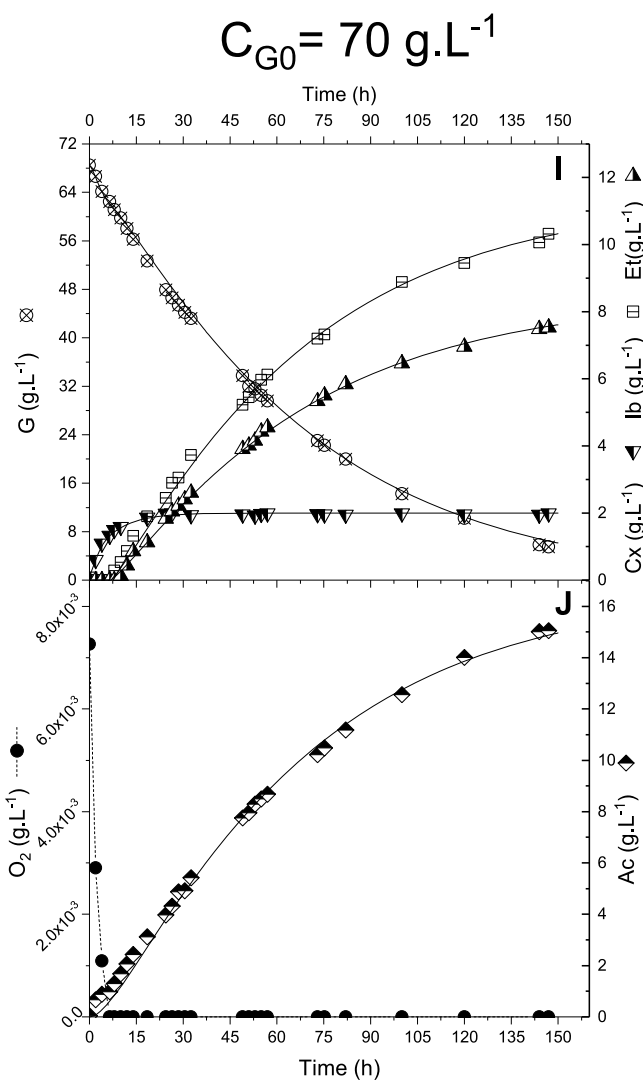


Figure 1. Experimental results (points) and kinetic model fitting (curves) of the substrate and metabolites for runs carried out using initial glucose concentrations of 30 (A and B), 40 (C and D), 45 (E and F), 50 (G and H), and $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I and J). Data point symbols: glucose (\otimes), biomass (∇), isobutanol (open square with horizontal bar), ethanol (\blacktriangle), dissolved oxygen (\bullet), and organic acids (diamond with solid top).

According to these previous works, the best systems to produce isobutanol with this strain are in closed recipients, including STBRs, in order to have a low dissolved oxygen concentration in the broth, which after some minutes is totally consumed. If higher concentration of dissolved oxygen is available, the carbon flux is diverted and other compounds are produced.³⁷ In order to avoid hydrodynamic stress, it has been determined that 600 rpm is the optimum stirring speed to use. Under these conditions, about $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ isobutanol and about 70% of the attainment theoretical maximum yield were achieved. The optimization of the concentration of carbon source, nitrogen source, and other nutrients represents one of the key stages in the evolution and the viability of this bioprocess.^{39–41} Also, the concentration of the substrate can have an effect on the carbon metabolic fluxes.⁴¹ As indicated above, the concentration of nitrogen source and the concentration of the other components of the culture medium for this bioprocess have been determined in previous works.^{35,36}

Kinetic models can provide plenty of information about the metabolism and can help in understanding the process.^{40,42} Furthermore, for the process development and the design and

scale-up of the bioreactor, it is necessary to formulate reliable kinetic models.⁴¹ As far as we know, there is only one kinetic model proposed for isobutanol production from glucose,⁴² but this model presents some incompatibilities and weaknesses.

The aim of this work is to formulate a kinetic model for this metabolic route. This model must be able to describe several experiments carried out under different conditions: in this case, runs performed with different initial substrate concentrations. In the present study, the effect of the initial glucose concentration as carbon source will be studied using batch conditions described in previous works by Acedos et al.^{35,36}

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Biocatalyst and Culture Medium. The micro-organism used in this study as biocatalyst is *S. blattae* (p424IbPSO).³⁵ The strain was provided by the Environmental Biotechnology Laboratory of the Biological Research Centre of Spain (CSIC).³⁴ The plasmid construction has been described in detail previously.³⁴ The biocatalyst was conserved in a 50% glycerol/saline serum solution at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

The medium used in the experiments was M92X according to Acedos et al.³⁵ The medium was supplemented with 1.5 g

L⁻¹ yeast extract and 1 mL·L⁻¹ 1000× mixture of trace elements described by Felpeto-Santero et al.³⁴ Streptomycin sulfate was used for plasmid maintenance (50 μg·mL⁻¹), and IPTG was used for plasmid induction (1 mM) according to Acedos et al.³⁵

For inoculation the medium was supplemented with 20 g·L⁻¹ glucose. The inoculum buildup was carried out in two stages in order to obtain cells in the same metabolic state and also to have a good reproducibility of the results. These steps were conducted in 250 mL conical flasks with 50 mL of culture medium. The inoculum buildup was performed at 37 °C and 250 rpm in an orbital shaker.

2.2. Experimental Procedure. The experiments of isobutanol production from glucose were conducted in an STBR, 1 L Biostat B-Plus (Sartorius AG Germany) with 0.4 L of working volume. The culture medium employed in these experiments was M92X described above, supplemented with glucose as carbon source. The initial concentration of glucose was varied between 30 and 70 g·L⁻¹. The runs were carried out at an initial temperature of 37 °C employing an agitation of 250 rpm. After 2 h of bacterial growth, the temperature was changed to 30 °C and IPTG (1 mM) was added to the broth to induce the plasmid expression according to Acedos et al.³⁵ At the same time, the bioreactor was closed, in order to prevent the isobutanol evaporation and to maintain a low oxygen availability, according to the optimal conditions previously determined.^{35,37} The initial pH value was 6.8, being maintained at a value of 6.0 by adding 2 M NaOH.³⁵

2.3. Analytical Methods. A spectrophotometer (Shimadzu UV–visible, Japan) was employed to determine the biomass concentration by optical density at 600 nm. The calibration curve was obtained by drying cells at 105 °C until constant weight and related to the optical density at 600 nm, according to eq 1:

$$\text{CDM (g·L}^{-1}\text{)} = 0.489 \text{OD}_{600} \quad (1)$$

A pH electrode, EasyFerm Plus K8 160 Hamilton (Switzerland), was employed to measure the pH value online during the bioprocess. The dissolved oxygen (DO) concentration was also determined online using an oxygen electrode (OxyFerm FDA Hamilton 160 (Switzerland)).

The concentrations of substrate (glucose), principal product (isobutanol), and byproducts (ethanol and organic acids) were quantified by HPLC (using an Agilent Technologies 1100 series). The column used for this analysis was Rezex RHM-Monosaccharide-H⁺ 300 × 7.8 mm (Phenomenex, USA) that was maintained at 80 °C. The mobile phase was 1 mM H₂SO₄ at 0.5 mL·min⁻¹ flow rate. The refraction index detector (RID), Waters 2414, was employed at a temperature of 55 °C to determine the concentration of metabolites previously cited.

2.4. Mathematical Methods. The kinetic model, as described later on, takes into account five responses: the concentrations of glucose, biomass, isobutanol, ethanol, and organic acids. The organic acids are formed by different byproducts (acetic acid, succinic acid, and lactic acid) lumped into a single compound called “acid”.⁴³

The kinetic model parameters were calculated by fitting the model to experimental data, using a Marquardt–Levenberg algorithm.⁴⁴ The software employed to fit the model to the experimental data was Aspen Custom Modeler (Aspen-Tech, USA). The implicit Euler method was employed to integrate the differential equations of the kinetic model; this method has been described in previous works.^{41,43,45,46} Because the

differential equations are nonlinear, the “nonlinear least-squares solver” algorithm (NL2SOL) was employed to calculate the parameters through minimizing the differences between kinetic model simulation and the experimental data according to “least-squares method”.⁴⁷

In order to determine the goodness-of-fit of the kinetic model, different statistical parameters were used: among them, Fisher’s *F*-value in comparison to its tabulated value at 95% of confidence (*F*), the sum of squared residuals (SSR), the residual mean squared error (RMSE), and the variation explained (VE). The definitions of these statistical parameters have been widely explained in previous works.^{41,46,48,49}

3. EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

Five experiments were carried out using different initial glucose concentrations: 30, 40, 45, 50, and 70 g·L⁻¹. In Figure 1, the experimental results are given, showing the evolution with time of biomass and isobutanol, ethanol, and organic acids concentrations. In addition, the evolution with time of the DO concentration is offered in Figure 1.

As can be seen, the evolution of the biomass concentration is very similar in all the runs; thus, the biomass growth rate does not depend on the glucose concentration, reaching in all cases a maximum biomass concentration around 2 g·L⁻¹ in the stationary stage.

The growth rate depends on the DO concentration. The effect of oxygen on growth has been already described in previous works; higher oxygen availability yields higher growth rate.^{35,37,38} Moreover, it can be observed that when this DO concentration is null, after 7 h of time approximately, the growth is very slow, but continues during some time, around 1 h more as can be observed in Figure 1 and Table 1. In Table 1

Table 1. Data of Biomass Concentration When the Concentration of Dissolved Oxygen in the Broth Is Null (C_X^*) and Biomass Concentration When the Culture Reaches the Stationary Phase (C_X^{}), for Runs Performed with Different Values of Initial Glucose Concentration (C_{G_0})**

run with C_{G_0} (g·L ⁻¹)	C_X^* (g·L ⁻¹)	C_X^{**} (g·L ⁻¹)
30	1.73	1.98
40	1.67	2.06
45	1.80	2.25
50	1.60	1.99
70	1.32	1.99

the C_X values when the DO concentration is null (C_X^*) and in the stationary stage (C_X^{**}) are shown; as can be seen, the growth continues for a short time when the DO concentration is practically zero. This leads to speculation that there is an intermediate compound (IC) involved in the growth, as indicated later on in eq 6.

As can be seen in Figure 1, isobutanol production is always higher than ethanol production, but the concentrations of both alcohols follow a similar trend. The maximum concentrations of both alcohols increase when the initial glucose concentration increases from 30 to 45 g·L⁻¹ (i.e., the isobutanol concentration reaches values of 6.10 and 11.06 g·L⁻¹, respectively). But for higher initial glucose concentrations this concentration slightly decreases to a value around 10.32 g·L⁻¹ at 50 and 70 g·L⁻¹ initial glucose concentrations.

Moreover, the ratio between maximum isobutanol and ethanol concentrations in each run varies. The C_{Ib}/C_{Et} takes values of 1.8, 1.6, 2.1, 1.6, and 1.3 for the runs carried out employing 30, 40, 45, 50, and 70 g·L⁻¹ initial glucose concentrations, respectively. Thus, the selectivity to isobutanol is higher in the run conducted with 45 g·L⁻¹ initial glucose concentration.

The production of organic acids increases when the initial glucose concentration is increased, from 5.56 g·L⁻¹ acid concentration in the run with 30 g·L⁻¹ glucose to 15.05 g·L⁻¹ acids when the initial glucose concentration is 70 g·L⁻¹. To describe these results in a quantitative way, the following parameters have been defined:

maximum isobutanol yield:

$$Y_{Ib/G_0} = \frac{C_{Ib}^{max}}{C_{G_0}} \quad (2)$$

isobutanol productivity:

$$P_{Ib} = \frac{C_{Ib}^{max}}{t^{max}} \quad (3)$$

isobutanol selectivity:

$$S_{Ib} = \frac{C_{Ib}^{max}}{C_{G_0} - C_G^{min}} \quad (4)$$

The values of these parameters for the five runs carried out are given in Table 2. As can be seen, isobutanol yield increases

Table 2. Yield, Productivity, and Selectivity on Isobutanol Production from Glucose of Runs Carried out Employing Different Initial Glucose Concentrations

C_{G_0} (g·L ⁻¹)	Y_{Ib} (g _{Ib} ·g _{G₀} ⁻¹)	P_{Ib} (g _{Ib} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	S_{Ib} (g _{Ib} ·g _{G_{consumed}} ⁻¹)
30	0.21	0.15	0.23
40	0.22	0.16	0.24
45	0.24	0.20	0.28
50	0.18	0.10	0.19
70	0.15	0.07	0.16

from 0.21 g_{Ib}·g_{G₀}⁻¹ in the run conducted with 30 g·L⁻¹ glucose to a value of 0.24 g_{Ib}·g_{G₀}⁻¹ in the run with 45 g·L⁻¹ initial glucose concentration. For the runs carried out with higher initial glucose concentration, this yield decreases to values of

0.18 and 0.15 g_{Ib}·g_{G₀}⁻¹ for initial glucose concentrations of 50 and 70 g·L⁻¹, respectively.

In a similar way, the productivity presents the maximum value, 0.20 g_{Ib}·h⁻¹, in the run performed using an initial glucose concentration of 45 g·L⁻¹. The productivity reaches a minimum in the run with the highest glucose concentration, a value of only 0.07 g_{Ib}·h⁻¹, when the initial glucose concentration employed is 70 g·L⁻¹.

The maximum selectivity is also obtained in the run conducted with 45 g·L⁻¹ glucose, reaching a value of 0.28 g_{Ib}·g_G⁻¹ (referred to glucose consumed). The lower selectivity value is reached also in the run with the maximum glucose concentration, a value of 0.16 g_{Ib}·g_G⁻¹.

According to these results, it can be established that the metabolism of *S. blattae* (p424IbPSO) is clearly affected if an initial glucose concentration higher than 50 g·L⁻¹ is employed. For values above this limit, isobutanol production decreases, as clearly shown by the values of yield, productivity and selectivity, indicating that the carbon flux is derived to the production of acids when the glucose concentration is high.

In previous works,³⁴ the tolerance of *S. blattae* (p424IbPSO) to isobutanol has been studied. It has been shown that, for isobutanol concentrations higher than 5.0 g·L⁻¹, the isobutanol production rate decreases, and for concentrations over 10.0 g·L⁻¹ isobutanol, the production can be totally inhibited. Thus, an inhibition for both substrate (glucose) and product (isobutanol) must be taken into account in the kinetic model.

4. KINETIC MODEL FORMULATION

The methodology for the kinetic model formulation has been described in depth in previous works.^{43,50} The following steps must be followed:

Table 4. Statistical Parameter Values Calculated by Fitting of Kinetic Model to Experimental Data of Runs Performed with Different Values of Initial Glucose Concentration

C_{G_0} (g·L ⁻¹)	F_{cal}	F_{tab} (95%)	RMSE	SSR	VE (%)
30	2922	1.99	0.48	20.6	99.1
40	12188	2.09	0.36	13.4	99.7
45	34924	2.05	0.30	8.3	99.8
50	34751	2.07	0.33	8.0	99.9
70	13988	2.04	0.74	70.5	99.3

Table 3. Kinetic Parameter Values and Confidence Intervals Calculated by Fitting the Kinetic Model to Experimental Data of the Runs Conducted with Different Initial Glucose Concentrations

C_{G_0} (g·L ⁻¹)	$k_4 \times 10^{-3}$ (L·g _{Ib} ⁻¹ ·g _G ⁻¹ ·g _X ⁻¹ ·h ⁻¹)	$k_5 \times 10^{-3}$ (L·g _{Et} ⁻¹ ·g _G ⁻¹ ·g _X ⁻¹ ·h ⁻¹)	$k_6 \times 10^{-3}$ (L·g _{Ac} ⁻¹ ·g _G ⁻¹ ·g _X ⁻¹ ·h ⁻¹)	k_d (h ⁻¹)	μ_1 (h ⁻¹)	μ_2 (g _C ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
30	7.84 ± 1.02	4.55 ± 0.97	5.73 ± 0.74	0.18 ± 0.10	72.8 ± 20.4	0.13 ± 0.10
40	4.98 ± 0.38	3.16 ± 0.37	4.15 ± 0.31	0.17 ± 0.04	42.6 ± 15.3	0.32 ± 0.13
45	4.93 ± 0.37	2.33 ± 0.37	2.32 ± 0.31	0.11 ± 0.03	51.0 ± 13.1	0.18 ± 0.08
50	2.59 ± 0.08	1.75 ± 0.07	2.53 ± 0.12	0.17 ± 0.09	42.3 ± 16.3	0.28 ± 0.13
70	1.44 ± 0.16	1.59 ± 0.40	1.94 ± 0.14	0.12 ± 0.01	52.2 ± 10.1	0.19 ± 0.02

C_{G_0} (g·L ⁻¹)	$v_{G/Ib}$ (g _G ·g _{Ib} ⁻¹)	$v_{G/Et}$ (g _G ·g _{Et} ⁻¹)	$v_{G/X}$ (g _G ·g _X ⁻¹)	$v_{G/Ac}$ (g _G ·g _{Ac} ⁻¹)	ms (g _{CO₂} ·g _X ⁻¹ ·h ⁻¹)
30	1.36 ± 0.07	0.10 ± 0.01	1.68 ± 0.43	1.54 ± 0.70	0.10 ± 0.05
40	0.40 ± 0.01	0.20 ± 0.06	4.34 ± 1.13	2.24 ± 0.67	0.15 ± 0.03
45	0.25 ± 0.04	0.21 ± 0.06	1.12 ± 0.83	2.17 ± 0.53	0.18 ± 0.02
50	0.20 ± 0.05	0.25 ± 0.04	4.05 ± 1.68	2.95 ± 0.36	0.10 ± 0.02
70	0.15 ± 0.01	0.56 ± 0.06	4.60 ± 1.65	4.31 ± 1.23	0.12 ± 0.03

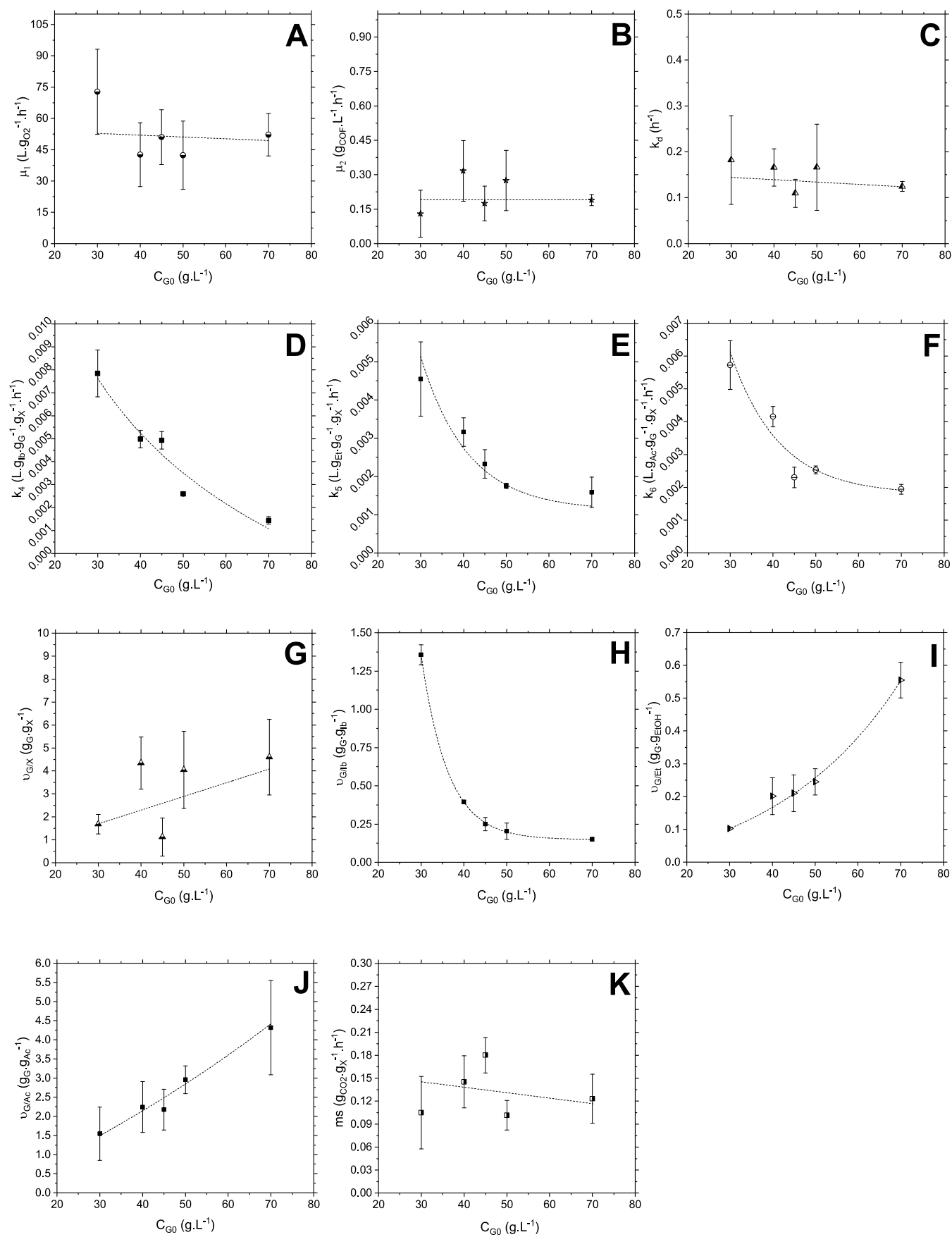


Figure 2. Trends of kinetic parameter values as a function of initial glucose concentration employed in each run. (A) μ_1 ; (B) μ_2 ; (C) k_d ; (D) k_4 ; (E) k_5 ; (F) k_6 ; (G) v_{GX} ; (H) v_{Glb} ; (I) v_{GEt} ; (J) v_{GAc} ; (K) ms .

- simplified reaction scheme assumption
- kinetic equations for each of the reactions of the scheme assumed
- formulation of the kinetic model
- kinetic parameter values calculation employing a multi-response method
- relationship among kinetic parameter values and variables of the different experiments, if possible

In order to formulate a simplified reaction scheme, experience and knowledge of the bioprocess must be taken into account and lumping can be employed for scheme simplification.^{41,43} Because the kinetic equations of the reactions in the simplified reaction scheme are difficult to know, the so-called “reaction rate method” can be used in order to know the influence of the variables studied, and thus the function of the kinetic equations.⁴³

4.1. Simplified Reaction Scheme. In order to propose a simplified reaction scheme for the bioprocess under the operational conditions above commented on, it is necessary to take into account that the carbon source (glucose in this case) is employed for the production both of biomass (growth) and of several metabolites: isobutanol, ethanol, and several organic acids that have been lumped in a unique species. According to the experimental observations, the following simplified reaction scheme has been adopted:

reaction 1:



reactions 2 and 3:



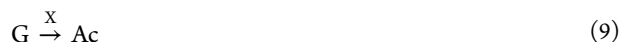
reaction 4:



reaction 5:



reaction 6:



It is necessary to point out that the experimentation is carried out in a special way. First, a small quantity of oxygen is present, which is employed for growth and for the production of an intermediate used also for growth. But afterward the oxygen is totally consumed and it is not fed any more. Thus, the growth takes place according to reaction 1 (eq 5), and it further continues for a short time more (as previously commented on and justified in Table 1). This fact is assumed to happen due to the conversion of an intermediate compound (IC), and the growth continues during a short time until this compound is also totally consumed.

On the other hand, glucose is also employed for the metabolite production, according to reactions 4–6 (eqs 7–9), for the production of isobutanol, ethanol, and organic acids. Moreover, it is necessary to take into account the maintenance of the culture, which also consumes glucose. According to this scheme, the kinetic model will be formulated later on.

4.2. Kinetic Equations of the Reactions. The following step is to adopt kinetic equations for each one of the reactions appearing in the simplified reaction scheme assumed. The

following kinetic equations have been considered, where the subscripts correspond to the definitions of reactions 1–6 (eqs 5–9):

$$r_1 = \mu_1 C_{O_2} C_X \quad (10)$$

$$r_2 = k_2 C_{O_2} C_X \quad (11)$$

$$r_3 = k_3 C_{IC} \quad (12)$$

$$r_4 = k_4 C_G C_X \quad (13)$$

$$r_5 = k_5 C_G C_X \quad (14)$$

$$r_6 = k_6 C_G C_X \quad (15)$$

4.3. Kinetic Model: Production Rates of the Key Compounds. According to the reaction scheme, if biomass (X), isobutanol (Ib), ethanol (Et), and organic acids (Ac) are taken as key compounds, the following production rates can be established.

- The growth rate, describing the biomass concentration with time, is given by

$$R_X = \frac{dC_X}{dt} = r_1 + r_3 \quad (16)$$

- As the concentration of the intermediate compound (IC) is not known, it can be assumed that a concentration of this compound (C_{IC}^{max}) is reached in a few minutes, while there is oxygen available for the culture. After these few minutes, it can be assumed that this maximal concentration decreases according to first-order kinetics, as follows:

$$R_{IC} = r_2 - r_3 = k_2 C_{O_2} C_X - k_3 C_{IC} \quad (17)$$

when $C_{O_2} = 0$ at $t = t^*$

$$R_{IC} = -r_3 = -k_3 C_{IC} = \frac{dC_{IC}}{dt} \quad (18)$$

If this equation is integrated with the boundary condition $t = t^* \therefore C_{O_2} = 0 \therefore C_{IC} = C_{IC}^{max}$, then

$$C_{IC} = C_{IC}^{max} \exp(-k_d t) \quad (19)$$

Therefore, r_3 can be expressed as

$$r_3 = \mu_2 \exp(-k_d t) \quad (20)$$

with $\mu_2 = C_{IC}^{max} k_3$. The growth rate is approximately given by

$$R_X = r_1 + r_3 = \mu_1 C_{O_2} C_X + k_3 C_{IC} \quad (21)$$

$$R_X = \mu_1 C_{O_2} C_X + \mu_2 \exp(-k_d t) \quad (22)$$

- The production rates of the metabolites chosen as key compounds are given by the following equations:

$$R_{Ib} = \frac{dC_{Ib}}{dt} = r_4 = k_4 C_G C_X \quad (23)$$

$$R_{Et} = \frac{dC_{Et}}{dt} = r_5 = k_5 C_G C_X \quad (24)$$

$$R_{Ac} = \frac{dC_{Ac}}{dt} = r_6 = k_6 C_G C_X \quad (25)$$

- Finally, the uptake rate of glucose is given by

$$R_G = \frac{dC_G}{dt} = -v_{G/X}r_1 - v_{G/Ib}r_4 - v_{G/Et}r_5 - v_{G/Ac}r_6 - msC_X \quad (26)$$

The kinetic parameter calculation of the above equations has been carried out by fitting this kinetic model, eqs 22–26, to the experimental data.

The values of the parameters of the kinetic model described above have been calculated by fitting to the experimental results of the five runs, using the mathematical methods previously described. The values of these parameters are given in Table 3. In Table 3 it can be observed that the values of the kinetic parameters of the production rates of the different metabolites k_4 , k_5 , and k_6 (from eqs 23–25) decrease when the glucose initial concentration increases. Thus, a high glucose concentration affects negatively the production rates of the three metabolites: isobutanol, ethanol, and acids. This fact signals the inhibition by substrate cited above.

On the other hand, the growth kinetic parameters, μ_1 , μ_2 , and k_d , have very similar values in all the runs carried out. This is due to the fact that growth rate only depends on oxygen availability. The DO concentration is practically the same in the five runs performed: At a time of 2 h the reactor is closed and air is not bubbled inside, in order to get the microaerophilic conditions appropriate for isobutanol production as determined elsewhere.^{35,37,38} According to these results, it is logical to consider that the kinetic parameters related to the growth rate are not affected by the initial glucose concentration.

In addition, the stoichiometric coefficient ($v_{G/X}$, $v_{G/Ib}$, $v_{G/Et}$ and $v_{G/Ac}$) values calculated by regression of eq 26 are given in Table 3. In the case of the parameter referred to the glucose consumed by growth, $v_{G/X}$ it can be seen that the values are very similar for all the runs, as already indicated above. With respect to the coefficient referred to the consumption of glucose to produce isobutanol, $v_{G/Ib}$, it can be seen that for low initial glucose concentrations most of the glucose is spent in isobutanol production, but the value of $v_{G/Ib}$ decreases when the initial glucose concentration increases. On the contrary, the values of $v_{G/Et}$ and $v_{G/Ac}$ increase in the runs with higher initial glucose concentration; in these runs, the higher the initial glucose concentration is the more glucose is spent in the formation of these byproducts, which is also expressed by the values of the selectivity in Table 2. This effect of the initial substrate concentration has been already described in a previous work.⁴¹

Finally, with respect to the maintenance parameter, ms , as can be observed in Table 3, the values of this parameter are also very similar in all the experiments carried out. Maybe the value of this parameter is slightly higher in the runs performed with 40 and 45 g·L⁻¹ initial glucose concentrations, which can be explained taking into account that in both runs the maximum biomass concentration is also slightly higher (0.26 g·L⁻¹ higher).

The fitting of the kinetic model is excellent for all the experiments, as can be seen in Figure 1. Moreover, the statistical parameters, given in Table 4, fulfill all the criteria usually employed, giving a high confidence level to the kinetic model.^{43,46} The Fisher calculated F -values (F_{cal}) are much higher than the tabulated values (F_{tab}) for a 95% confidence. The values of RMSE and SSR are low, mainly taking into account the high volume of data used in the fitting; only in the runs conducted with 30 and 70 g·L⁻¹ initial glucose

concentrations are they higher, but still reasonable. The values of the variation explained (VE) are close to 100% for all the runs, and only in the above two runs cited are around 99%. All this is confirmed with the narrow confidence of the kinetic parameters as can be seen in Table 3.

The kinetic parameter values vs initial glucose concentration employed in each run have been represented in Figure 2. As can be seen, the variations of all the parameters are reasonable. The kinetic parameters of growth (μ_1 , μ_2 , k_d and $v_{G/X}$) and the biomass maintenance energy parameter (ms) are practically constant in all the experiments. Thus, the glucose concentration does not affect the growth rate, as already pointed out in previous works.^{35,37,38} In the case of the kinetic parameters related to the metabolite production, isobutanol (k_4), ethanol (k_5), and acids (k_6), it can be seen that the values of these parameters decrease when the initial glucose concentrations increase, as has been previously mentioned.

5. CONCLUSIONS

The effect of the initial glucose concentration in the isobutanol production by *S. blattae* (p424IbPSO) has been studied. According to the experimental results, it can be said that at high glucose concentrations (<50 g·L⁻¹) the isobutanol production is lower. The maximum titer of isobutanol, about 11 g·L⁻¹, was reached when 45 g·L⁻¹ initial glucose was employed. A novel kinetic model has been proposed to describe the isobutanol bioproduction and the carbon flux during growth of *S. blattae* (p424IbPSO). The proposed kinetic model is able to predict, with high accuracy, the evolution of the glucose uptake rate, and the production rates of biomass, isobutanol, ethanol, and other byproducts (different organic acids). The kinetic model fulfills all the usually employed statistical criteria and is able to fit the experimental results very well.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: fgchoa@ucm.es.

ORCID

Felix Garcia-Ochoa: 0000-0002-0921-5900

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financed by MINECO under Contract No. CTQ2017-84963-C2-1-R, and a grant for M.G.A. with reference BES-2014-068344.

NOMENCLATURE

- C = concentration (g·L⁻¹)
- C_{O_2} = oxygen concentration in the liquid phase (g·L⁻¹)
- CDM = cell dry mass (g·L⁻¹)
- DO = dissolved oxygen
- F = F -value (Fisher's test)
- GMO = genetically modified microorganism
- HPLC = high performance liquid chromatography
- IPTG = isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- k = kinetic parameter (units depend on the equation)
- N = stirrer speed (rpm)
- M92X = minimal salts culture medium (2X)
- ms = kinetic parameter for microbial maintenance (g_C·g_X⁻¹·h⁻¹)

OD₆₀₀ = optical density at 600 nm
 P = isobutanol productivity ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
 r = reaction rate ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
 R = production rate ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
 RID = refraction index detector
 RMSE = residual mean squared error
 S = isobutanol selectivity ($\text{g}_{\text{ib}}\cdot\text{g}_{\text{Gc}}^{-1}$)
 SSR = sum of squared residuals
 STBR = stirred tank bioreactor
 t = time (h^{-1})
 V = volume of work in the STBR vessel (L)
 VE = variation explained of a nonlinear regression fitting (%)
 Y = isobutanol yield ($\text{g}_{\text{ib}}\cdot\text{g}_{\text{G}_0}^{-1}$)

Greek Symbols

μ = kinetic parameter for biomass growth (units depend on the parameter)
 ν = stoichiometric coefficient, ratio between glucose consumed and different compounds ($\text{g}_G\cdot\text{g}_j^{-1}$) ($j = \text{X, Ib, Et, Ac}$)

Superscripts

max = maximum value
 min = minimum value

Subscripts

Ac = organic acids
 cal = experimental value of a variable
 CO₂ = carbon dioxide
 Et = ethanol
 G = glucose
 G₀ = initial concentration of glucose
 Gc = glucose
 Ib = isobutanol
 IC = intermediate compound involved in biomass growth
 tab = tabulated value (F -test)
 X = biomass

REFERENCES

- Dellomonaco, C.; Fava, F.; Gonzalez, R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 3.
- Solomon, B. D. Biofuels and sustainability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1185* (1), 119–134.
- Atsumi, S.; Hanai, T.; Liao, J. C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **2008**, *451* (7174), 86–89.
- Tao, L.; Tan, E. C. D.; McCormick, R.; Zhang, M.; Aden, A.; He, X.; Zigler, B. T. Techno-Economic Analysis and Life-Cycle Assessment of Cellulosic Isobutanol and Comparison with Cellulosic Ethanol and n-Butanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* **2014**, *8* (1), 30–48.
- Jang, Y.-S.; Kim, B.; Shin, J. H.; Choi, Y. J.; Choi, S.; Song, C. W.; Lee, J.; Park, H. G.; Lee, S. Y. Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109* (10), 2437–2459.
- Atsumi, S.; Liao, J. C. Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19* (5), 414–419.
- Connor, M. R.; Liao, J. C. Engineering of an *Escherichia coli* Strain for the Production of 3-Methyl-1-Butanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (18), 5769–5775.
- Connor, M. R.; Liao, J. C. Microbial production of advanced transportation fuels in non-natural hosts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20* (3), 307–315.
- Gronenberg, L. S.; Marcheschi, R. J.; Liao, J. C. Next generation biofuel engineering in prokaryotes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (3), 462–471.
- Matsuda, F.; Kondo, T.; Ida, K.; Tezuka, H.; Ishii, J.; Kondo, A. Construction of an Artificial Pathway for Isobutanol Biosynthesis in the Cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2012**, *76* (11), 2139–2141.
- Gonçalves, A. L.; Simões, M. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for higher alcohols production: An environmentally friendly alternative to fossil fuels. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2017**, *77*, 580–589.
- Atsumi, S.; Cann, A. F.; Connor, M. R.; Shen, C. R.; Smith, K. M.; Brynildsen, M. P.; Chou, K. J. Y.; Hanai, T.; Liao, J. C. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* **2008**, *10* (6), 305–311.
- Atsumi, S.; Wu, T.-Y.; Machado, I. M. P.; Huang, W.-C.; Chen, P.-Y.; Pellegrini, M.; Liao, J. C. Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*, 449.
- Desai, S. H.; Rabinovitch-Deere, C. A.; Tashiro, Y.; Atsumi, S. Isobutanol production from cellobiose in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (8), 3727–3736.
- Desai, S. H.; Rabinovitch-Deere, C. A.; Fan, Z. L.; Atsumi, S. Isobutanol production from cellobionic acid in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 52.
- Cann, A. F.; Liao, J. C. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81* (1), 89–98.
- Atsumi, S.; Li, Z.; Liao, J. C. Acetolactate Synthase from *Bacillus subtilis* Serves as a 2-Ketoisovalerate Decarboxylase for Isobutanol Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (19), 6306–6311.
- Atsumi, S.; Wu, T.-Y.; Eckl, E.-M.; Hawkins, S. D.; Buelter, T.; Liao, J. C. Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85* (3), 651–657.
- Tai, Y.-S.; Xiong, M.; Zhang, K. Engineered biosynthesis of medium-chain esters in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **2015**, *27*, 20–28.
- Li, S.; Wen, J.; Jia, X. Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91* (3), 577–589.
- Jia, X. Q.; Li, S. S.; Xie, S.; Wen, J. P. Engineering a Metabolic Pathway for Isobutanol Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168* (1), 1–9.
- Akita, H.; Nakashima, N.; Hoshino, T. Bacterial production of isobutanol without expensive reagents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (2), 991–999.
- Smith, K. M.; Cho, K.-M.; Liao, J. C. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87* (3), 1045–1055.
- Blombach, B.; Eikmanns, B. J. Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioengineered bugs* **2011**, *2* (6), 346–350.
- Blombach, B.; Riester, T.; Wieschalka, S.; Ziert, C.; Youn, J.-W.; Wendisch, V. F.; Eikmanns, B. J. *Corynebacterium glutamicum* Tailored for Efficient Isobutanol Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (10), 3300–3310.
- Yamamoto, S.; Suda, M.; Niimi, S.; Inui, M.; Yukawa, H. Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110* (11), 2938–2948.
- Chen, X.; Nielsen, K. F.; Borodina, I.; Kielland-Brandt, M. C.; Karhumaa, K. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4*, 21.
- Kondo, T.; Tezuka, H.; Ishii, J.; Matsuda, F.; Ogino, C.; Kondo, A. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **2012**, *159* (1–2), 32–37.

- (29) Matsuda, F.; Ishii, J.; Kondo, T.; Ida, K.; Tezuka, H.; Kondo, A. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 119.
- (30) Ida, K.; Ishii, J.; Matsuda, F.; Kondo, T.; Kondo, A. Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 62.
- (31) Hammer, S. K.; Avalos, J. L. Uncovering the role of branched-chain amino acid transaminases in *Saccharomyces cerevisiae* isobutanol biosynthesis. *Metab. Eng.* **2017**, *44*, 302–312.
- (32) Higashide, W.; Li, Y.; Yang, Y.; Liao, J. C. Metabolic Engineering of *Clostridium cellulolyticum* for Production of Isobutanol from Cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (8), 2727–2733.
- (33) Lin, P. P.; Mi, L.; Morioka, A. H.; Yoshino, M. M.; Konishi, S.; Xu, S. C.; Papanek, B. A.; Riley, L. A.; Guss, A. M.; Liao, J. C. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metab. Eng.* **2015**, *31*, 44–52.
- (34) Felpeto-Santero, C.; Rojas, A.; Tortajada, M.; Galan, B.; Ramon, D.; Garcia, J. L. Engineering alternative isobutanol production platforms. *AMB Express* **2015**, *5*, 32.
- (35) Acedos, M. G.; Ramon, A.; de la Morena, S.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *133*, 21–27.
- (36) Acedos, M. G.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Resting cells isobutanol production by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): influence of growth culture conditions. *Biotechnol. Prog.* **2018**, *34* (5), 1073–1080.
- (37) Acedos, M. G.; Yustos, P.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Carbon Flux Distribution in the Metabolism of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) for Isobutanol Production from Glucose as Function of Oxygen Availability. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, DOI: 10.1002/jctb.5832.
- (38) Acedos, M. G.; Gomez, E.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Hydrodynamic and oxidative stress in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) cultures in stirred tank bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **2019**.
- (39) Maruthai, K.; Thangavelu, V.; Kanagasabai, M. Statistical screening of medium components on ethanol production from cashew apple juice using *Saccharomyces diasticus*. *Int. J. Chem. Biol. Eng.* **2012**, *6*, 108–111.
- (40) Pinheiro, Á. D. T.; da Silva Pereira, A.; Barros, E. M.; Antonini, S. R. C.; Cartaxo, S. J. M.; Rocha, M. V. P.; Gonçalves, L. R. B. Mathematical modeling of the ethanol fermentation of cashew apple juice by a flocculent yeast: the effect of initial substrate concentration and temperature. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2017**, *40* (8), 1221–1235.
- (41) Rodriguez, A.; Wojtusik, M.; Masca, F.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Kinetic modeling of 1,3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: Influence of the initial substrate concentration. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *117*, 57–65.
- (42) Xiao, Y.; Feng, X.; Varman, A. M.; He, L.; Yu, H.; Tang, Y. J. Kinetic Modeling and Isotopic Investigation of Isobutanol Fermentation by Two Engineered *Escherichia coli* Strains. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51* (49), 15855–15863.
- (43) García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Alcón, A. Metabolic structured kinetic model for xanthan production. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23* (1), 75–82.
- (44) Marquardt, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, *11* (2), 431–441.
- (45) Garcia-Ochoa, F.; Romero, A.; Querol, J. Modeling of the thermal n-octane oxidation in the liquid phase. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1989**, *28* (1), 43–48.
- (46) Ladero, M.; de Gracia, M.; Trujillo, F.; Garcia-Ochoa, F. Phenomenological kinetic modelling of the esterification of rosin and polyols. *Chem. Eng. J.* **2012**, *197*, 387–397.
- (47) Yuan, J. Y. Numerical methods for generalized least squares problems. *J. Comput. Appl. Math.* **1996**, *66* (1), 571–584.
- (48) Ladero, M.; de Gracia, M.; Tamayo, J. J.; Ahumada, I. L. d.; Trujillo, F.; Garcia-Ochoa, F. Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: Application to industrial operation. *Chem. Eng. J.* **2011**, *169* (1), 319–328.
- (49) Esteban, J.; Fuente, E.; Blanco, A.; Ladero, M.; Garcia-Ochoa, F. Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements. *Chem. Eng. J.* **2015**, *260*, 434–443.
- (50) García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Alcón, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17* (3), 206–217.

Publicación 4

- **Autores:** Miguel G. Acedos, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.
- **Título:** Resting Cells Isobutanol Production by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Influence of Growth Culture Conditions.
- **Revista:** Biotechnology Progress (2018) 34 (5): 1073-1080.
- **Índice de impacto** (2017): 1,947
- **Categoría:** Biotecnología y Microbiología Aplicada (Q3), Ciencia y Tecnología de Alimentos (Q2)
- **Enlace:** <https://doi.org/10.1002/btpr.2705>
- **Resumen:** En esta publicación se muestran los resultados del estudio llevado a cabo para la producción de isobutanol a partir de glucosa con células de *S. blattae* (p424IbPSO) en estado de *resting cells*. Este tipo de producción se caracteriza por estar formado por dos etapas bien diferenciadas, una etapa de crecimiento y una etapa de producción de isobutanol sin crecimiento celular. En este trabajo, mediante el empleo del diseño experimental tipo Taguchi, se determinan las condiciones óptimas y la composición de medio de cultivo óptima, para llevar a cabo la etapa de obtención de las células. Las variables estudiadas son: concentración de extracto de levadura (0,0, 1,5 y 3,0 g.L⁻¹), de amonio (0,7, 1,0 y 1,4 g.L⁻¹), de IPTG como inductor (0,1, 0,5 y 1 mM) y temperatura (25, 30 y 35 °C). Estos estudios se llevan a cabo para tres edades celulares: primera mitad de la fase exponencial, segunda mitad de la fase exponencial y la fase estacionaria del crecimiento. Como respuesta, se emplea el porcentaje sobre el rendimiento máximo teórico en isobutanol. Se determina que las mejores condiciones para obtener células con capacidad de producir isobutanol son: 30 °C, un medio que contiene 1,5 g.L⁻¹ extracto de levadura y 1,4 g.L⁻¹ de amonio, añadiendo 0,5 mM de IPTG. Estas condiciones se refieren a células recolectadas en la primera mitad de la fase exponencial, ya que si estas envejecen pierden actividad. La pérdida de actividad se debe a la formación de cuerpos de inclusión para las condiciones de temperatura y concentración de IPTG altas, observado en este trabajo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Con las células obtenidas en las mejores condiciones, se consigue un 60 % en isobutanol sobre el rendimiento máximo teórico. Así mismo, hay que indicar que la producción de isobutanol con células en estado de *resting cells* no se había reportado previamente en la literatura.

Resting Cells Isobutanol Production by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Influence of Growth Culture Conditions

Miguel G. Acedos

Dept. of Chemical and Materials Engineering, Universidad Complutense, Madrid, 28040, Spain

Victoria E. Santos 

Dept. of Chemical and Materials Engineering, Universidad Complutense, Madrid, 28040, Spain

Felix Garcia-Ochoa 

Dept. of Chemical and Materials Engineering, Universidad Complutense, Madrid, 28040, Spain

DOI 10.1002/btpr.2705

Published online October 3, 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Isobutanol is a promising gasoline additive and could even be a potential substitute used directly as combustible. In this work, the production of isobutanol from glucose by Shimwellia blattae (p424IbPSO) in resting cell cultures is studied. This production has two stages, involving a resting cell phase that has not been studied before. The cell growth was carried out under different operating conditions: temperature and medium composition (YE, ammonium, and IPTG concentrations), looking for the highest isobutanol production. Moreover, the cells were collected at three different growth times checking their isobutanol production capacity. The best operating conditions have been determined as: 30°C of temperature, a medium containing 1.5 g L⁻¹ YE and 1.4 g L⁻¹ of ammonium as nitrogen sources, adding 0.5 mM IPTG as inducer. The cells collected at early growth times are significantly more active. The use of S. blattae (p424IbPSO) in resting cells is a good strategy for the production of isobutanol from glucose yielding better results than in batch growth cultures, a yield of 60% attainment of theoretical maximum yield is obtained under optimal conditions. In addition, it has been demonstrated that if the cells are cultured at higher temperatures and with high IPTG concentrations, inclusion bodies are formed in the cytoplasm inhibiting the isobutanol production in the resting cell stage. © 2018 American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog., 34:1073–1080, 2018

Keywords: isobutanol, resting cell culture, Shimwellia blattae, biorefinery

Highlights

Isobutanol can be produced by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) in resting cell cultures.

Optimal growth operating conditions (culture medium, temperature, cell stage) are determined.

About 60% attainment of theoretical maximum yield was achieved under optimal conditions.

Introduction

Nowadays there is a big interest in obtaining alternative biofuels from renewable biomass, such as lignocellulosic wastes.^{1–3} This interest is encouraged by the increase of energy consumption, the depletion of fossil combustibles and the environmental impact produced by fossil fuels.^{4,5}

Higher alcohols (C3–C5 alcohols) containing higher energy density and less hygroscopicity than ethanol are considered as interesting alternatives. Among them, isobutanol is a good candidate to improve properties of gasoline as an additive when they are mixed and even it could be a potential substitute used directly as combustible.^{6,7} On the other hand,

isobutanol can also be used as a chemical platform, for example to produce plasticizer agents.⁸

Recently, several studies have been focused in obtaining strains which are high producers of and tolerant to isobutanol for the production of this alcohol. Liao and partners were the pioneers carrying out studies to produce isobutanol from glucose using several GMO.^{6,9–13} As then numerous metabolic engineering strategies have been tried using non-native metabolic pathways through 2-keto acid precursors, the more significant being the following: *Escherichia coli*,^{1,6,14–16} *Bacillus subtilis*,¹⁷ *Corynebacterium glutamicum*,^{18,19} *Sacharomyces cerevisiae*,^{20–26} *Clostridium cellulolyticum*,²⁷ and *Shimwellia blattae*.¹ The maximum yield (86% attainment of theoretical value) was achieved by Atsumi et al.⁶ reached a concentration of 22 g L⁻¹ of isobutanol in a time of 112 h with a high initial glucose concentration. Baez et al.²⁸ reported a concentration of 50 g L⁻¹ of isobutanol obtained in fed-batch operation, removing the product, under aerobic conditions, during 72 h. It is well know that isobutanol is a toxic compound for isobutanol producer strains,^{29,30} in this sense *S. blattae* (p424IbPSO) is a good candidate for this purpose because it has been reported that this recombinant bacteria is a robust strain and good isobutanol producer, about 5.7 g L⁻¹ under oxygen deprivation conditions 1. In a previous work, the influences of several operating conditions, such as media composition, oxygen

Correspondence concerning this article should be addressed to F. Garcia-Ochoa at fgochoa@ucm.es

availability and pH, in growing cells of *S. blattae* cultures have been studied obtaining about 11 g L⁻¹ of isobutanol and 69% attainment of theoretical maximum yield.³¹

In resting cell operations, cells cannot grow but they are metabolically active; this operation type can have significant benefits compared to growing-cells cultures.³²⁻³⁵ Better yields and flexible operation can be reached when working in resting cells, also increasing the culture stability, shift in metabolism toward isobutanol, thus enhancing the selectivity to isobutanol, and enhancing culture robustness.^{33,36-38} Previous studies suggest that *S. blattae* (p424IbPSO) is able to produce isobutanol in a "nongrowth" medium¹; therefore, resting cell could be used for isobutanol production, according to the classic two stages: first obtaining highly active biomass and, after recovery and wash, carry out the bio-transformation of glucose to isobutanol. There are two studies producing isobutanol in two stages, biomass growth and then the so called "zero growth production".^{18,39} In these studies, the second stage of the process is carried out in the same vessel (containing amino acids or vitamins among other compounds) but avoiding the inlet of oxygen to the vessel. Resting cell culture, with a medium containing only a buffer with the substrate but without nutrients has not been tried out yet.

Other previous works have pointed out that the use of high growth temperatures and high IPTG concentration as inducer can produce the formation of protein aggregates formed by misfolding proteins, known as "inclusion bodies." The formation of these inclusion bodies can produce stress in the bacteria culture reducing the metabolic activity and therefore reducing isobutanol production.⁴⁰⁻⁴⁵

The aim of this work is to check the capacity of *S. blattae* (p424IbPSO) to produce isobutanol from glucose operating in resting cells, which has not yet been reported in literature. Operating conditions for the stage of biomass growth are going to be studied: temperature, medium composition (YE, ammonium and IPTG concentrations) and also the growth time at which the cells are collected. Taguchi optimization methodology is going to be used for this objective.

Materials and Methods

Bacterial strain and experimental procedure

S. blattae strain (p424IbPSO) was used to perform all experiments of this study.¹ Cells were stored at -80°C in 50% w/w glycerol/saline serum media prior to inoculation.

All runs have been carried out using preinoculum and inoculum steps, to obtain cells always in the same metabolic state to get reproducible results. These previous steps were performed in 250 mL flasks containing 50 mL of M92X minimal liquid medium at 37°C in an orbital shaker at 250 rpm during 12 and 3 h, respectively.

M92X medium was used in all the growth runs. This medium is formed by 2 g NH₄Cl, 6 g KH₂PO₄, 12 g Na₂HPO₄, 1 g NaCl, 0.246 g MgSO₄·7H₂O, 0.011 g CaCl₂ per liter. This medium was supplemented with yeast extract (YE) added in different concentrations (0 to 1.5 g L⁻¹), 36 g L⁻¹ of glucose as carbon source and 1 mL L⁻¹ of a 1000X mixture of trace elements (containing nitrile-tri-acetic acid 1.5 mg, MgSO₄·7H₂O 3 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.18 mg, CuSO₄·5H₂O 0.01 mg, MnSO₄·2H₂O 0.5 mg, NaCl 1 mg, FeSO₄·7H₂O 0.1 mg, CoSO₄·7H₂O 0.18 mg, NaSeO₃·5H₂O 0.3 mg, KAl(SO₄)₂·12H₂O 0.02 mg, H₃BO₃ 0.01 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 mg, NiCl₂·6H₂O 0.025 mg, per liter). Streptomycin sulfate was used as antibiotic for plasmid maintenance using a concentration of 50 µg mL⁻¹.

Growth step. The growth step was performed in 250 mL flasks containing 50 mL of the medium previously cited being supplemented with IPTG as inducer; three concentrations were used of this inducer: 0.1, 0.5, and 1 mM. Nitrogen concentration was also varied using different YE concentration, at three levels: 0, 0.5, and 1.5 g L⁻¹, and ammonium concentration, as inorganic nitrogen source, also at three levels: 0.7, 1, and 1.4 g L⁻¹. Three different temperatures (25°C, 30°C, and 35°C) were considered.

All the growth experiments were carried out in orbital shaker at 200 rpm under aerobic conditions.

Resting cell assays. Resting cell assays were performed in 130 mL screw bottles containing 20.5 mL of citrate buffer, 65 mM of molar strength and pH 6.5. This buffer was supplemented with 36 g L⁻¹ of glucose. The cells were obtained from growth broth by two successive centrifugations at 9000 rpm (13 131 g) during 5 min, between these centrifugations cells were washed with citrate buffer 65 mM of molar strength and pH 6.5. In all the resting cell assays, the same conditions were used: an initial biomass concentration of 1 g L⁻¹, a temperature of 30°C, in orbital shaker at 200 rpm. Screw bottles were used to avoid isobutanol evaporation.

Analytical methods

The concentration of biomass was calculated measuring the optical density at 600 nm in a Shimadzu UV-visible spectrophotometer (UV-1603). Previously calibration of the dry cell mass (DCM), obtained at 105°C until constant weight, and optical density was performed, obtaining the following equation:

$$DCM = 0.49 \times A_{600}. \quad (1)$$

Carbon substrate (glucose), the main product (isobutanol), and by-products (lactate, acetate, and ethanol) concentrations were determined by HPLC, using an Agilent 1100 series coupled to a Waters 2414 Refractive Index Detector (RID). A Rezex ROA-Monosaccharide H+ (8%) column (300 × 7.8 mm, Phenomenex) was used. The volume of sample injection was 5 µL. H₂SO₄ 1 mM was used as a mobile phase at 0.5 mL min⁻¹ flow rate. The temperature of the column was kept at 80°C and the RID operated at 54°C.

For qualitative enzyme concentration determination, protein analysis was performed by gel electrophoresis (PAGE-SDS) using a 10% acrylamide gel, according to the following procedure: 1 mL of culture was centrifuged at 13,000 rpm during 3 min, the pellet was then suspended in an electrophoresis buffer, formed by Tris-HCl 20 mM and NaCl 150 mM, at a pH of 7.5 to obtain concentrated sampled at 13 g L⁻¹ of biomass. Afterward, 2.5 µL of this concentrated was used together with 4 µL of charge buffer, containing per 100 mL 4× solution, Tris-HCl 2.5 M pH 6.8 10 mL, glycerol (87%) 9.2 mL, SDS 20% 40 mL, bromophenol blue (0.2%) 0.02 mL, β-mercaptoethanol 10 mL, and ddH₂O 30.8 mL. Coomassie blue stain containing 80 mg per liter of coomassie stain, 3.5 mL of HCl at 10 M and ddH₂O was used as dye gel. Electrophoresis buffer used contained 30.82 g L⁻¹ Tris-base, 144.13 g glycine, 10 g SDS, and ddH₂O. Blue Star Prestained Protein Marker (Nippon Genetics) was used as standard sample.

Cells from different experiments were observed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL JEM-1010 and the images were taken with a camera Gatan Model

782 (Erlangshen ES500W). The samples were prepared as described in a previous work.⁴⁶

Experimental design and statistical analysis

Taguchi experimental design is a robust method to optimize industrial process conditions.⁴⁷ This method allows to reduce experimental assays by means of a normal design array.⁴⁸ The Taguchi method has been used to determine the optimal conditions for bacterial growth to be used for isobutanol production by resting cells. Factors considered were temperature, yeast extract, inorganic nitrogen, and IPTG concentrations. These factors were studied at three different levels and for three metabolic growth stages (two in the exponential growth stage and one at the stationary stage).

To study the influence of four variables at three levels, a standard L9 orthogonal matrix was used, which entails making only nine trials. The experimental matrix is shown in Table 1. The response considered has been the percentage attainment of theoretical maximum yield (PTMY) defined later on.

The Taguchi method allows to establish the influence of the variables over the responses through the ratio analysis of signal-to noise ratio (SNR), which means the relation of the mean to normal deviation. In this study, SNR was defined as the larger the better, estimated by the following equation:

$$SNR = -10 \log\left(\frac{1}{n}\right) \times \left(\frac{1}{y_i^2}\right). \quad (2)$$

The results were analyzed using the software Statgraphics XVII, which was used to calculate the SNR values for all levels for each factor, and the average value of SNR.

Results and Discussion

As indicated above, the factors considered in the experimental design were temperature, YE, ammonium, and IPTG concentrations. Temperature is an important variable for bacterial growth (Factor A) affecting the growth rate and enzyme production. The concentrations of the nitrogen sources in the culture media are also factors that should be taken into account; both the YE concentration, as organic nitrogen source (Factor B), and the inorganic nitrogen source concentration, ammonium chloride (Factor C), have been also considered. The influence of IPTG concentration (Factor D) as inducer is another factor to be studied, because a reduction in IPTG concentration could be economically relevant at industrial scale.

The three levels considered for each factor are shown in Table 1. All the runs were repeated using cells of three different growth stages, as previously indicated.

The isobutanol yield was calculated according to the following equation:

$$Y_{Ib/Gc} = C_{Ib}/C_{Gc}. \quad (3)$$

The percentage attainment of theoretical maximum yield (PTMY) was calculated according to:

$$PTMY = (Y_{Ib/Gc}/TMY) \times 100, \quad (4)$$

where TMY is the theoretical maximum yield. The TMY value on this bioprocess is $0.411 \text{ g}_{Ib} \text{ g}_{Gc}^{-1}$, referred to the

maximum quantity of glucose that can be converted into isobutanol; this quantity was calculated by electron balances according to Doran.⁴⁹

As indicated above, the bioprocess was carried out by resting cells. The cells were collected at different growth times: (1) cells obtained in the first half exponential growth, when cultures have about 0.7 g L^{-1} of biomass concentration; (2) cells from the second half exponential growth, when cultures achieve a concentration around 1.75 g L^{-1} ; and (3) cells on the stationary stage, when cultures reach a biomass concentration around 2.30 g L^{-1} .

The results, as the percentage attainment of theoretical maximum yield (PTMY) are given in Table 1. The influence of each one of the factors or variables studied can be seen in Figure 1.

As can be observed, PTMY values are better in the first stages of bacteria growth, and these values decrease as bacteria get older. PTMY values moving up about 50 in the first half of exponential growth stage to 33 in the second half of exponential growth stage, and only 24 with cells of the stationary stage. Accordingly, the results obtained with cells from the stationary phase were dropped for statistical study.

In Figure 2, the signal-to-noise ratio (SNR) values are given in bars and the average of these values in lines. In this way, it can easily be seen when the SNR values exceeding the SNR average. In this case, the best result is the highest value, the larger the better. As can be seen in this figure, when cells with the lowest growth time are used (a-d plots), the optimal temperature (Factor A) is 30°C (level 2). In addition, 1.5 g L^{-1} of YE (Factor B, level 3) and 1.4 g L^{-1} of ammonium salts (Factor C, level 3) are the best concentrations for both nitrogen sources to obtain high isobutanol producer cells.

On the other hand, for IPTG (Factor D) the results are similar for all the concentrations studied, being the values of SNR very close to that of SNR average. Accordingly, because no remarkable differences among the three concentrations of IPTG are obtained, the lowest concentration can be used.

Temperature and nitrogen sources concentrations are the variables showing a larger effect over metabolic activity. It is possible that, for cells of short growth time, the nitrogen sources could be more important than temperature since these sources affect growth more directly, and it is also expected that IPTG concentration have less influence at short times of growth.

In the case of the cells obtained in the second half of exponential growth stage, the results of SNR and average of SNR for all factors and levels are also shown in Figure 2 (e-h plots). In this case, the largest SNR value is obtained for a temperature of 30°C (level 2); it is remarkable that the SNR value for 25°C also exceeds the SNR average, but is lower than the value for 30°C . For nitrogen sources, the largest SNR value is obtained for 0.5 g L^{-1} of YE and 0.7 g L^{-1} of ammonium concentrations. In the case of Factor D, IPTG concentration, the largest SNR value is obtained at 1 mM (Level 3). It seems that nitrogen source concentrations and temperature are the more influencing variables for the cells of this growth stage; nevertheless, the correct folding of the enzymes can also be important. As is well known, this folding is influenced by several variables; among them, the temperature and the IPTG concentration. At higher temperatures, when IPTG is used for induction, the folding of enzymes can fail, and this fact can produce stress in bacteria, which can generate the partial or total inhibition in resting cells due to the toxicity of the inclusion bodies.

As previously stated, for stationary growth stage cells, the SNR the larger the better was not achieved because (as can be observed in Table 1) the PTMY values are worse than

Table 1. Factors, Levels, and Runs of L9 Orthogonal Matrix Experimental Design

RUN	Factor A		Factor B		Factor C		Factor D		PTMY
	Temperature		Yeast extract		Ammonium		IPTG		
	Level	T (°C)	Level	C _{YE} (g L ⁻¹)	Level	C _{NH₄⁺} (g L ⁻¹)	Level	C _{IPTG} (mM)	
1	1	25	1	0	1	0.7	1	0.1	23.7 ± 1.3
2	1	25	2	0.5	2	1	2	0.5	24.2 ± 1.2
3	1	25	3	1.5	3	1.4	3	1	42.0 ± 1.2
4	2	30	1	0	2	1	3	1	41.4 ± 2.0
5	2	30	2	0.5	3	1.4	1	0.1	50.3 ± 0.6
6	2	30	3	1.5	1	0.7	2	0.5	44.4 ± 0.6
7	3	35	1	0	3	1.4	2	0.5	34.7 ± 2.0
8	3	35	2	0.5	1	0.7	3	1	26.1 ± 2.0
9	3	35	3	1.5	2	1	1	0.1	30.1 ± 2.1
10	1	25	1	0	1	0.7	1	0.1	23.1 ± 1.3
11	1	25	2	0.5	2	1	2	0.5	21.2 ± 1.3
12	1	25	3	1.5	3	1.4	3	1	28.1 ± 2.0
13	2	30	1	0	2	1	3	1	23.3 ± 0.9
14	2	30	2	0.5	3	1.4	1	0.1	26.2 ± 2.1
15	2	30	3	1.5	1	0.7	2	0.5	24.8 ± 3.0
16	3	35	1	0	3	1.4	2	0.5	21.0 ± 2.1
17	3	35	2	0.5	1	0.7	3	1	33.3 ± 1.1
18	3	35	3	1.5	2	1	1	0.1	13.5 ± 3.1
19	1	25	1	0	1	0.7	1	0.1	17.7 ± 1.9
20	1	25	2	0.5	2	1	2	0.5	10.1 ± 2.1
21	1	25	3	1.5	3	1.4	3	1	12.0 ± 2.0
22	2	30	1	0	2	1	3	1	13.4 ± 3.3
23	2	30	2	0.5	3	1.4	1	0.1	18.9 ± 4.1
24	2	30	3	1.5	1	0.7	2	0.5	24.4 ± 1.2
25	3	35	1	0	3	1.4	2	0.5	12.3 ± 4.4
26	3	35	2	0.5	1	0.7	3	1	0.0 ± 0.0
27	3	35	3	1.5	2	1	1	0.1	8.1 ± 1.9

Runs 1-9 carried out with cells collected in the first half of exponential growth stage. Runs 10-18 carried out with cells collected in the second half of exponential growth stage. Runs 19-27 runs carried out with cells collected in the stationary stage.

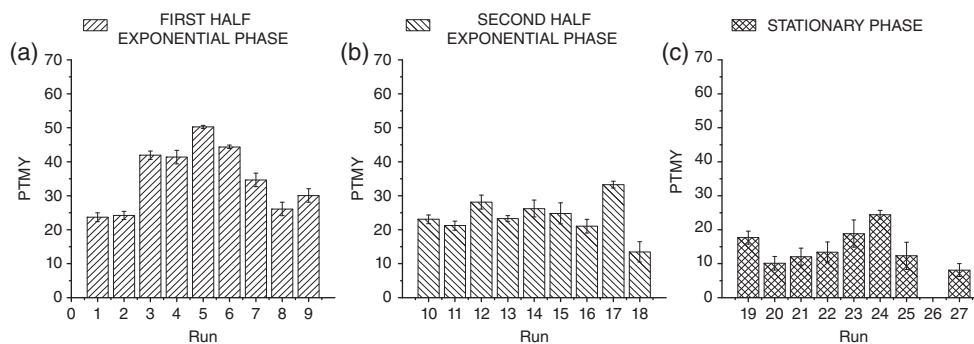


Figure 1. Percentage attainment of theoretical maximum yield (PTMY) in cell activity tests for: (a) Cells collected in the first half of exponential growth. (b) Cells collected in the second half of exponential growth. (c) cells collected in stationary stage.

the values for the other growth stages. Also in Figure 1, it can be observed a depletion of enzymatic activity for cells with higher growth times; this fact can also be due to the lack of folding of the enzymes produced by inclusion bodies.

With respect to the influence of temperature, it must be taken into account that at low growing temperatures (25°C and 30°C), alcohol dehydrogenase enzymes are more active.²⁸ In addition, it is well known that higher temperatures produce a reduction of unsaturated fatty acids in the membrane; this reduction has been attributed to cell stress,⁵⁰ provoking a reduction in the production of isobutanol. In addition, several authors have claimed that high growth temperature can produce inclusion bodies, which can provoke inhibition in bacteria, explaining the fact that at longer times the cells are worse isobutanol producers.⁴⁰⁻⁴⁵

In a similar way, at high IPTG concentrations, inclusion bodies can also be produced, which entails a reduction of

metabolic activity caused by stress. In this study, it can clearly be established that for short growth time cells, IPTG concentration does not have a remarkable influence over the resting cells culture behavior. However, for long growth times, the resting cells are less active, and isobutanol production is worse when high IPTG concentrations are used. This fact can again be caused by inclusion bodies formation, producing bacteria stress and a possible inhibition.⁴⁵

Finally, to check the best results, some confirmation runs were conducted with cells from both growth stages, first half and second half of exponential growth curve. Three runs were carried out with cells from each one of these two growth stages; in all runs the best level for the three first factors (temperature, yeast extract, and ammonium concentration) were maintained, only the last factor (IPTG concentration) was changed to determine if the IPTG concentration used has any effect over isobutanol production in resting cells. The

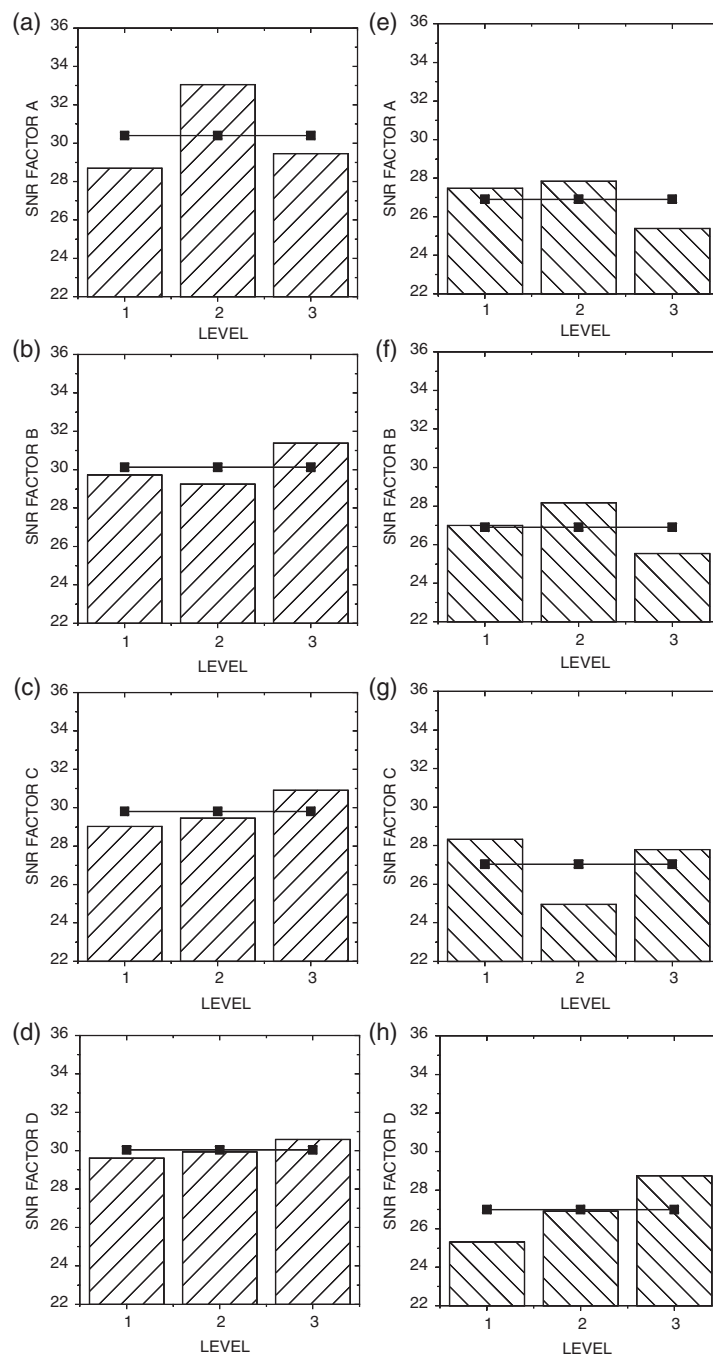


Figure 2. SNR (bars) and SNR average (lines) of Taguchi analysis, for all factors and levels of cells collected at first half of exponential growth (a to d plots) and the second half of exponential growth (e to h plots).

operating conditions used and the results obtained on these six runs are given in Table 2.

In the case of cells collected in the first half of the exponential growth stage, the higher PTMY value obtained is 46.2 ± 4.3 , in run C2, which was performed at 30°C (Factor A, level 2), with 1.5 g L^{-1} of YE concentration (Factor B, level 3), 1.4 g L^{-1} of ammonium concentration (Factor C, level 3), and 0.5 mM of IPTG concentration (Factor D, level 2). In run C3, containing 1 mM of IPTG, the PTMY value is similar to that obtained on the C2 run, 45.1 ± 3.6 . Only the result of run C1, with 0.1 mM of IPTG, is somewhat worse, being the PTMY value 40.6 ± 3.2 , although both values are similar if the error is taken into account.

When the cells were collected in the second half of the exponential growth stage, a value of PTMY of $33.0 \pm 1.5\%$ was obtained in the run C4, which was performed at 30°C (Factor A, level 2), with 0.5 g L^{-1} of YE (Factor B, level 2), 0.7 g L^{-1} of ammonium (Factor C, level 1), and 0.1 mM of IPTG (Factor D, level 1) concentrations. With cells of this growth stage, the IPTG concentration has no effect over the isobutanol production in resting cells, because similar results are obtained in runs C5 and C6, as can be seen in Table 2. According to what was previously commented, for short times of bacteria growth, nitrogen source concentrations and temperature were the more important variables to obtain a high quantity and quality biomass for resting cell production.

Table 2. Confirmation Runs

Run	Factor A		Factor B		Factor C		Factor D		PTMY
	Temperature		Yeast extract		Ammonium		IPTG		
	Level	T (°C)	Level	C _{YE} (g L ⁻¹)	Level	C _{NH₄⁺} (g L ⁻¹)	Level	C _{IPTG} (mM)	
C1	2	30	3	1.5	3	1.4	1	0.1	40.6 ± 3.2
C2	2	30	3	1.5	3	1.4	2	0.5	46.2 ± 4.3
C3	2	30	3	1.5	3	1.4	3	1	45.1 ± 3.6
C4	2	30	2	0.5	1	0.7	1	0.1	33.0 ± 1.5
C5	2	30	2	0.5	1	0.7	2	0.5	32.1 ± 1.1
C6	2	30	2	0.5	1	0.7	3	1	32.9 ± 1.1

C1-C3 runs correspond to cells collected in the first half of exponential growth stage and C4-C6 runs correspond to cells collected in the second half of exponential growth stage.

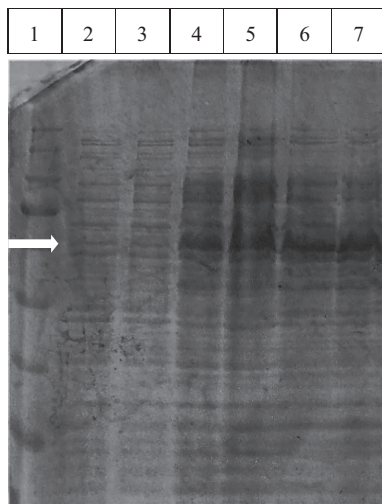


Figure 3. Total protein electrophoresis PAGE-SDS. Bands: 1-BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics); 2-Total proteins from initial time culture of run 5 of Table 1; 3-Total proteins from initial time culture of run 26 of Table 1; 4-Total proteins from 7 h of culture of run 5; 5-Total proteins from 7 h of culture of run 26; 6-Total proteins from 24 h of culture of run 5; 7-Total proteins from 24 h of culture of run 26. The arrow indicates the zone of the enzymes of isobutanol pathway.

To check if some differences between the cells producing the best and the worst results on isobutanol production could be observed, electrophoresis SDS-PAGE of total proteins was performed with cells obtained in both cases. Electrophoresis results are given in Figure 3. As indicated above, the best results were obtained at 30°C (Factor A, level 2), with a medium containing 0.5 g L⁻¹ of YE (Factor B, level 2), 1.4 g L⁻¹ of ammonium (Factor C, level 3), and 0.1 mM of IPTG (Factor D, level 1), and with cells collected at short growth times. The worst results were reached at 35°C (Factor A, level 3), with a medium containing 0.5 g L⁻¹ of YE (Factor B, level 2), 0.7 g L⁻¹ of ammonium (Factor C, level 1), and 1 mM of IPTG (Factor D, level 3), and with cells collected at the stationary growth stage. According to the electrophoresis results, it can be observed that the expressions of the enzymes are similar for both experiments. Nevertheless, the PTMY values were different; in the case of the best conditions, PTMY has a value of about 50; however, for the worst conditions, this value is practically 0. These differences can be explained taking into account that the electrophoresis was performed only for total proteins, soluble and insoluble proteins. Insoluble proteins formed inclusion bodies were not

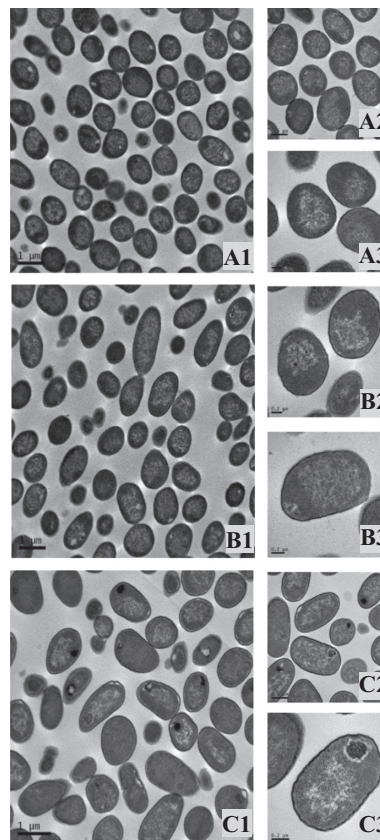


Figure 4. Cell pictures obtained by TEM. A1, A2, and A3: cells from control culture at 35°C of temperature without IPTG. B1, B2, and B3: cells from run 5, carried out at 30°C and 0.1 mM of IPTG concentration. C1, C2, and C3: cells from run 26, performed at 35°C and 1 mM of IPTG concentration. Inclusion bodies can be observed only in the cells in C1, C2, and C3 pictures. For A1, B1, and C1; A2, B2, and C2; A3, B3, and C3 scale bars correspond to 1, 0.2, and 0.2 μm, respectively.

determined. It is possible that this qualitative results point out that for higher temperature and higher concentration of IPTG as inducer, and longer exposure times, the formation of inclusion bodies takes place significantly, and, as indicated above, this fact can produce cell stress reducing the metabolic activity and the isobutanol production. In Figure 4 different pictures of three cultures performed with different temperatures and IPTG concentrations are shown. As can be seen in pictures A1, A2, and A3, there are cells in a run carried out as control culture at 35°C of temperature and without IPTG. In pictures B1, B2, and B3 cells from run 5 of Table 1 are shown; in this case, the cells

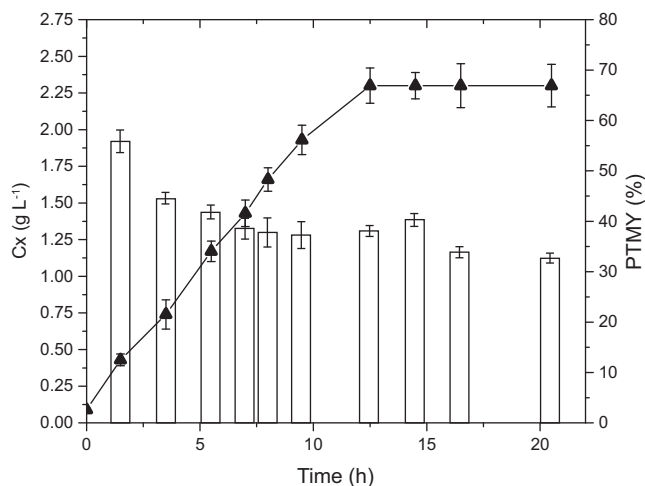


Figure 5. Results of growth (C_x) (points and line) and PMTY values (bars) obtained in resting cells. Cells collected at different growth times under the best operational conditions previously determined.

were cultured at 30°C of temperature using a concentration of 0.1 mM of IPTG. Pictures C1, C2, and C3 show cells from run 26 of Table 1; in this case, the culture conditions were 35°C of temperature and 1 mM of IPTG. All cells were collected in the stationary phase for TEM observation. As can be seen, cells from run 5 do not have inclusion bodies, while cells from run 26 present inclusion bodies. Previously it was described that cells grown at higher temperature and higher IPTG concentration are less active in resting cells. Thus, this is a confirmation of the possible negative action of the inclusion bodies. This can also explain the fact that although the concentrations of total enzymes for the two experiments were the same, the cells of run 5 have well folded enzymes and are fully active, and in the case of run 26 the folding of proteins is erroneous and form inclusion bodies that could result in inhibition on the production of isobutanol.

On the other hand, trying to confirm that when cells get older their activities are reduced and the isobutanol production in resting cells decreases, cells were cultured under the best conditions previously determined; then the cells were collected at different growth times, and finally the cells were cultured in resting cell measuring the isobutanol produced. The results are given in Figure 5. It can be observed that, if the cells are collected at short times the results are better than when cells are collected at longer growth times. When cells are collected at a growth time of about 2 h, a PMTY value around 60 is obtained, much higher than when cells get older and their yield is reduced to values around 30.

Conclusions

The capacity of *S. blattae* (p424IbPSO) to produce isobutanol in resting cell cultures has been proved. Growth time of resting cells culture and the growth operating conditions have been optimized. Cells are more active when collected at earlier growth times. Inclusion bodies can be responsible for the activity reduction. About 60% attainment of TMY was reached in resting cell cultures using the best conditions: cells cultured in a medium with 1.5 g L⁻¹ of yeast extract, 1.4 g L⁻¹ of ammonium, 0.5 mM of IPTG, and at 30°C of temperature, with the cells collected at 2 h of growth time. For

industrial production and scale-up, the reduction of the concentrations of some compounds, such as YE and IPTG, is very interesting to reduce economic costs. In addition, the temperature reduction of 7°C, from the usually used in this bioprocess, may also be economically relevant. Moreover, the production with resting cell can be useful in order to reuse bacteria cultures.

Acknowledgments

This work has been supported by MINECO under contract CTQ2013-45970-C2-1-R, the grant for one of the authors (MGA) with reference BES-2014-068344 is gratefully recognized.

Nomenclature

A_{600}	Absorbance at 600 nm
DCM	dry cell mass (g L ⁻¹)
C_j	Concentration of compound j (g L ⁻¹)
M9	minimal salts medium (M92X = medium with double concentration of salts)
n	number of runs
PMTY	percentage attainment of theoretical maximum yield.
SNR	signal-to-noise ratio
TMY	theoretical maximum yield
Y	yield
YE	yeast extract

Underscripts

Gc	referred to consumed glucose (g L ⁻¹)
Ib	referred to isobutanol
X	referred to biomass
0	Initial value

Literature Cited

- Felpeto-Santero C, Rojas A, Tortajada M, Galan B, Ramon D, Garcia JL. Engineering alternative isobutanol production platforms. *AMB Express*. 2015;5(32):1–9.
- Desai SH, Rabinovitch-Deere CA, Fan ZL, Atsumi S. Isobutanol production from cellobionic acid in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories*. 2015;14(52):1–10.
- Desai SH, Rabinovitch-Deere CA, Tashiro Y, Atsumi S. Isobutanol production from cellobiose in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(8):3727–3736.
- Solomon BD. Biofuels and sustainability. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1185(1):119–134.
- Fava F, Ohtake H, Pesaresi P. Biotechnology for a more sustainable environment decontamination and energy production. *J Biotechnol*. 2012;157(4):443–445.
- Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*. 2008;451(7174):86–89.
- Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Factories*. 2010;9:3.
- Jang Y-S, Kim B, Shin JH, Choi YJ, Choi S, Song CW, Lee J, Park HG, Lee SY. Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(10):2437–2459.
- Atsumi S, Liao JC. Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(5):414–419.
- Atsumi S, Cann AF, Connor MR, Shen CR, Smith KM, Brynildsen MP, Chou KJY, Hanai T, Liao JC. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*. 2008;10(6):305–311.

11. Connor MR, Liao JC. Engineering of an *Escherichia coli* strain for the production of 3-Methyl-1-Butanol. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(18):5769–5775.
12. Connor MR, Liao JC. Microbial production of advanced transportation fuels in non-natural hosts. *Curr Opin Biotechnol.* 2009; 20(3):307–315.
13. Gronenberg LS, Marcheschi RJ, Liao JC. Next generation biofuel engineering in prokaryotes. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17(3): 462–471.
14. Atsumi S, Li Z, Liao JC. Acetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as a 2-ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(19):6306–6311.
15. Bastian S, Liu X, Meyerowitz JT, Snow CD, Chen MMY, Arnold FH. Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2011;13(3): 345–352.
16. Trinh CT, Li J, Blanch HW, Clark DS. Redesigning *Escherichia coli* metabolism for anaerobic production of isobutanol. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(14):4894–4904.
17. Li S, Wen J, Jia X. Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(3):577–589.
18. Blombach B, Riester T, Wieschalka S, Ziert C, Youn JW, Wendisch VF, Eikmanns BJ. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(10):3300–3310.
19. Smith KM, Cho K-M, Liao JC. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(3):1045–1055.
20. Chen X, Nielsen KF, Borodina I, Kielland-Brandt MC, Karhumaa K. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnol Biofuels.* 2011;4(21):1–12.
21. Kondo T, Tezuka H, Ishii J, Matsuda F, Ogino C, Kondo A. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* 2012;159(1–2):32–37.
22. Park S-H, Kim S, Hahn J-S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(21): 9139–9147.
23. Li X, Yang R, Ma M, Wang X, Tang J, Zhao X, Zhang X. A novel aldehyde reductase encoded by YML131W from *Saccharomyces cerevisiae* confers tolerance to furfural derived from lignocellulosic biomass conversion. *Bioenergy Res.* 2015;8(1):119–129.
24. Ida K, Ishii J, Matsuda F, Kondo T, Kondo A. Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Factories.* 2015;14(9):1–9.
25. Matsuda F, Ishii J, Kondo T, Ida K, Tezuka H, Kondo A. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb Cell Factories.* 2013;12(11):1–11.
26. Matsuda F, Kondo T, Ida K, Tezuka H, Ishii J, Kondo A. Construction of an Artificial Pathway for Isobutanol Biosynthesis in the Cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Bioch.* 2012;76(11):2139–2141.
27. Higashide W, Li Y, Yang Y, Liao JC. Metabolic Engineering of *Clostridium cellulolyticum* for Production of Isobutanol from Cellulose. *Appl Environ Microbiol.* 2012;77(8):2727–2733.
28. Baez A, Cho K-M, Liao JC. High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with in situ product removal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(5): 1681–1690.
29. Brynildsen MP, Liao JC. An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2009;5(277):1–13.
30. Grimaldi J, Collins CH, Belfort G. Toward cell-free biofuel production: Stable immobilization of oligomeric enzymes. *Biotechnol Prog.* 2014;30(2):324–331.
31. Acedos MG, Ramon A, De la Morena S, Santos VE, Garcia-Ochoa F. Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions. *Biochem Eng J.* 2018;133:21–27.
32. Carvalho F, Marques MPC, de Carvalho C, Cabral JMS, Fernandes P. Sitosterol bioconversion with resting cells in liquid polymer based systems. *Bioresour Technol.* 2009;100(17):4050–4053.
33. Kumar V, Sankaranarayanan M, K-e J, et al. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1, 3-propanediol from glycerol using resting cells of recombinant *Klebsiella pneumoniae* J2B strain overexpressing aldehyde dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96(2):373–383.
34. H. del Olmo C, Santos Mazorra V, Alcon A, Garcia-Ochoa F. Production of a Rhodococcus erythropolis IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of operational conditions. *Biochem Eng J* 2005; 22:229–237.
35. Martin AB, Alcon A, Santos VE, Garcia-Ochoa F. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuel.* 2005;19(3):775–782.
36. Mutafov S, Angelova B, Avramova T, Boyadjieva L, Dimova I. The inducibility of 9 α -steroid hydroxylating activity in resting *Rhodococcus* sp. cells. *Process Biochem.* 1997;32(7):585–589.
37. Cánovas M, García V, Bernal V, Torroglosa T, Iborra JL. Analysis of *Escherichia coli* cell state by flow cytometry during whole cell catalyzed biotransformation for l-carnitine production. *Process Biochem.* 2007;42(1):25–33.
38. Cotter JL, Chinn MS, Grunden AM. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009;32(3):369–380.
39. Yamamoto S, Suda M, Niimi S, Inui M, Yukawa H. Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(11):2938–2948.
40. Ferrer M, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshin PN. Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* Strain. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8): 4499–4504.
41. Pope WH, Haase-Pettingell C, King J. Protein folding failure sets high-temperature limit on growth of phage p 22 in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(8):4840–4847.
42. Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):179–185.
43. Bednarska NG, Schymkowitz J, Rousseau F, Van Eldere J. Protein aggregation in bacteria: the thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology-SGM.* 2013;159:1795–1806.
44. Strandberg L, Enfors SO. Factor influencing inclusion body formation in the production of a fusel protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57(6):1669–1674.
45. Sriubolmas N, Panbangred W, Sriurairatana S, Meevootisom V. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;47(4):373–378.
46. Alcon A, Santos VE, Casas JA, Garcia-Ochoa F. Use of flow cytometry for growth structured kinetic model development: Application to *Candida bombicola* growth. *Enzym Microb Technol.* 2004;34(5):399–406.
47. Jeyapaul R, Shahabudeen P, Krishnaiah K. Quality management research by considering multi-response problems in the Taguchi method – a review. *Int J Adv Manuf Technol.* 2005;26(11): 1331–1337.
48. Taguchi G, Organization AP. *Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes.* Tokyo, The Organization; 1986.
49. Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles.* Oxford, Elsevier Science; 2012.
50. Balamurugan S. Growth temperature associated protein expression and membrane fatty acid composition profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Basic Microbiol.* 2010;50(6):507–518.

Publicación 5

- **Autores:** Miguel G. Acedos, Andrea Hermida, Emilio Gómez, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.
- **Título:** Effects of Fluid-dynamic Conditions in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) Cultures in Stirred Tank Bioreactors: Hydrodynamic Stress and Change of Metabolic Routes by Oxygen Availability
- **Revista:** Biochemical Engineering Journal. Aceptado el 21 de mayo de 2019.
- **Índice de impacto** (2017): 3,226
- **Categoría:** Ingeniería Química (Q1), Biotecnología y Microbiología Aplicada (Q2).
- **Enlace:** <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107238>
- **Resumen:** En este trabajo el objetivo principal es el estudio de la influencia y la optimización de las condiciones fluido-dinámicas en STBR para la obtención de biomasa con alta capacidad de producción de isobutanol en estado de *resting cells*. Para ello, se llevan a cabo siete experimentos modificando la agitación (100-1200 rpm), con un caudal de aire constante (1 vvm), modificando así el valor de la OTR. En primer lugar, se lleva a cabo el ajuste del crecimiento con la ecuación logística. Estos resultados muestran la aparición de estrés hidrodinámico para los experimentos llevados a cabo a velocidades de agitación superiores a 800 rpm. Por otro lado, se evalúa la viabilidad celular, la cual se ve comprometida a partir de 800 rpm. También se lleva a cabo la observación de células mediante tinción negativa por microscopía electrónica de transmisión, lo que apoya dichos resultados. A partir de 800 rpm, las células aparecen agregadas, dañadas y con una cierta elongación. Por otro lado, modificando de los valores de OTR y OUR se ve una distribución de metabolitos distinta para cada valor de OTR, durante la etapa de crecimiento, demostrando que el oxígeno tiene una gran influencia en la evolución del proceso. Un aumento de la velocidad de agitación provoca un aumento de OTR y OUR, cambiando las rutas metabólicas favorecidas y, en consecuencia, la distribución de productos. Por otro lado, se llevan a cabo test de producción con células en estado de *resting cells* para los experimentos realizados a cada agitación con células recolectadas a dos tiempos distintos, primera mitad de la fase exponencial de crecimiento y segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento. Las células cultivadas bajo diferentes condiciones fluido-dinámicas presentan un comportamiento diferente cuando se emplean en el test establecido para cuantificar la

producción empleando células en estado de *resting cells*. Los diferentes test de *resting cells* se llevan a cabo en las mismas condiciones experimentales, sin embargo, las células muestran un comportamiento similar al detectado en la etapa de crecimiento, en cuanto a la distribución de metabolitos se refiere. Para OTR altos, además, se ve una disminución en la producción de todos los metabolitos durante el crecimiento y también en el test de *resting cells*, lo cual pone de manifiesto el efecto negativo que puede tener el oxígeno a concentraciones elevadas.



Regular article

Effects of fluid-dynamic conditions in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) cultures in stirred tank bioreactors: Hydrodynamic stress and change of metabolic routes by oxygen availability



Miguel G. Acedos, Andrea Hermida, Emilio Gomez, Victoria E. Santos, Felix Garcia-Ochoa*

Chemical & Materials Engineering Department, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Hydrodynamic stress is detected and the influence on growth rate determined.
- Oxygen availability has a significant influence on metabolite production.
- OTR-OUR value changes the metabolic routes and the product distribution.
- Metabolic changes are also detected in resting cells cultures depending on hydrodynamics.

ARTICLE INFO

Keywords:

Hydrodynamic stress
Oxygen availability
Metabolite distribution
Shimwellia blattae
Stirrer tank bioreactor
Resting cells

ABSTRACT

Cultures of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) under different fluid dynamic conditions have been studied. Runs have been performed in a STBR changing the stirrer speed from 100 to 1200 rpm. Growth rates have been determined measuring biomass concentration with time. A kinetic model has been fitted to experimental data. Results show that hydrodynamic stress appears in experiments performed at high agitation, from 1000 to 1200 rpm. Moreover, cell viability has been measured by colony forming units, the hydrodynamic stress is evident from 800 rpm and a growth time of 15 h. In addition, metabolites produced during growth have been measured. The results point out that the oxygen availability has a big influence because the metabolite distribution clearly changes in runs carried out in conditions under which hydrodynamic stress does not appear yet but oxygen transfer rate has been increased. The increasing of stirrer speed provokes an increase in the oxygen transport and uptake rates, and in some cases, in the dissolved oxygen concentration, changing the metabolic routes favored and accordingly the product distribution. Moreover, cells cultured under different fluid dynamic and oxygen availability conditions present a different behavior when employed in resting cell showing, in general, a similar behavior to that detected in experiments employing growing cells.

1. Introduction

Industrial bioprocesses are carried out usually looking for good mixing and high mass and heat transfer rates. Accordingly, the power input into the bioreactors is high and mainly stirred tank bioreactors (STBR) are employed. Under these conditions, hydrodynamic stress due to shear forces can take place, which can produce different biological responses. First observations were made by Mark & Bronnenmeier [1,2], who together with Merchuck [3] were pioneers to present an extensive and narrative portrayal of the shear effects on cell cultures; Merchuk [3] pointed out that performance and scale-up of the bioprocesses depends ultimately on the effects of shear forces and mass

transfer on the kinetics of biomass growth and product formation and, therefore, in the control of the physiological state of the cell population.

In the last decades, many studies on the hydrodynamics and shear effects in cultures have been carried out, mostly with cell sensitive, such as filamentous fungi, and vegetal and animal cells [1,2,4–11]. Recently mechanisms by which cells convert mechanical stimulus into a chemical activity within the cell are collected in an encyclopedic chapter [12]. Many of these studies have been performed in devices designed to cultivate cells under well-defined, laminar or turbulent, flow conditions, such as viscometers, channels, jets and some bioreactors [1,2,4,10]. Nevertheless, at industrial scale, and also at laboratory scale, the bioreactors more usually employed are STBR: in these

* Corresponding author.

E-mail address: fgchoa@ucm.es (F. Garcia-Ochoa).<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107238>

Received 25 September 2018; Received in revised form 20 May 2019; Accepted 21 May 2019

Available online 22 May 2019

1369-703X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature		Greek letters	
α	Specific interfacial area (m)	γ	Shear rate (s^{-1})
C_j	Compound "j" concentration ($g L^{-1}$)	ε	Energy dissipation rate per unit mass ($W kg^{-1}$)
C_{O_2}	Oxygen concentration in the liquid phase ($mol L^{-1}$)	θ	Gas hold-up (-)
$C_{O_2}^*$	Saturation oxygen concentration in the liquid phase ($mol L^{-1}$)	λ_s	Kolmogorov's length scale (m)
DCM	Dry cell mass ($g L^{-1}$)	μ_L	Liquid viscosity (Pa s)
d_b	Diameter of air bubble (m)	μ_{max}	Specific maximum growth rate (h^{-1})
D	Stirrer diameter (m)	μ_w	Viscosity of water (Pa s)
D_L	Mass diffusion coefficient in liquid phase ($m^2.s^{-1}$)	ρ	Liquid density ($kg m^{-3}$)
DO	Dissolved oxygen	τ	Shear stress ($N m^{-2}$)
F	Molar flow rate ($mol.s^{-1}$)		
k_L	Mass transfer coefficient ($m s^{-1}$)	Underscripts	
$k_{L,a}$	Volumetric mass transfer coefficient (s^{-1})	AcA	referred to acetic acid
N	Stirrer speed (rpm or rps)	ave	referred to average value
OD ₆₀₀	Optical density at 600nm	CO ₂	referred to carbon dioxide
OTR	Oxygen transfer rate ($mol O_2 L^{-1} s^{-1}$)	Et	referred to ethanol
OUR	Oxygen up-take rate ($mol O_2 L^{-1} s^{-1}$)	Gc	referred to glucose
P_0	Power input in un-aerated systems (W)	Ib	referred to isobutanol
P/V	Power input per volume ($W (m^3)^{-1}$)	LaA	referred to lactic acid
Q	Gas flow rate ($m^3 s^{-1}$)	OxP	referred to high oxidation products
q_{O_2}	Specific oxygen consumption rate ($mol O_2 g_x^{-1} s^{-1}$)	O ₂	referred to oxygen
SD	Standard deviation	SuA	referred to succinic acid
V	Volume of liquid in the STBR vessel (L)	X	referred to biomass
Y_j	Compound "j" yield referred to consumed glucose ($g_j.g_{Gc}^{-1}$)		

bioreactors, stirrer speed is often mentioned as the sole cause of hydrodynamic stress [7,13,14]. Gas bubbling also can produce damage to sensitive cells [15], due to shear effects caused by airflow rate [10,11,16], also bursting bubbles [17–19] and anti-foaming agent [20] have been reported as stress inductors, although the cell damage is usually much smaller than that due to mechanical agitation, at least for bacteria cultures.

In STBR, the increasing of the agitation affects mixing, homogeneity, mass and heat transfer but also hydrodynamics, and then cell morphology, growth rate and metabolic routes can be affected, due to the changes on biochemical reaction and mass transfer rates. The interaction between mechanical forces and the cellular response is an intriguing subject and has undergone numerous investigations.

Several indicators have been used to describe the shear effects or the hydrodynamic stress supported by the cells, due to their impact on morphology [21–23], on growth rate [24,25] and on metabolite production. This can be due to a different distribution of energy flow can be induced or a different oxygen intracellular concentration, which can consequently alter metabolic pathways provoking different product distribution, usually yielding unwished by-products formation [22,26–28].

Most of the bioprocesses are aerobic, being oxygen a key substrate in the cell metabolism and in the product formation. Oxygen employed in the growth and metabolic activity of cells has an important effect on biomass duplication, on electron transport, on ATP availability, and in occasions on the product synthesis and even on cell morphology. Accordingly, recent works have confirmed that the oxygen supply to the culture is a very important variable affecting the performance and scale-up of the aerobic bioprocesses and, in fact, it is the most difficult condition to scale-up [22,25,29]. As a consequence of the increase of agitation or air flow rate looking for the mixing, homogeneity and mainly the oxygen mass transfer rate (OTR), the power input is going to increase, which can have several effects. The oxygen transfer rate will increase till the maximum value of the oxygen uptake rate (OUR) is reached; from that moment on, DO concentration into the broth will be increased. Then, some changes in metabolism may occur caused by the

excessive production of peroxides and free radicals in the biological system able to cause cell metabolic changes [5,30,31]. The excess of oxygen availability can have an important effect on the culture because it could change the metabolism of the cells and accordingly the product distribution. Thus, recent studies with bacterial cultures of *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida* and *Shimwellia blattae* have shown how the agitation and aeration rates influence cell growth and metabolite productivity [25,28,32].

Shimwellia blattae (p424IbPSO) is a genetically modified microorganism (GMO) able to produce high isobutanol concentrations from glucose [33]. In previous studies the influence of media composition, oxygen availability and pH on growth rate has been studied and the optimal operational conditions to perform the biotransformation have been described, obtaining about $11 g L^{-1}$ of isobutanol [34]. In this last work, the effect of available oxygen on carbon flux and product distribution was evident but not studied in depth. There is no systematic study of the effect of agitation and OTR on these cultures, both on growth and on product distribution as a consequence of favored metabolic routes.

The aim of this work is to study the effect of the fluid dynamic conditions on *S. blattae* (p424IbPSO) cultures in STBR, determining the hydrodynamic stress conditions and the effect of OTR-OUR in metabolite formation. Hydrodynamic conditions will be changed varying agitation; growth rate and viable cells will be evaluated, and a simple kinetic model will be employed to describe the growth rate, trying to relate the values of the kinetic parameters with the different hydrodynamic conditions used. On the other hand, in order to elucidate the influence of the OTR-OUR or oxygen availability, the metabolite production will be measured both during growth and also in resting cell operation, employing cells cultured under different fluid dynamic conditions.

2. Materials and methods

2.1. Biocatalyst and experimental procedure

S. blattae (p424IbPSO) was used as biocatalyst in this study [33]; the strain was supplied by the Environmental Biotechnology Laboratory of the Biological Research Center of Spain (CSIC). Cells were preserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a 50% w/w glycerol/saline serum media before inoculation. M92X culture medium was used for all experiments according to Acedos et al. [34], containing 2 g NH_4Cl , 6 g KH_2PO_4 , 12 g Na_2HPO_4 , 1 g NaCl , 0.246 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.011 g CaCl_2 per liter. This medium was supplemented with 1.5 g L^{-1} of yeast extract, 50 g L^{-1} of glucose as carbon source and 1 mL L^{-1} of a 1000X mixture of trace elements formulated as described elsewhere [34]. About $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin sulfate and 0.5 mM of IPTG were added to culture medium for plasmid maintenance and induction, respectively [34,35].

For inoculum build-up M92X culture medium, described above, was used. Pre-inoculum and inoculum steps were carried out in order to obtain cells in the same metabolic state and the reproducibility of the results. These steps were carried out in 250 mL conical flasks containing 50 mL of culture medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an orbital shaker at 250 rpm during 12 and 3 h, respectively. The experiments in STBR were performed using about 5% (v/v) of inoculum.

The experiments were carried out in a STBR, Biostat® B-Plus (Sartorius AG Germany), with 1.5 L of working volume. The STBR employed in this study consists in an un-baffled cylindrical vessel of height 20 cm and inner diameter 13.5 cm. The agitation was performed by two Rushtonturbines (5.3 cm of diameter and 6 blades) and an electrical motor (Kollmorgen 3ΦPM, Danher Motion, Chez Republic). The temperature used in bacterial growth was $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ [34]. The stirrer speed was modified from 100 to 1200 rpm. The air flow rate used was 1.5 L min^{-1} . The pH evolved freely from a 6.8 value and controlled in 6.0 value by adding $\text{NaOH } 2\text{ M}$ [34]. The pH was determined on line using a pH-sensor EasyFerm Plus K8 200 Hamilton (Switzerland). The dissolved oxygen (DO) concentration was measured on line using a polarographic sensor OxyFerm FDA Hamilton 160 (Switzerland). A combined oxygen and carbon dioxide sensor BioPAT® Xgas (Sartorius AG, Germany) was used for determining the composition of the outlet gas from the bioreactor. In addition, to prevent isobutanol evaporation cold traps ($-14\text{ }^{\circ}\text{C}$) were used to condense the isobutanol at the bioreactor gas outlet as explained elsewhere [35].

Resting cells tests were performed in sealed bottles containing 20.5 mL of citrate buffer at 65 mM of molar strength and 6.5 of initial pH, supplemented with 36 g L^{-1} of glucose. The biomass concentration was measured at different times in all the growth runs, and cells were separated by two consecutively centrifugations at 9000 rpm during 5 min. About 1 g L^{-1} of biomass was employed in the resting cell test. These tests were carried out at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in conical flasks agitated in orbital shaker at 200 rpm during 24 h.

2.2. Analytical methods

Biomass concentration was determined by measurement of optical density at 600 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-vis, Japan). The calibration of dry cell mass concentration (C_x), obtained by drying at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ until constant weight, and optical density at 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) is given by the following equation:

$$C_x (\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) = 0.489 \cdot \text{OD}_{600\text{nm}} \quad (1)$$

Moreover, the biomass viability was determined by viable plate count technique in samples obtained at several growth times in experiments carried out at different stirrer speeds. Agar-LB plates, supplemented with $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin sulfate, were seeded (three plates per sample) from diluted samples in saline serum and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 24 h. The biomass concentration was determined as colony forming units (CFU) per milliliter of culture broth.

Also, cell morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM) in the same samples. The samples were prepared by negative staining as described by Yakimov et al. [36].

The concentrations of glucose and the different products usually described in the literature in this bioprocess (isobutanol, ethanol, lactic acid, acetic acid and succinic acid) were determined by HPLC (Agilent technologies, 1100 series) using a refraction index detector (RID). A Rezex RHM-Monosaccharide- H^+ $300 \times 7.8\text{ mm}$ column (Phenomenex) was employed. The mobile phase was H_2SO_4 1 mM at 0.5 mL min^{-1} of flow rate. The sample volume injected was $5\text{ }\mu\text{L}$. The temperatures used for the column was $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ for RID. In a previous paper [35], it has been demonstrated that under aerobic conditions other products not previously reported are formed, mainly 3-oxo-1-buten-2-yl ether and isobutyric acid, detected and identified by GC-MS, HPLC-MS; the concentrations of these compounds, in this work, have been calculated by carbon balance.

The viscosity of the culture broth was determined at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ by capillary Cannon-Fenske Routine Viscometer (size 75; Comecta S.A., Barcelona, Spain) according to [37,38].

3. Theoretical background

3.1. Growth kinetic model

The bacterial growth rate has been described by an unstructured-unsegregated kinetic model used in numerous bioprocess studies [39–42], expressed by the following equation:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{\max} C_x \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{\max}} \right) \quad (2)$$

This equation can be integrated with the boundary condition ($t = 0$; $C_x = C_{x0}$), obtaining the logistic growth expression:

$$C_x(t) = \frac{C_{x0} \exp(\mu_{\max} t)}{1 - \frac{C_{x0}}{C_x^{\max}} [1 - \exp(\mu_{\max} t)]} \quad (3)$$

3.2. Volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) and hydrodynamic parameters

In order to obtain the volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) value for each experiment, a semi-empirical prediction method, successfully used in previous works, has been employed [43,44]. This method calculates k_L using the Kolmogoroff turbulence theory [45] and the surface renovation mass transfer model from Higbie [46], and a is determined employing semi-empirical equations, as follows:

Mass transfer coefficient values are estimated according to:

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \cdot \left(\frac{\varepsilon \cdot \rho}{\mu_L} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (4)$$

Interfacial area (a) values have been determined from the average bubble size (d_b) and the gas hold-up (θ), assuming the morphology of the bubbles to be spherical [47]:

$$a = \frac{6\theta}{d_b} \quad (5)$$

The average energy dissipation rate per mass unit (ε), the average bubble size (d_b) and the gas hold-up (θ), were evaluated according to that described in previous works [43,44].

In most of the turbulent mixing systems, the energy supplied into the reactor (by agitation and aeration) is quantitatively described by using the power input, which represents the turbulent dissipation energy per mass (or volume) unit of the broth. The un-gassed impeller power input, P_0 , for Newtonian liquids can be predicted from the power number of the impeller, N_p , according to [48]:

$$P_0 = Np \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (6)$$

The Np value is assumed constant under turbulent conditions, for a dual impeller turbine with six blades, a value of 12.6 for the power number in turbulent regime has been usually employed [15].

On the other hand, the presence of a gas phase affects the actual power input by the stirring. To predict this value, the correlation proposed by Michel and Miller [49] can be used:

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0.56}} \right)^\beta \quad (7)$$

where parameters α and β depend on the stirrer type and the configuration of the agitation system. For a dual impeller turbine values of 1.224 and 0.432, respectively, have been proposed [50].

Shear stress and shear rate, and other characteristic flow parameters are linked ultimately to the energy input and dissipation rates in the fluid. For the estimation of the average shear rate, the relationship derived theoretically by Sanchez et al. [51] has been used:

$$\gamma_{ave} = \left(\frac{1}{\mu_L} \cdot \frac{P}{V} \right)^{1/2} \quad (8)$$

Maximum shear rate can be estimated from the equation proposed by Robertson and Ulbrecht (1987) [52]:

$$\gamma_{max} = 3.3 \cdot N^{3/2} \cdot D \cdot \left(\frac{\rho}{\mu_L} \right)^{1/2} \quad (9)$$

Under these conditions, the average shear stress can be calculated from the average shear rate and the effective viscosity as follows:

$$\tau_{ave} = \mu_L \cdot \gamma_{ave} \quad (10)$$

The viscosity of the broth was measured and a relationship with biomass concentration was determined by fitting to experimental data, being as follows:

$$\mu_L = \mu_w \cdot (1 + 0.012 \cdot C_X + 0.0024 \cdot C_X^2) \quad (11)$$

The size of the smallest turbulent eddies, known as Kolmogorov's micro-scale of turbulence, is often considered as an indicator of the potential for cell damage and it is characterized by the eddy size (λ_s), according to the following equation:

$$\lambda_s = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (12)$$

In this work, the response to shear forces has been characterized using several parameters and indices, including kinetic growth parameters, cell viability, productivity of metabolites, alterations in morphology of cells and cell aggregates and, in addition, changes in the oxygen uptake rate (OUR).

3.3. OTR, OUR and specific oxygen consumption (q_{O_2}) determination

Assuming a well-mixed liquid phase, the oxygen mass balance in it can be written as [53]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad (13)$$

Oxygen transfer rate (OTR), can be calculated if the volumetric mass transfer coefficient and the driving force of the oxygen in the liquid phase are known, as follows:

$$OTR = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (14)$$

The oxygen up-take rate (OUR) can be obtained from OTR values with the values of C_{O_2} , which are measured on line, by applying Eq. (12). The maximum oxygen up-take rate (OUR_{max}) can be determined using the following equation:

$$OUR_{max} = (k_L a \cdot C_{O_2}^*) - \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad (15)$$

Then, the specific oxygen consumption (q_{O_2}) can be evaluated by the following equation:

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{C_X} \quad (16)$$

4. Results and discussion

Seven experiments have been carried out to study the effect of the fluid dynamic conditions; these experiments were performed culturing *S. blattae* (p4242IbPSO) in STBR under the same conditions only changing the stirrer speeds to the following values: 100, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 rpm, using a constant airflow rate of 1 vvm in all the runs.

4.1. Hydrodynamic stress

For the determination of hydrodynamic stress, biomass growth rate, cell viability and cell morphology were evaluated at several times in the experiments above cited.

The experimental results of growth, in runs carried out at different stirrer speeds, can be observed in Fig. 1A as points. The kinetic model of Eq. (3) was fitted by nonlinear regression [54] to these experimental

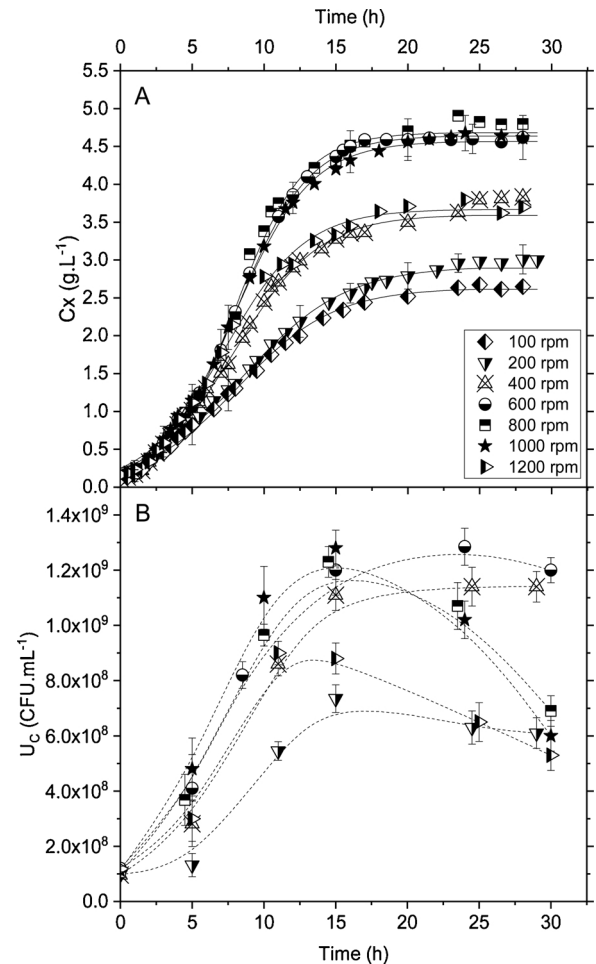


Fig. 1. Evolution of biomass concentration in different runs conducted under different fluid dynamic conditions. Fig. 1A: biomass concentration calculated by spectrophotometric measurement according to Eq. (1). Fig. 1B: viable colony counting in experiments conducted at different stirrer speeds, as indicated in the legend. Error bars indicate \pm SD (n = 3).

data obtaining a good fitting in all the cases, as can also be seen in Fig. 1A, where the lines are the model prediction. As can be seen in this figure, the bacterial growth rate increases when stirrer speed is increased from 100 rpm to 600 rpm. The bacterial growth rates remain approximately the same in the runs conducted at stirrer speed between 600 and 1000 rpm. And, for higher stirrer speed, in the run carried out employing 1200 rpm, the bacterial growth rate clearly decreased.

Fig. 1B shows the cell viability evolution with time in the experiments carried out using different stirrer speeds. As indicated above, cell viability was determined by viable colony count in LB-agar plates at different times for runs carried out under different fluid dynamic conditions. The viable cell number increases with time and also from run to run in the different experiments performed until 600 rpm; the viability at the end of the each of these experiments remain constant. Nevertheless, in the runs carried out employing higher stirrer speeds, the cell viability first increases with time, but from a time around 15 h, the cell viability decreases with time and is lower when the stirrer speed is higher. In the runs conducted at 800 and 1000 rpm, the growth rate values are similar to those found for the run made at 600 rpm; but the cell viability clearly decreases when the growth curve reaches the stationary phase (or at the end of the exponential phase). The cells are clearly affected by hydrodynamic stress from 800 rpm. In addition, the cell viability is significantly lower during the growth in the run conducted at 1200 rpm. In these runs, the DO concentration values change with time, and also from run to run, what is usually accepted in the study of hydrodynamic stress [41,55].

For the identification of the optimal range of operational conditions the best possible hydrodynamic environment for the cells culture, the characteristic parameters of the turbulent mixing for agitation conditions studied have been estimated. Values of some hydrodynamic stress parameters of cultures from 100 to 1200 rpm are given in Table 2. It can be observed that, at low stirrer speeds (100 to 600 rpm) and power dissipation is lower than 1.44 W kg^{-1} , generate a low average shear rate (from 89 to 995 s^{-1}) and, culture cell viability does not reveal any cell damage.

However, at higher stirrer speeds, the hydrodynamic conditions during culture affect the cells. Thus the cultures carried out at stirrer speed higher than 800 rpm, where power dissipation and average shear rate are higher than 2.45 W kg^{-1} and 1309 s^{-1} , respectively, shear effects are observed. This hydrodynamics conditions corresponds with values of average shear stress higher than 1.5 N m^{-2} . The viable colony counting in run conducted at higher stirrer speed can be related with the decrease of Kolmogorov micro-scale, λ_s , due to fluid-cells

interactions in the bulk turbulent of broth culture. In recent studies [22] have been showed a decreasing on cell viability rate with the decrease of λ_s in the viscous sub-range of a turbulent field, for cells smaller than the Kolmogorov micro-scale.

The hydrodynamic stress can also be pointed out by calculating the kinetic parameter values of Eq. (3). Fig. 2 shows the values of these kinetic parameters (μ_{\max} and $C_{X_{\max}}$) calculated by fitting. As can be seen, the confidence intervals of these parameters are very narrow and the statistical parameter values are very good, demonstrating a very good fitting, which can also be observed in Fig. 1A, because the results predicted by the kinetic model (lines) are very close to the experimental data (points), employing the kinetic parameter values of each experiment.

As can be seen in Fig. 2, the specific maximum growth rate (μ_{\max}) increase from 0.27 to 0.39 h^{-1} in the runs conducted between 100 and 600 rpm of stirrer speed. This parameter remains constant in the runs performed between 600 and 1000 rpm, and the value of this parameter decreases to a value of 0.35 h^{-1} for the run carried out at 1200 rpm of stirrer speed. For the other kinetic parameter, $C_{X_{\max}}$, the same evolution can be observed; first, its value increases from 2.63 g L^{-1} to 4.64 g L^{-1} for the runs made with increasing stirrer speed from 100 to 600 rpm; in the runs performed using a stirrer speed between 600 and 1000 rpm, the value of $C_{X_{\max}}$ remains approximately the same, around 4.6 g L^{-1} ; and then the value of this parameter decreases to 3.67 g L^{-1} in the run conducted at 1200 rpm. As can be seen in the legend of this figure, the statistical parameters are excellent, i.e. from all the runs the F-test at 95% of confidence range is widely satisfied.

In Fig. 2 can also be seen the values of maximum oxygen up-take rate (OUR_{\max}) calculated by Eq. (15). The OUR_{\max} values increase from $1.77 \cdot 10^{-7}$ to $1.12 \cdot 10^{-5} \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in the experiments performed between 100 and 600 rpm, respectively. This last value remains constant up to 800 rpm. The OUR_{\max} value decreases to $6.85 \cdot 10^{-6} \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in the runs carried out at higher stirring speeds. Therefore, there seems to be a correspondence between the maximum value of OUR and the kinetic parameters describing the growth rate, as reported in previous works [22,56].

Insomuch as the hydrodynamic stress can produce morphological changes in the cells, samples of runs performed at different fluid dynamic conditions were observed by TEM, mainly in the last hours for each experiment. Examples of images obtained by TEM can be seen in Figs. 3 and 4. Fig. 3 shows panoramic images of cell cultures carried out at different stirrer speeds. As can be seen, for cultures performed at stirrer speeds lower or equal than 600 rpm, the cells observed are

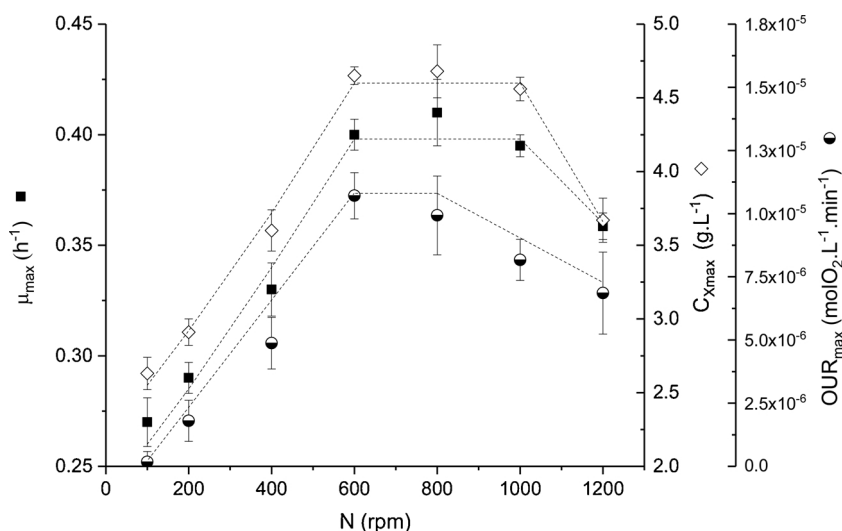


Fig. 2. Kinetic growth parameter values (μ_{\max} and $C_{X_{\max}}$) and OUR_{\max} values for the different runs carried out at different agitation conditions at constant airflow rate of 1 vvm. The F-value was greater than 3900 for all experiments, the value of tabulated F is 2.4 with a 95% confidence range. Error bars indicate \pm SD ($n = 3$).

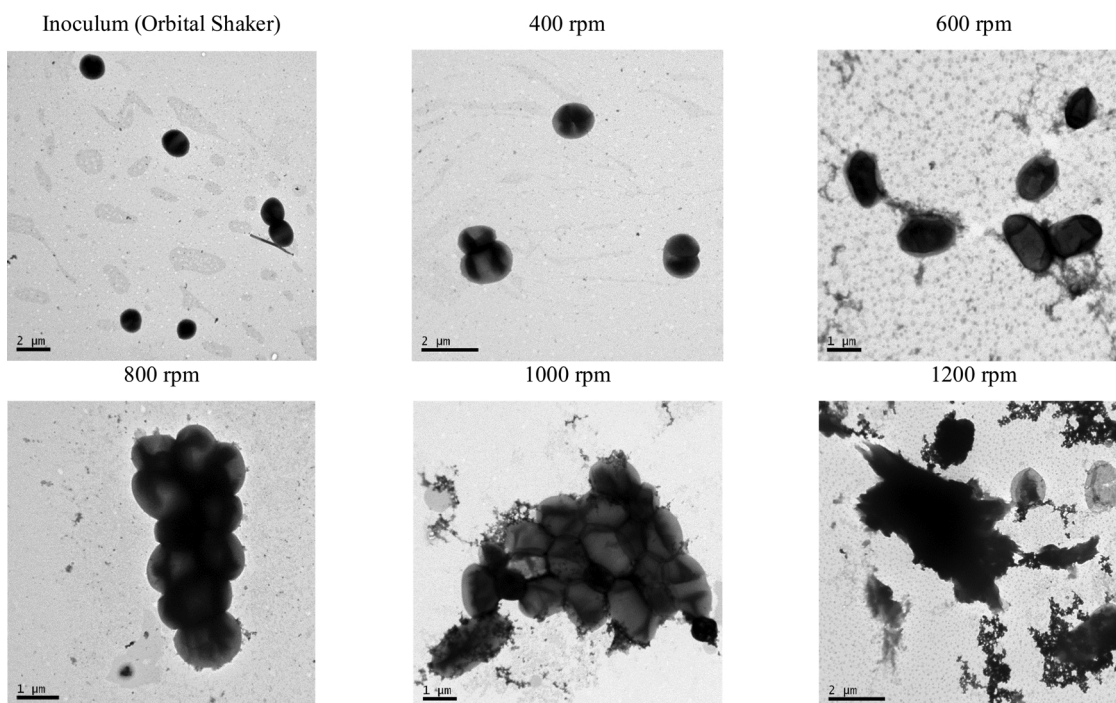


Fig. 3. Example of TEM images of *S. blattae* (p424IbPSO) cultured under different fluid dynamic conditions (from 400 to 1200 rpm). Also the morphology of cells in the inoculum phase is given. These images were obtained from samples collected at 30 h of batch cultures in STBR with an air flow of 1 vvm.

individualized; while in the runs performed at stirrer speeds of 800 and 1000 rpm the cells are forming aggregates. Moreover, in the experiment conducted at 1200 rpm, it can be observed that the cells are also forming aggregates but in addition they are physically damaged or broken. The aggregates formation due to the fluid dynamic conditions has been observed and described as hydrodynamic stress in previous works [28].

On the other hand, it is well known that high stirrer speeds in STBR can provoke changes in the cell size or morphology [2,57]. Numerous

samples were visualized by TEM in order to determine if the stirrer speed can produce changes on the aspect of the cells; these observations were made mainly of cultures at the beginning and the last hours of each culture. In Fig. 4 some examples of these observations are presented, trying to analyze individual cells of each culture. As can be seen, the cells length increases as agitation increases for cultures made at stirrer speeds from 800 rpm. The length and the width of cells are given in Table 1; as can be observed, the length of cells increases at higher stirrer speed, while the width of cells decreases at higher agitation; the

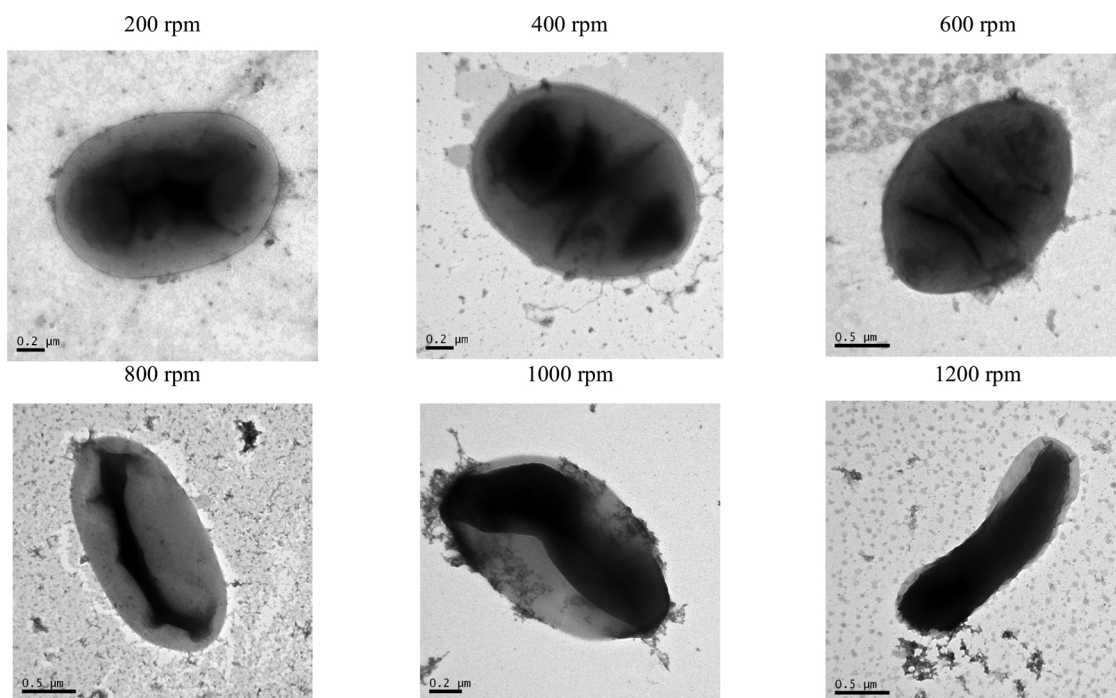


Fig. 4. Cell morphology details by TEM images of *S. blattae* (p424IbPSO) under different fluid dynamic conditions (from 200 to 1200 rpm). The samples were collected at 30 h of batch cultures in STBR with an air flow of 1 vvm.

Table 1

Length, width and ratio length/width (L/W) of cells from batch cultures carried out at different stirrer speed. The length and width were determined from TEM images (samples from hour 30 of batch cultures). SD (\pm) was calculated with TEM images of each culture (n = 10).

Run	N (rpm)	Long (μm)	Wide (μm)	L/W
1	100	1.47 \pm 0.24	1.17 \pm 0.16	1.26
2	200	1.52 \pm 0.21	1.13 \pm 0.15	1.34
3	400	1.49 \pm 0.23	1.16 \pm 0.15	1.28
4	600	1.80 \pm 0.21	1.35 \pm 0.18	1.33
5	800	2.26 \pm 0.24	1.17 \pm 0.14	1.95
6	1000	2.80 \pm 0.26	1.21 \pm 0.13	2.33
7	1200	2.19 \pm 0.25	0.54 \pm 0.11	4.02

ratio between cell length and width (L/W) is also given in Table 1; this ratio L/W clearly increases in the runs performed from 800 rpm to 1200 rpm.

4.2. Influence of oxygen availability

The concentrations of the metabolites formed during the growth runs, described in the above point, have been measured with time. Fig. 5 shows a summary of the results obtained in three of the runs carried out: those performed employing 200, 600 and 1000 rpm of stirrer speed. These runs were repeated three times in order to obtain confidence interval of the experimental values; these intervals are very narrow as can be seen in Figs. 5–7. It must be pointed out that these data are representative because the results in the run carried out at 100 rpm are similar to those found in the run at 200 rpm, the results in the runs conducted at 400 and 600 rpm are also similar, and the metabolite distribution in the runs using 800, 1000 and 1200 rpm show the same tendency.

As can be seen in Fig. 5, the product distribution evolutions with time change from run to run. In Fig. 5A–C can be observed the time of course of glucose, biomass, isobutanol and ethanol concentrations in the experiments conducted at 200, 600 and 1000 rpm, respectively. When the stirrer speed used is increased the growth rate increases, and C_x is greater for the same time from run to run, although, as commented above, the growth (measuring biomass concentration by OD_{600}) is very similar in the runs conducted at stirrer speeds from 400 to 1000 rpm. The isobutanol concentration increases with time, but from run to run, this product increases its concentration when the stirrer speed increases, till a maximum value is reached, in the runs performed at 400 and 600 rpm, and then its concentration decreases in the runs at higher agitation. On the other hand, the ethanol concentration is lower as stirrer speed is increased.

In Fig. 5D–F, the time of course of lactic acid, acetic acid and succinic acid concentrations are shown. When the stirrer speed is increased, the lactic acid concentration gets lower and lower, being practically null in the run carried out at 1000 rpm (and also at 1200 rpm). A similar behavior can be observed for succinic acid. Nevertheless, acetic acid concentrations clearly increase in the runs performed at higher stirrer speed, when OTR is greater, as will be

Table 2

Values of the characteristic parameters of the turbulent mixing under different hydrodynamic conditions (different agitation speed) and constant airflow rate of 1 vvm.

Run	N (rpm)	ϵ (W kg^{-1})	γ_{ave} (s^{-1})	γ_{max} (s^{-1})	τ_{ave} (N m^{-2})	λ_s (μm)
1	100	0.01	89.08	381.25	0.11	94
2	200	0.09	251.9	1078.4	0.31	56
3	400	0.73	712.6	3050.0	0.88	33
4	600	1.44	995.9	4262.5	1.23	28
5	800	2.45	1309.2	5603.3	1.62	24
6	1000	5.96	2015.6	8626.8	2.50	20
7	1200	11.67	2816.9	12056.3	3.50	17

commented later on.

Finally, it is noticeable that, as shown in a previous paper [35], the growth of this strain under aerobic conditions produces some compounds of a high oxidation degree (mainly 3-oxo-1-buten-2-yl ether and isobutyric acid) which can be analyzed and identified by HPLC-MS and GC-MS. The concentrations of these compounds have been calculated by carbon balance checking the value found with two analysis of samples. As can be seen in Fig. 5D–F, the concentration of these compounds at the final hour of the experiments are similar, around 5 g L^{-1} .

In Fig. 5G–I can be observed the time of course of dissolved oxygen (DO) and CO_2 concentrations. With respect to the DO concentration, this concentration decreases with time, but in different way depending on the run. Due to the increases of $k_L a$ with the stirrer speed, OTR values also increase, but DO concentration falls down with time because the oxygen consumption (OUR) is greater than OTR. Nevertheless, the fall of DO is different when the stirrer speed employed is low (from 100–400 rpm) till a value of zero or very close is reached; however, when the stirrer speed is higher; for example, in the run carried out at 600 rpm, and those conducted at higher stirrer speeds, DO values increase at larger times, while OUR decreases, mainly because the growth rate decreases.

Nevertheless, CO_2 concentration always increases with time and also increases from run to run when the stirrer speed employed is higher. In the runs performed at 1000 and 1200 rpm, this increase is less evident, surely due to the hydrodynamic stress already commented, which produces a decrease in the viable cell number; this is supported by the fact that in these two runs conducted at the highest agitation the CO_2 production rate is similar to that observed in runs performed at lower stirrer speed (600 rpm, for example), at short times but then decreases at long times, when the cell viability is affected.

Fig. 6 shows the maximum yields of the different metabolites detected in the runs performed changing the stirrer speed. As can be seen, the results are in agreement with that previously commented. In Fig. 6A, it can be observed that CO_2 yield presents a maximum in the run performed at 600 rpm, while lactic acid yield dramatically decreases from 200 rpm, and the acetic acid has an opposite behavior, because its yield increases when the stirrer speed increases.

In Fig. 6B it can be seen that succinic acid and ethanol yields decrease when the stirrer speed increases, while isobutanol yield present a maximum value in the run carried out at 600 rpm.

Finally, in Fig. 6C, the yields of high oxidation products and biomass are given. As can be seen the high oxidation products yield increases when the stirrer speed increases, and also the biomass and the growth rate increase in the runs carried out from 100 to 600 rpm, and then remains constant. These results are coherent with those presented in previous works [28,35].

These results of product distribution, or the metabolite production, were compared with those obtained when the culture is carried out in resting cells. As indicated in the experimental section, cells were collected at two different growth times (the first time corresponds to the middle of exponential growth, around 8 h of culture; and the second time corresponds to the end of the exponential growth curve, around 12 h of culture). These cells were washed, centrifuged and employed in

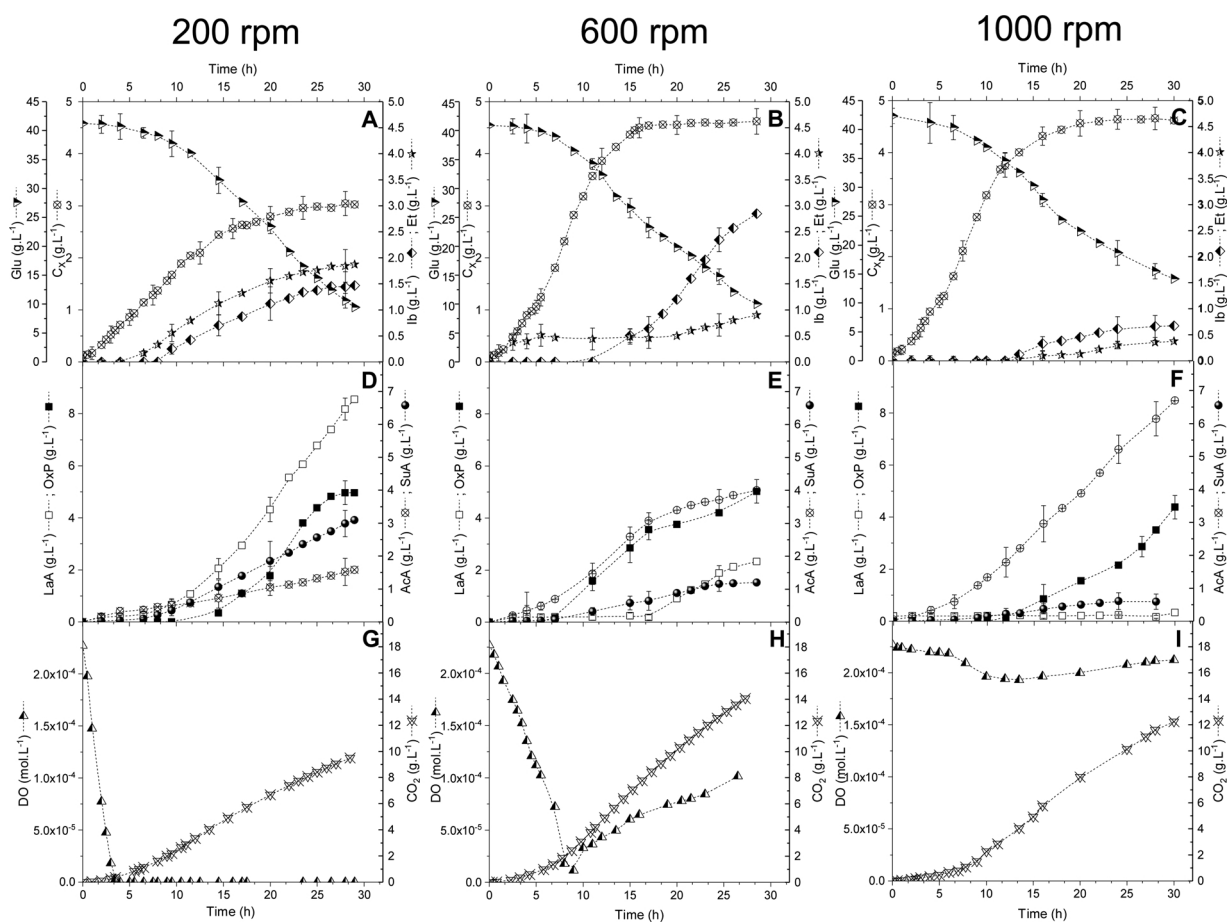


Fig. 5. Evolution with time of compound concentrations during growth experiments carried out in STBR employing a constant airflow rate (1 vvm) and different stirrer speeds: 200 rpm (A, D and G), 600 rpm (B, E and H), 1000 rpm (C, F and I). In graphs A, B and C, it can be observed the evolution with time of glucose, biomass, isobutanol and ethanol; in graphs D, E and F, it can be seen the evolution with time of lactate, acetate, succinate and the high oxidation products. In graphs G, H and I, it can be observed the evolution with time of dissolved oxygen (DO) and CO_2 .

resting cell operation with carbon source (glucose) but without nitrogen source during 24 h. The results for the different runs are given in Fig. 7 as product yield vs. stirrer speed employed in the growth, because the resting cell assays were performed always under the same conditions (commented above in the Experimental part) in shaken sealed flasks (under anaerobic or microaerophilic conditions).

The results of the resting cell assays employing cells of low growth time (between 7.5 and 8.5 h of culture, in the middle of the exponential growth stage) can be seen in Fig. 7A. Ethanol and lactic acid yields dramatically diminish with the cells cultured at high stirrer speed; while succinic acid yield remains at a similar value in all the runs. Acetic acid and isobutanol have a complementary behavior, when isobutanol yield increases (presenting a maximum value with the cells cultured at 400 rpm), the acetic acid yield is low, with a dramatic increase when the cells are cultured upon 600 rpm of stirrer speed.

A similar variation is achieved with cells collected at higher growth times (between 11.5 and 12.5 h of culture, in the second part of the exponential growth stage), as can be seen in Fig. 7B, although, in general, the yields of all the metabolites are lower than in the previous case. As shown in a previous work [58], the potential amount of metabolites released by the cell in resting cell tests decrease as the cells are taken at bigger growth times. The hyper-expression of enzymes provokes their wrong folding and, therefore their accumulation into inclusion bodies causing inhibition [58].

It is noticeable that the cells cultured under different fluid dynamic conditions have a different behavior when used as resting cells. Therefore, cells grown under conditions provoking different values of

OTR, OUR and DO concentration, that is different oxygen availability, present a different behavior when used, now under the same fluid dynamic conditions, in resting cell operation. This different behavior is clearly detected for the cells cultured at 600 rpm, which present a metabolism different from cells cultured at lower stirrer speeds, which are able to produce a different metabolite distribution. It must be also pointed out that, in the resting cells assays, carried out under microaerophilic conditions, those compounds (high oxidation products) produced during the growth under aerobic conditions are not detected.

4.3. OTR, OUR and q_{O_2} evolution

In order to clarify the OTR and OUR roles, these magnitudes, together with the q_{O_2} values, have been calculated as a function of time in the different experiments carried out.

As can be seen in Eq. (11), viscosity increases with growth, but this variation is not dramatic, because C_x reaches values no very high ($C_{x\text{max}} = 4.64 \text{ g L}^{-1}$). Nevertheless, this viscosity variation was taken into account in the calculation of the $k_L a$ values. The values of the volumetric mass transfer coefficient have been evaluated applying a semi-theoretical method described elsewhere [45,46], which has been checked and demonstrated its validity in previous papers [43,44].

The average value of $k_L a$ vs. stirrer speed, under the rest of conditions already commented, are given in Fig. 8B, although for the aforementioned calculations the influence of viscosity has been taken into account because its value changes with biomass concentration as can be seen in Fig. 8A, and with time, in each run. In this figure the values of

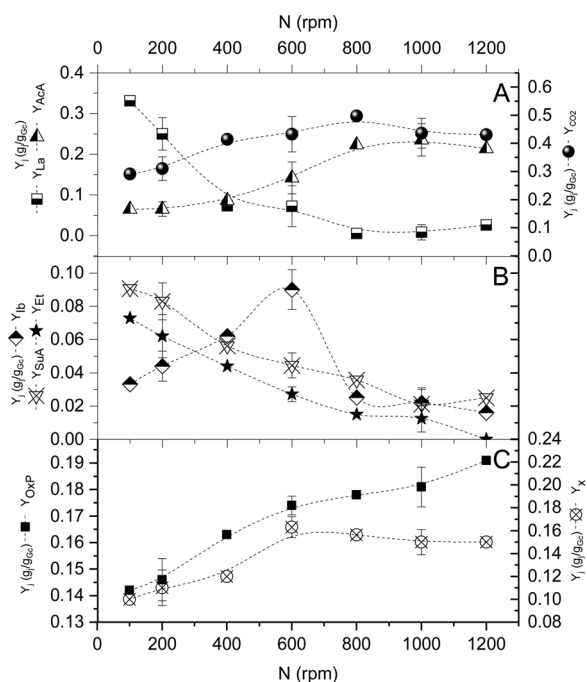


Fig. 6. Values of the yields on biomass and the main compounds referred to consumed glucose vs fluid-dynamics conditions. Graphic A shows the yield on lactate, acetate and CO₂. Graphic B shows the yield on isobutanol, ethanol and succinate for each agitation. Graphic C shows the yield on high oxidation products and biomass. All the experiments were carried out in STBR employing different agitation (100–1200 rpm) and constant airflow rate of 1 vvm. The yield was determined in the hour 30 for each growth experiment.

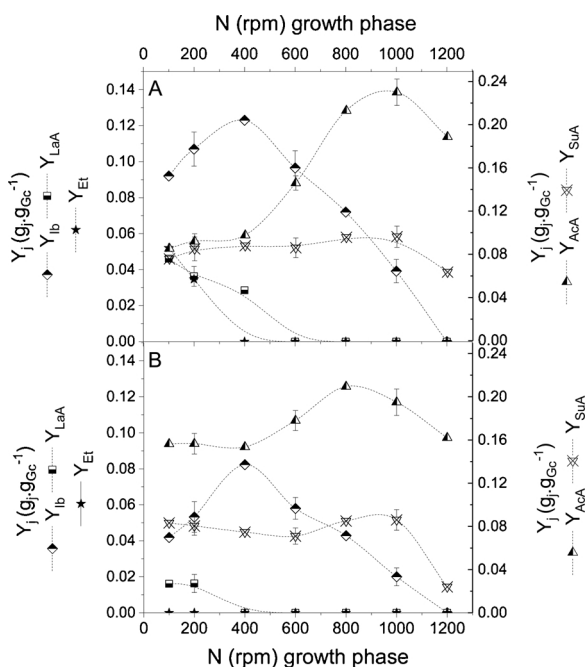


Fig. 7. Yield values in the resting cell assays for the main metabolites (Y_{LaA} for lactate, Y_{Ib} for isobutanol, Y_{Et} for ethanol, Y_{AcA} for acetate and Y_{SuA} for succinate). The cells were collected at two growth times, at the middle of exponential growth (graphic A) and at the end of exponential growth curve (graphic B). Biomass were produced in runs conducted under different stirrer speed (from 100 to 1200 rpm) employing a constant airflow rate of 1 vvm.

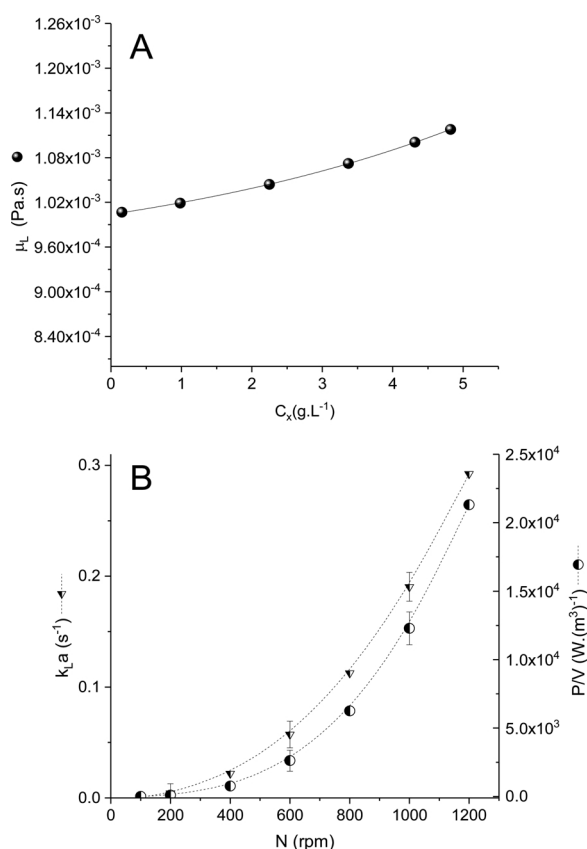


Fig. 8. Variation of broth viscosity as a function of biomass concentration (graphic A); variation of the k_{La} and dissipated power average per volume vs. stirrer speed (graphic B). Cultures were conducted in a STBR at constant airflow rate (1 vvm) and different stirrer speeds (100–1200 rpm).

the corresponding power input per volume (P/V) values are also given.

Fig. 9 shows the variation with time of DO concentration (Fig. 9A), OTR (Fig. 9B) and q_{O_2} (Fig. 9C) in the different runs carried out (from 100 to 1200 rpm of stirrer speed). The variation of DO concentration, in part already commented, is as expected. In the runs performed at low stirrer speeds, the value of DO concentration falls down very fast to zero value (for runs conducted at 100 to 400 rpm). In the run performed at 600 rpm, DO concentration also falls down, but more slowly, and its minimum value is close to zero, but a little higher, at a time of about 9 h of growth, but then DO concentration increases with time. In the runs carried out employing higher stirrer speeds, the behavior is similar, but DO concentration decreases more slowly when stirrer speed is higher, and the minimum value reached is higher, increasing with the stirrer speed employed, although always at approximately the same time, around 9 h. In fact, in the runs conducted at the highest stirrer speeds, 1000 and 1200 rpm, DO scarcely varies from the saturation value.

According to these experimental results, after k_{La} values estimation, OTR values have been calculated, employing Eq. (14). These values are given in Fig. 9B; as can be seen, OTR increases with time, and OUR also increases, up to different values depending on the run. Thus, in the growth runs performed at low stirrer speeds (from 100–400 rpm), OTR values increase with time, but before a time of 5 h, the maximum value of OTR is reached in each run, because DO value is zero and the driven force in Eq. (14) is maximum; thus, under these conditions, OTR is controlling the value of OUR, which cannot be higher than OTR.

Nevertheless, in the runs conducted using higher stirrer speeds (600 to 1200 rpm), OTR values also increase with time, but OTR does not reach their maximum value, because DO concentration do not fall down to zero. Thus, in these runs, the control of the overall rate is of OUR, which maximum value determines the maximum value that OTR reaches,

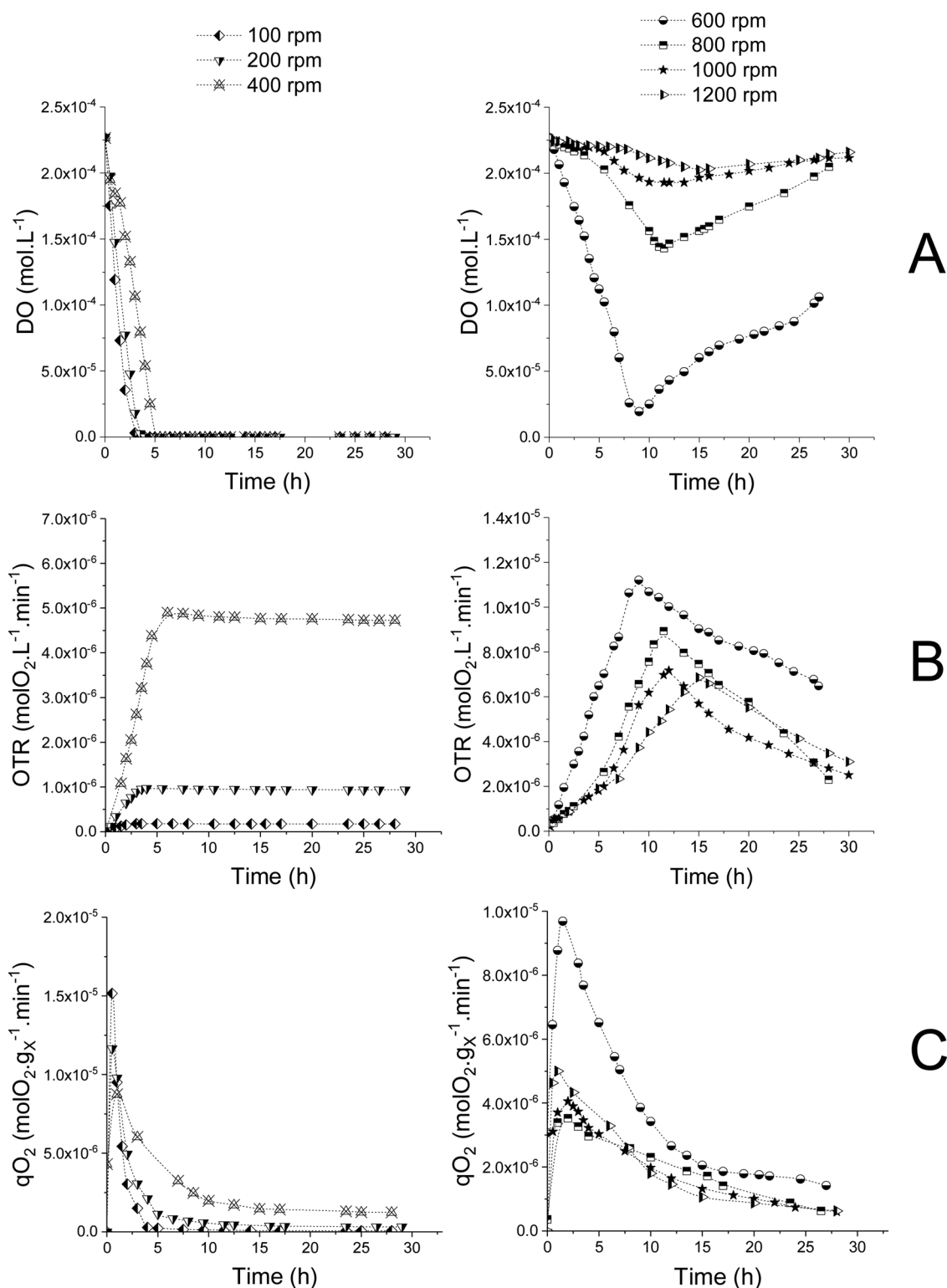


Fig. 9. Time of course of dissolved oxygen (DO) concentration (graphic A), oxygen transport rate (OTR) (graphic B) and specific oxygen consumption rate (q_{O_2}) (graphic C). Runs carried out in STBR employing different stirrer speed (100–1200 rpm) and constant airflow rate (1 vvm).

always around 10–12 h of growth time; from this time, OTR decreases with time because OUR also decreases, mainly due to the decrease in the growth rate, as indicated above.

The corresponding variations of q_{O_2} are shown in Fig. 9C. First, a very fast increase takes place, although it may be evident only at the runs performed at the highest stirrer speeds (1000 and 1200 rpm), and then a drastic decrease with time is always observed.

The increasing of agitation can provoke hydrodynamic stress by cellular damage, as commented above. On the other hand, the increasing of OTR-OUR can have a significant effect on the metabolite distribution, and therefore in the metabolic routes followed inside the cells, surely due to the increase of DO concentration as above commented. It is especially relevant that the product (metabolite) distribution is different when the process is also carried out with resting

cells, when the cultures are performed under the same conditions, being the difference the fluid dynamic and the oxygen availability of the cells while the growth.

5. Conclusions

Shimwellia blattae (p424IbPSO) cultures in STBR suffer hydrodynamic stress under high agitation conditions. Growth rate is clearly affected when stirrer speeds higher than 1000 rpm are employed, although the cultures, according to the data from cell viability, are affected in runs carried out at 800 rpm and higher stirrer speeds from a time of 15 h. The results demonstrate that the effect of the hydrodynamic conditions are not only hydrodynamic stress, even inducing morphologic changes and cell damage at the higher stirrer speeds, but also inducing metabolic changes. Thus average shear rates higher than 1300 s^{-1} can be assumed to be harmful to growth.

The change of the OTR-OUR and, in some cases, the DO concentration can have a dramatic effect also on product distribution; when stirrer speed is increased, the biomass growth and the productions of acetic acid, CO_2 and compounds with high oxidation degree are favored, while the productions of succinic acid and ethanol significantly decrease. The product of big interest, isobutanol, presents a maximum production in the run carried out at 600 rpm with growing cells. This effect is different of the hydrodynamic stress commented above, OTR-OUR fix the oxygen availability and this, and surely the OD concentration, produce a change in the metabolic route followed.

But it is relevant that also the cells cultured under different OTR conditions, when used in resting cells under the same conditions, present significantly different behaviors, following different metabolic routes too, yielding a different product distribution, similar in qualitative aspects to those above commented, when the cells are growing. Now, the maximum isobutanol production is reached with cells cultured at 400 rpm stirrer speed. Moreover, it is significant that cells cultured with significant hydrodynamic stress, those cells collected in the runs conducted at 1000 and 1200 rpm, present an anomalous behavior when used in resting cell operation.

Acknowledgements

This work has been funded by MINECO under contract CTQ2017-84963-C2-1-R, the grant for one of the authors (MGA) with reference BES-2014-068344 is gratefully recognized.

References

- [1] R. Bronnenmeier, H. Märkl, Hydrodynamic stress capacity of microorganisms, *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 553–578.
- [2] H. Märkl, R. Bronnenmeier, B. Wittek, The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress, *Int Chem Eng* 31 (1991) 185–196.
- [3] J.C. Merchuk, Shear effects on suspended cells, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 44 (1991) 65–95.
- [4] E.T. Papoutsakis, Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors, *Trends Biotechnol.* 9 (1991) 427–437.
- [5] J.J. Meijer, H.J.G. ten Hoopen, Y.M. van Gameren, K.C.A.M. Luyben, K.R. Libbenga, Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 467–477.
- [6] P. Jaouen, L. Vandanjon, F. Quémeuneur, The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps, *Bioresour. Technol.* 68 (1999) 149–154.
- [7] Y. Chisti, Hydrodynamic damage to animal cells, *Crit. Rev. Biotechnol.* 21 (2001) 67–110.
- [8] Y. Hitaka, Y. Takahashi, M. Kino-oka, M. Taya, S. Tone, Culture of red beet hairy roots by considering variation in sensitivity of tip meristems to hydraulic stress, *Biochem. Eng. J.* 6 (2000) 1–6.
- [9] D.D. Sowana, D.R.G. Williams, E.H. Dunlop, B.B. Dally, B.K. O'Neill, D.F. Fletcher, Turbulent shear stress effects on plant cell suspension cultures, *Chem. Eng. Res. Des.* 79 (2001) 867–875.
- [10] P.-J. Lin, A. Scholz, R. Krull, Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 213–220.
- [11] F.G. Camacho, A.C. Gómez, T.M. Sobczuk, E.M. Grima, Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*, *Process Biochem.* 35 (2000) 1045–1050.
- [12] K.E. McCloskey, Effects of Shear Stress on Cells, in: M. Moo-Young (Ed.) *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition), Academic Press, Burlington, 2011, pp. 615–623.
- [13] Y.Q. Cui, R.G.J.M. van der Lans, K.C.A.M. Luyben, Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 715–726.
- [14] R. Pohorecki, J. Bałdyga, A. Ryszczuk, T. Motyl, Erythrocyte destruction during turbulent mixing, *Biochem. Eng. J.* 9 (2001) 147–154.
- [15] M.C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology 7 Volume Set* John Wiley & Sons, 2019 ISBN2010.
- [16] N.S. Wang, J.-D. Yang, R.V. Calabrese, K.-C. Chang, Unified modeling framework of cell death due to bubbles in agitated and sparged bioreactors, *J. Biotechnol.* 33 (1994) 107–122.
- [17] J.J. Chalmers, *Cells and Bubbles in Sparged Bioreactors*, Cell Culture Engineering IV, Springer, 1994, pp. 311–320.
- [18] K.T. Kunas, E.T. Papoutsakis, Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment, *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990) 476–483.
- [19] A.W. Nienow, *Reactor engineering in large scale animal cell culture*, *Cytotechnology* 50 (2006) 9.
- [20] F.G. Camacho, J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C. García, E. Belarbi, E.M. Grima, Determination of shear stress thresholds in toxic dinoflagellates cultured in shaken flasks: implications in bioprocess engineering, *Process Biochem.* 42 (2007) 1506–1515.
- [21] P. Jüsten, G.C. Paul, A.W. Nienow, C.R. Thomas, Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity, *Biotechnol. Bioeng.* 52 (1996) 672–684.
- [22] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, A. Alcon, V.E. Santos, The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 911–925.
- [23] H. Märkl, R. Bronnenmeier, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), *Mechanical Stress and Microbial Production*, Biotechnology, vol.2, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1985, pp. 369–392.
- [24] J.P. Arnaud, C. Lacroix, C. Fousseureau, L. Choplin, Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *J. Biotechnol.* 29 (1993) 157–175.
- [25] E. Gomez, A. Alcon, S. Escobar, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Biochem. Eng. J.* 99 (2015) 138–146.
- [26] C. Peña, M.A. Trujillo-Roldán, E. Galindo, Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*, *Enzyme Microb. Technol.* 27 (2000) 390–398.
- [27] B.O.Y. Silva-Santisteban, F.M. Filho, Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 717–724.
- [28] A. Rodriguez, V.E. Santos, E. Gomez, F. Garcia-Ochoa, Influence of fluid dynamic conditions on 1,3-propanediol production from glycerol by *Shimwellia blattae*: carbon flux and cell response, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (2017) 2050–2059.
- [29] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 153–176.
- [30] S. Sumita, R.K. Verma, A.K. Suresh, R.K. Krishnamurthy, J. Bellare, G.K. Suraishkumar, Macro-Level and Genetic-Level Responses of *Bacillus subtilis* to Shear Stress, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1689–1696.
- [31] S. Susmita, R.K. Krishnamurthy, G.K. Suraishkumar, Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*, *Biotechnol. Bioeng.* 94 (2006) 118–127.
- [32] S. Escobar, A. Rodriguez, E. Gomez, A. Alcon, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39 (2016) 545–554.
- [33] C. Felpejo-Santero, A. Rojas, M. Tortajada, B. Galan, D. Ramon, J.L. Garcia, Engineering alternative isobutanol production platforms, *AMB Express* 5 (2015) 1–9.
- [34] M.G. Acedos, A. Ramon, S. De la Morena, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): study of the operational conditions, *Biochem. Eng. J.* 133 (2018) 21–27.
- [35] M.G. Acedos, P. Yustos, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Carbon flux distribution in the metabolism of *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) for isobutanol production from glucose as function of oxygen availability, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94 (2019) 850–855.
- [36] M.M. Yakimov, P.N. Golyshin, S. Lang, E.R.B. Moore, W.R. Abraham, H. Lunsdorf, K.N. Timmis, *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 339–348.
- [37] M. Dueñas, A. Munduate, A. Perea, A. Irastorza, Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions, *Int. J. Food Microbiol.* 87 (2003) 113–120.
- [38] F. Bai, L. Wang, H. Huang, J. Xu, J. Caesar, D. Ridgway, T. Gu, M. Moo-Young, Oxygen mass-transfer performance of low viscosity gas-liquid-solid system in a split-cylinder airlift bioreactor, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1109–1113.
- [39] A. Rodriguez, M. Wojtusik, F. Masca, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Kinetic modeling of 1,3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: influence of the initial substrate concentration, *Biochem. Eng. J.* 117 (2017) 57–65.
- [40] A.B. Martin, A. Alcon, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Production of a biocatalyst for *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the

- operational conditions, *Energy Fuels* 19 (2005) 775–782.
- [41] E. Gomez, V.E. Santos, A. Alcon, A.B. Martin, F. Garcia-Ochoa, Oxygen-uptake and mass-transfer rates on the growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on biodesulfurization (BDS) capability, *Energy Fuels* 20 (2006) 1565–1571.
- [42] R. Luedeking, E. Piret, A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH, *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1 (1959) 393–412.
- [43] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 92 (2005) 761–772.
- [44] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks, *Chem. Eng. Sci.* 59 (2004) 2489–2501.
- [45] A.N. Kolmogorov, The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* (1941) 299–303.
- [46] R. Higbie, The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure, *Trans. AIChE* 31 (1935) 365–389.
- [47] Y. Kawase, B. Halard, M. Moo-Young, Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids, *Chem. Eng. Sci.* 42 (1987) 1609–1617.
- [48] J. Rushton, Costich, H.J. Everett, Power characteristics of mixing impellers, Part II *Chem. Eng. Prog* 46 (1950) 467–476.
- [49] B.J. Michel, S. Miller, Power requirements of gas-liquid agitated systems, *Aiche J.* 8 (1962) 262–266.
- [50] V. Abradi, G. Rovero, S. Sicardi, G. Baldi, R. Conti, Sparged vessels agitated by multiple impellers, *Proc. Eur. Conf. Mixing* (1988) 329–336.
- [51] J.A. Sánchez Pérez, E.M. Rodríguez Porcel, J.L. Casas López, J.M. Fernández Sevilla, Y. Chisti, Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors, *Chem. Eng. J.* 124 (2006) 1–5.
- [52] B. Robertson, J. Ulbrecht, *Scale-Up and Mixing, Biotechnology Processes*, Wiley, New York, 1987, pp. 31–35.
- [53] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, V.E. Santos, J.C. Merchuk, Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 289–307.
- [54] D.W. Marquardt, An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11 (1963) 431–441.
- [55] P.-M. Kao, C.-I. Chen, S.-C. Huang, Y.-C. Chang, P.-J. Tsai, Y.-C. Liu, Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1, *Biochem. Eng. J.* 34 (2007) 172–178.
- [56] A. Rodriguez, V. Ripoll, V.E. Santos, E. Gomez, F. Garcia-Ochoa, Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: oxygen transfer and uptake rates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (2017) 1266–1275.
- [57] M.A. Trujillo-Roldán, N.A. Valdez-Cruz, El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados, *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48 (2006) 269–280.
- [58] M.G. Acedos, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Resting cells isobutanol production by *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): influence of growth culture conditions, *Biotechnol. Prog.* 34 (2018) 1073–1080.

