

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las condiciones fluido-dinámicas en cultivos
bacterianos en tanque agitado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Rodríguez Martín

Directores

Félix García-Ochoa Soria
Victoria Eugenia Santos Mazorra

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**ESTUDIO DE LAS CONDICIONES FLUIDO-DINÁMICAS EN
CULTIVOS BACTERIANOS EN TANQUE AGITADO**

Memoria que para optar al grado de Doctor presenta

ALBERTO RODRÍGUEZ MARTÍN

Madrid, 2017

El Dr. FÉLIX GARCÍA-OCHOA SORIA, catedrático de Ingeniería Química, y la Dra. VICTORIA EUGENIA SANTOS MAZORRA, profesora titular de Ingeniería Química, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, realizado en el Departamento de Ingeniería Química 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,

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas se antojan escasas para describir el apoyo incondicional y absoluto de todas aquellas personas que han hecho posible que esta Tesis salga adelante.

En primer lugar quiero dar las gracias a los Doctores D. Félix García-Ochoa y Dña. Victoria Eugenia Santos por su labor de dirección durante estos más de cuatro años. También por su paciencia, su visión de conjunto, sus indicaciones y su extraordinario enfoque en una temática tan compleja como la que compone este documento. Han sido innumerables las reuniones, los borradores, las tablas y gráficas, los resultados que han formado parte de esta investigación, pero ambos han sabido siempre indicarme el buen camino, incluso en los momentos más delicados. En este sentido quiero dar también las gracias al Doctor D. Emilio Gómez por su paciencia, su inestimable ayuda a la hora de elaborar las publicaciones que componen los resultados de la presente Memoria y su enorme disponibilidad para describir convenientemente los resultados obtenidos en el laboratorio.

Un periodo tan largo y un trabajo tan personal no merecen la pena sin los mejores compañeros de laboratorio que uno ha podido tener. Desde aquel marzo de 2010 cuando un inocente ‘pipiolo’ entró a hacer las prácticas de quinto curso de la titulación de Ingeniero Químico os habéis convertido en una pequeña familia, sin la cual no habría tenido ni la fuerza, ni el ánimo, ni la perseverancia necesarias para sacar adelante esto. Gracias a la Dra. Vanessa Ripoll, que fue mi primera mentora y se convirtió en una gran amiga, capaz de alegrarle el día con su espontaneidad y su sentido del humor a cualquiera y que me descubrió un mundo nuevo. Gracias también al Dr. Igor Martínez, un compañero genial, un amigo por encima de todo, un trabajador incansable con el que he compartido hasta el ‘caldico’ resucitador de Estella en agosto. Gracias al Dr. Sebastián Escobar por esas mañanas de buena música cubana en el laboratorio, por su alegría, sus consejos y sus recomendaciones ‘lavapieseras’. Gracias a Mateusz Wojtusik, alguien con quien, además de compartir fecha y año de nacimiento, he tenido el honor de vivir la misma trayectoria, con sus alegrías y sus sinsabores, pero siempre disponible para hablar, echarme una mano o hacer que los problemas se vean de otra forma. A Susana de la Morena, porque el esfuerzo tiene su recompensa y porque, aunque lo hayamos visto un poco negro, hemos acabado cantando el “¡sí se puede!” junto con el resto del “Club de la Cachimba”.

Las nuevas generaciones están capitaneando ya el presente del Grupo FQPIMA y vienen pisando fuerte. Quiero agradecer en este sentido a Isabel de la Torre, Miguel García y Alberto Ramón su labor y su paciencia en estos dos últimos años que he podido compartir con ellos, aunque a veces haya sido yo “el borde del labo”. Estoy convencido de que sus Tesis Doctorales están al caer y que serán unos investigadores magníficos.

Fuera del mundo investigador quisiera hacer mención a mi familia, mis padres y mi hermano, por su inestimable apoyo, sus ánimos, su paciencia y su cariño. Una pata fundamental en mi vida, que muchas veces no soy capaz de agradecer como se merece, y que nunca me ha faltado. Por todo ello muchísimas gracias a los tres. También quiero mencionar a mi cuñada Alba y a mis tíos, por su calor, sus palabras y su fuerza cada vez que les veo.

En la Facultad de Ciencias Químicas, allá por octubre de 2006, tuve el enorme privilegio de conocer a un grupo maravilloso de compañeros que emprendieron conmigo la aventura de estudiar Ingeniería Química y que ahora, diez años después, son una parte indisoluble de mi persona. A todos ellos: a mi hermano Pablo Brea, a Rebeca Jiménez, Ángel Roldán, Paz Fernández, Santiago Ramos, Adriana Sánchez-Cervera, Javier López, Mónica Alonso, Luis Martín, Clara Castañeda y Nuria Cabello, gracias, de corazón, por tanto.

En estas líneas no puedo olvidarme de los de siempre, de aquéllos que nunca fallaron y que desinteresadamente me han dado su apoyo y me han levantado del suelo. A Irene Rodríguez y Ana Mula, por tantísimas cosas que ocuparían un libro entero. Por ese cariño tan único; porque media mitad de mí es vuestra. A ese grupo de “Lacomeros”, que camina junto desde 1999: a Alicia Vives, David Díaz del Campo, Elena Bartolomé, Iker Asolo, Miriam Domínguez, Álvaro Madrid, Gema Benedito, Lesmes Caballero, Daniel Visa, Nacho Palomo, Daniel Lucas, Jesús Domingo y Óscar Aguado. Porque hacéis que ciertas cosas merezcan la pena.

Por último, gracias a todos a los que no he nombrado, pero que pasan y han pasado por mi vida en esta etapa que ahora se cierra. Andrea Klett, Héctor Gómez, Juan Manuel Segovia y el resto de miembros del clan de ‘Blasco 26’, donde compartí tres años inolvidables. Porque también gracias a ellos he comprendido que lo urgente no siempre es lo más importante. A todos y todas, desde estas modestas líneas, muchísimas gracias.

“La mayoría de las personas cree que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter”.

Albert Einstein

*“Y si una duda te hace
señas a diez mil kilómetros,
lo dejas todo, te arrojas
sobre proas, sobre alas,
estás ya allí; con los besos,
con los dientes la desgarras:
ya no es duda.*

Tú nunca puedes dudar”

Pedro Salinas (1933)

ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN	5
OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO	11
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. LA IMPORTANCIA DE LA FLUIDO-DINÁMICA EN EL DESARROLLO DE BIOPROCESOS	18
1.1.1. La fluido-dinámica en los bioprocesos: grado de mezcla, aporte de nutrientes gaseosos y efectos sobre la integridad celular	19
1.1.2. La relevancia del oxígeno en los procesos aerobios	24
1.1.3. Fluido-dinámica y estrés celular	39
1.1.4. Fluido-dinámica y cambio de escala	48
1.2. LA GLICERINA: CO-PRODUCTO DEL BIODIÉSEL	51
1.2.1. El auge del biodiesel y el excedente de glicerina cruda	52
1.2.2. Propiedades, calidades y usos tradicionales de la glicerina	57
1.2.3. Desarrollo de nuevas formas de valorización	61
1.3. BIO-DESULFURACIÓN DE COMBUSTIBLES	66
1.3.1. Aplicaciones con el DBT como compuesto modelo	70
2. MATERIALES Y MÉTODOS	77
2.1. MATERIALES	77
2.1.1. Biocatalizadores	77
2.1.2. Reactivos	79
2.1.3. Medios de cultivo	82
2.2. EQUIPOS EMPLEADOS	84
2.2.1. Sistemas de reacción	84
2.2.2. Equipos de análisis	87
2.2.3. Equipos auxiliares	90

2.3.	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	91
2.3.1.	Protocolos de obtención y conservación del biocatalizador.....	92
2.3.2.	Cultivo de células en biorreactor	93
2.3.3.	Métodos de análisis: seguimiento de la biomasa y la composición del caldo a lo largo de las transformaciones.....	95
2.3.4.	Medida de las velocidades de transporte (OTR) y consumo de oxígeno (OUR)	97
2.3.5.	Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia	98
2.3.6.	Evaluación de la integridad celular por contaje de viables en placa y fotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	99
2.4.	MÉTODOS MATEMÁTICOS.....	100
2.4.1.	Modelización cinética del crecimiento microbiano y las velocidades de consumo de sustratos y producción de metabolitos	100
2.4.2.	Diseño de experimentos a través de la metodología Taguchi	102
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
3.1.	PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL CON <i>Shimwellia blattae</i> ATCC 33430: CONDICIONES DE OPERACIÓN, INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE SUSTRATO Y DE LAS CONDICIONES FLUIDO-DINÁMICAS.....	109
3.2.	PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL CON <i>Raoultella terrigena</i> CECT 4519: EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE LAS VELOCIDADES DE TRANSPORTE Y CONSUMO DE OXÍGENO.....	114
3.3.	CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>Pseudomonas putida</i> EN MEDIO DE CULTIVO PARA BIO-DESULFURACIÓN: RESPUESTA MICROBIANA A LAS VARIACIONES DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE OXÍGENO.....	115
4.	CONCLUSIONES	121
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	131
6.	ANEXO: PUBLICACIONES	145

SUMMARY

The development of the bioprocesses has experienced a huge growth in the latter decades. The known advantages of the use of enzymes or whole cells as biocatalysts, coupled with the increasingly stringent energy constraints and the new legal regulations promoted by the international organisms to reduce the pollutant emissions, had focused the attention of the scientific community to this area. Consequently, the applied biotechnology has received a great boost by the public and private institutions.

One of the key steps in the development and the start-up of a bioprocess is the scaling-up, which involves the consideration of a large number of variables. Within this field, the study of the influence of fluid dynamic conditions is one of the most relevant aspects, because it determines the relative rates of a set of crucial phenomena in order to ensure the desired behavior of the transformations to be carried out. The fluid dynamic influences the mass transfer rate in the bioreactors, both the contact between the liquid and solid phases (whole cells), and also the gas-liquid transport when one of the substrates is in the gas stream. Moreover, several operational conditions can seriously compromise the biocatalyst integrity, as it occurs in the biological systems with growing cells, due to the collisions between the cells and the solid parts of the reactor or the shear tension produced by the agitation. In addition, if the bioprocess is carried out under aerobic conditions, an oxidative stress can be induced by disequilibrium between the excess of oxygen reactive species and the cell capacity to detoxify the medium.

Therefore, the fluid dynamic of the bioprocesses has a great influence in the so called scale-up, fundamental for the design and the starting-up of the different systems at industrial or pilot plant scales. The transition from lab to pilot plant or industrial scale is made following a group of operational criteria with the objective of reproducing the results obtained in less-scale equipment into larger reactors. Some of these criteria imply reaching the same mass transfer efficiency as on a smaller scale. For this purpose, the study of this transport is essential, taking account that, in a real process at industrial scale, several agitation and mixing regimes could be occur simultaneously, being able to induce situations of hydrodynamic or oxidative stress at the same time in the different regions of a wide-dimension bioreactor, as well as the risk of death-volume or low mixing zones.

This Dissertation intends to apply a methodology for describing and explaining these kind of phenomena in three different biotechnological systems: two aerobic type, the production of 2,3-butanediol from glycerol and the growth of various strains of *Pseudomonas putida* for the bio-desulfurization; and an anaerobic type, the production of 1,3-propanediol from glycerol. The studies presented in the publications contained in this Dissertation involve not only the fluid dynamics and its influence in the behavior of the systems, but also the set-up of the best operational conditions and the kinetic modeling of the experimental results, including the biomass growth and the production or consumption rates of the final metabolites and substrates involved in the different metabolic pathways.

The applied methodology covers several steps in each bioprocess, which are summarized as follows:

1,3-Propanediol production from glycerol by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 and *Shimwellia blattae* ATCC 33430: in this system, two different biocatalysts have been tested in order to study and optimize the production of 1,3-propanediol (1,3-PD) with a strain of a biological risk class 1, instead of the most widely employed ones (biological risk 2). These preliminary studies have allowed selecting a biological risk class 1 biocatalyst, with very promising 1,3-PD production results. Firstly, the most adequately 1,3-PD production conditions have been studied, both in anaerobic bottles and in a stirred tank bioreactor (STBR). Process variables such as the temperature, the influence of initial pH value and its control strategy during the fermentation, the stirring speed, the initial substrate concentration, the use of crude glycerol as sole carbon source and the supply of different airflows throughout the process have been optimized. Additionally, a kinetic model of the process has been proposed, able to describe the rates of biomass growth, substrate uptake and products formation in experiments carried out under several initial glycerol concentrations. This model has been used for describing the influence of the fluid dynamic conditions over the process, through a set of experiments employing a range of stirrer speeds from 100 to 1000 rpm in a STBR. Moreover, in this study additional colony viable counting and transmission electron microscopy (TEM) measurements have been made in order to evaluate the cell viability and the microbial response to changes in the stirrer speed.

2,3-Butanediol production from glycerol by *Raoultella terrigena* CECT 4519: starting up from the operational conditions established in previous works (Ripoll, 2016; Ripoll y col., 2016) the influence of the stirrer speed has been studied and, consequently, the culture response to changes in the oxygen transfer rate (OTR) has been determined in a set of experiments carried out in a STBR from 100 to 2000 rpm. The values of the oxygen transfer and uptake rates, OTR and OUR respectively, have been quantified, the same as the concentration of biomass and the different metabolites of the so called “mixed acid route”. Moreover, the broth viscosity has been measured throughout the experiments with the objective of estimating the value of the volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) and its evolution with time as the bioprocess progresses. Additionally, colony viable counting at different agitation conditions has been made, just like in the previous system. With all of these data the relationship between OTR with the biomass growth, glycerol consumption, synthesis of the mixed acid route metabolites and the response of the culture to changes in fluid dynamic conditions have been described.

Growth of strains of *Pseudomonas putida* for bio-desulfurization processes: in the third system of the present Dissertation the adaptive capacity and the response of four strains of *Pseudomonas putida* to changes in fluid dynamic conditions have been evaluated at lab bioreactor scale, employing the culture medium for the bio-desulfurization of dibenzothiophene (DBT) established in previous works. In an earlier article, the behavior of a genetically modified organism (GMO) of *P. putida* able to desulfurate the DBT into 2-hydroxybiphenyl (2-HBP), cloning the genes of the bio-desulfurization route of *Rhodococcus erythropolis*, have been studied. In both microorganisms, the influence of OTR in the biomass growth as much as in the bio-desulfurization capacity has been determined.

The first publication of this Dissertation related with the bio-desulfurization consists on a preliminary study for determining the effects of changing the OTR over microbial growth and the bio-desulfurization capacity of the GMO of *P. putida*. The experimental observations provided a decrease in the enzymes activity from 300 rpm, while the biomass growth is favored by the increasing of this variable until 600 rpm. From this stirrer speed value to 2000 rpm, all of biomass concentration profiles overlap. Based on these results, the behavior of four different *P. putida* strains, two wild-type ones and two GMO's, under different oxygen supply levels changing stirring speed from 100 to 800

rpm has been evaluated. The concentrations of biomass, nitrogen and carbon sources, together with the OTR, OUR and colony viable counting in Petri dishes have been measured in each one of them. From these data, the behavior of each strain under different agitation conditions and the influence of genetic changes over the microbial response under oxygen limitation conditions have been established.

The results obtained in this Dissertation indicate the relevance of the study of the fluid dynamic conditions in the development of a bioprocess, both in anaerobic or aerobic conditions. In the view of the extracted conclusions, it can be deduced that the methodology employed can be useful in the scale-up of the bioprocesses studied and also it can be used in other systems employing suspended cells as biocatalysts, working in different ways of production (batch, resting cells, etc) for the most used type of bioreactor in the industry: the STBR.

RESUMEN

El desarrollo de bioprocesos ha experimentado un enorme crecimiento en las últimas décadas. Las ventajas que presentan los procesos realizados con células vivas y sus enzimas, utilizados como biocatalizadores, junto con las cada vez más exigentes restricciones energéticas y de emisiones contaminantes promovidas por las instituciones internacionales, han centrado la atención de la comunidad científica en esta área, recibiendo un gran impulso por parte de organismos públicos y privados.

Dentro del elevado número de variables que hay que considerar en el cambio de escala de un bioproceso y su puesta en marcha, el estudio de la influencia de las condiciones fluido-dinámicas es uno de los aspectos más relevantes, ya que determina las velocidades relativas de un conjunto de fenómenos claves para asegurar el comportamiento deseado de los procesos que se pretende llevar a cabo. La fluido-dinámica condiciona no sólo el transporte de materia entre fases en los reactores, tanto a nivel de contacto entre las fases líquida y sólida (células), sino también el transporte gas-líquido cuando alguno de los sustratos se encuentra en fase gas. Además, determinadas condiciones de agitación pueden comprometer seriamente la integridad del biocatalizador, como ocurre en los sistemas biológicos con células completas, donde pueden inducirse situaciones de estrés hidrodinámico, debido a la colisión entre las células y los elementos sólidos del reactor o, simplemente, por el esfuerzo cortante que se origina con la agitación. También puede inducirse un estrés oxidativo, que se produce en sistemas aerobios por un desequilibrio entre el exceso de especies reactivas del oxígeno y la capacidad celular para destoxificar el medio.

La fluido-dinámica de los bioprocesos tiene, por lo tanto, una gran influencia en el llamado cambio de escala, fundamental para el diseño y la puesta en marcha de los sistemas a escala industrial o en planta piloto. El paso de una a otra escala se realiza siguiendo una serie de criterios operacionales para reproducir en los equipos de mayores dimensiones los resultados obtenidos en escalas menores, en el laboratorio usualmente. Varios de estos criterios implican obtener la misma eficacia en el transporte de materia que a pequeña escala, para lo cual es necesario haber estudiado previamente dicho transporte, teniendo en cuenta además que en un proceso real a escala industrial pueden existir diferentes regímenes de agitación y mezcla, de modo que van a producirse simultáneamente diversas situaciones de las anteriormente citadas en diferentes zonas de

un reactor de gran tamaño, así como el riesgo de volúmenes muertos o zonas de muy bajo nivel de mezcla.

La presente Tesis pretende aplicar una metodología concreta para describir y explicar este tipo de fenómenos en tres sistemas distintos: dos de tipo aerobio, la producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol y el crecimiento de varias cepas distintas de *Pseudomonas putida* para la bio-desulfuración; y uno de tipo anaerobio, la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol. Los estudios realizados no comprenden sólo la fluido-dinámica y su influencia en el comportamiento de los sistemas, sino también el establecimiento de las mejores condiciones de operación y la modelización cinética de los mismos, tanto a nivel del crecimiento celular como de las velocidades de consumo de sustratos y de producción de otros metabolitos.

La metodología empleada comprende diferentes etapas en cada uno de los tres sistemas, que se resumen a continuación:

Producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol con *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 y *Shimwellia blattae* ATCC 33430: en este bioproceso, se han probado dos microorganismos diferentes, con el objetivo de estudiar y optimizar el proceso de producción con un biocatalizador que tuviera un nivel de bioseguridad de tipo 1, en lugar de los habitualmente empleados, de tipo 2. El resultado de estos estudios preliminares ha permitido seleccionar un microorganismo novedoso de tipo 1 con resultados muy prometedores. En primer lugar se han estudiado las condiciones de producción más adecuadas, habiéndose experimentado tanto a escala de botellas anaerobias como en un biorreactor tipo tanque agitado: Se han estudiado variables como la temperatura, la influencia del pH inicial en el proceso, la estrategia de control de pH, la velocidad de agitación, la concentración inicial de sustrato, el empleo de glicerol crudo como fuente de carbono y el aporte de pequeñas cantidades de aire durante la fermentación. Asimismo, se ha elaborado un modelo cinético capaz de reproducir las velocidades de crecimiento, consumo de sustrato y síntesis de los principales productos de la ruta que describe bien los resultados obtenidos en experimentos realizados con diferentes concentraciones iniciales de glicerol. Dicho modelo ha sido también empleado para describir la influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre el proceso, a través de un estudio a diferentes velocidades de agitación comprendidas entre 100 y 1000 rpm en un biorreactor tipo tanque agitado. En dicho estudio se han realizado medidas adicionales de conteo de viables en

placa y fotografías por Microscopía Electrónica de Transmisión (SEM) con el objeto de evaluar la viabilidad celular y la respuesta microbiana a los cambios en la velocidad de agitación.

Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol con *Raoultella terrigena* CECT 4519: partiendo de las condiciones de operación en crecimiento fijadas en trabajos anteriores, se ha estudiado la influencia de la agitación y, por tanto, de la velocidad de transferencia de oxígeno, sobre el comportamiento del cultivo mediante un estudio realizado en un biorreactor tipo tanque agitado en un intervalo de agitaciones entre 100 y 2000 rpm. En dicho estudio se han determinado las velocidades de transferencia y consumo de oxígeno, se han cuantificado tanto la concentración de biomasa como los perfiles de concentración de los diferentes metabolitos de la ruta ácido mixta, se ha medido la viscosidad del caldo a lo largo del tiempo en experimentos realizados a distintas velocidades de agitación, para poder así determinar el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia y su posible cambio con el tiempo según la transformación progresa. También se han realizado medidas de conteo de viables en placa, como en el proceso anterior. Con todos estos datos se ha descrito la relación de la velocidad de transferencia de oxígeno con el crecimiento celular, el consumo de glicerol, la producción de los diferentes metabolitos de la ruta y se ha evaluado también la respuesta del cultivo a las distintas condiciones fluido-dinámicas.

Crecimiento de cepas de *Pseudomonas putida* para procesos de bio-desulfuración: en este tercer sistema se ha evaluado la capacidad de adaptación y respuesta de varias cepas de *Pseudomonas putida* a cambios en las condiciones fluido-dinámicas a escala de biorreactor con el medio de cultivo establecido en trabajos anteriores para la desulfuración de dibenzotiofeno (DBT), usualmente utilizado como compuesto modelo para este tipo de estudios. En un trabajo anteriormente publicado se ha estudiado el comportamiento de una cepa de *P. putida* modificada genéticamente capaz de desulfurar DBT, incluyendo los genes de la ruta de bio-desulfuración de *Rhodococcus erythropolis*. Para ambos microorganismos se determinó la influencia del aporte de oxígeno tanto en el crecimiento como en la capacidad desulfurante acumulada por las células.

La primera publicación relacionada con la bio-desulfuración en la presente Memoria consiste en un estudio previo para determinar los efectos de modificar la velocidad de transporte de oxígeno sobre el crecimiento celular y la capacidad desulfurante

de la cepa de *P. putida* modificada genéticamente, observándose un decrecimiento en la actividad de las enzimas involucradas en la bio-desulfuración a partir de una velocidad de agitación de 300 rpm, mientras que el crecimiento se ve favorecido por el aumento de esta variable hasta 600 rpm, valor a partir del cual todos los perfiles de concentración de biomasa solapan entre sí.

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha estudiado el comportamiento de 4 cepas de *P. putida*, dos de ellas modificadas genéticamente y dos *wild-type*, en experimentos cuya agitación (de 100 a 800 rpm) implica diferentes niveles de aporte de oxígeno, desde bajo a medio-alto. En cada uno de ellos se ha cuantificado las concentraciones de biomasa y los sustratos nitrogenados, así como la velocidad de transferencia y consumo de oxígeno además de la evolución del número de colonias viables a lo largo de cada experimento. De esta forma, se ha establecido el comportamiento de cada cepa bajo diferentes condiciones de agitación y la influencia de las mutaciones genéticas sobre la respuesta celular a condiciones de bajo nivel de oxígeno disponible.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral señalan la importancia del estudio de las condiciones fluido-dinámicas en el desarrollo de un bioproceso, tanto en sistemas aerobios como anaerobios. A la vista de las conclusiones extraídas, se deduce que la metodología empleada puede ser muy útil para el cambio de escala de los bioprocursos estudiados y que también puede ser utilizada en otros sistemas que empleen células en crecimiento como biocatalizadores, tanto en el caso de procesos aerobios como anaerobios, empleando distintas formas de producción (*batch*, *resting cells*, etc.), para el tipo de biorreactor más empleado a nivel industrial, el tipo tanque agitado.

OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El principal objeto del presente trabajo es estudiar la influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre tres bioprocesos de distinta naturaleza (dos de tipo aerobio y uno de tipo anaerobio), estudiar el efecto de ciertas variables para mejorar la producción de los compuestos de interés con células en crecimiento en biorreactor y la modelización matemática del comportamiento de dichos sistemas bajo diferentes condiciones de operación. Para ello, se ha empleado la metodología desarrollada en el Grupo de Investigación *Fisicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* (FQPIMA-910134) del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, donde se ha realizado el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

Los bioprocesos de naturaleza aerobia estudiados se corresponden con la producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol empleando *Raoultella terrigena* CECT 4519 como biocatalizador y la bio-desulfuración de dibenzotiofeno (DBT) con distintas cepas de *Pseudomonas putida*. En ambos casos se cuantificará tanto el crecimiento como el consumo de sustratos, la producción de los diferentes metabolitos y la evolución de la viabilidad celular en cultivos llevados a cabo a diferentes velocidades de agitación en un biorreactor tipo tanque agitado con un aporte continuo de aire, por burbujeo desde el fondo. Como resultado de estos ensayos se determinará la influencia de la modificación de la velocidad de transferencia de oxígeno a través de la agitación sobre el crecimiento, el consumo de sustratos y la síntesis de metabolitos, así como los efectos derivados del posible estrés hidrodinámico u oxidativo sobre la viabilidad microbiana.

El sistema de tipo anaerobio trata de la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol con *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 y *Shimwellia blattae* ATCC 33430. En este caso, se determinarán primero las mejores condiciones de operación con células en crecimiento, tanto a escala de botella agitada como en biorreactor para seleccionar el biocatalizador más adecuado para este proceso. Posteriormente, se estudiará con este último el efecto de los cambios en las condiciones fluido-dinámicas a través de la agitación en el crecimiento, la producción de los diferentes productos de la ruta metabólica, el consumo del sustrato carbonado y la respuesta celular a los efectos del estrés hidrodinámico mediante la cuantificación de distintas variables morfológicas y fisiológicas que guardan relación con la viabilidad y la integridad celular en este sistema.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico humano ha sido el motor fundamental del progreso, el bienestar y el crecimiento económico y social desde que éste diera un enorme impulso a partir de la Revolución Industrial a finales del siglo XVIII. La invención de la máquina de vapor cambió el acceso a la energía y por completo la fuerza de trabajo, que hasta ese momento empleaba la fuerza humana y animal en la producción agrícola y manufacturera. Aquel punto de inflexión supuso la introducción del trabajo fabril, la producción en cadena y el uso de combustibles fósiles en detrimento de la madera. Un auténtico cambio de paradigma en la historia de la humanidad (Fernández, 2012).

La invención de la máquina de vapor y, posteriormente, de los motores de combustión, modificó no sólo el modelo productivo de los diferentes países, sino también el desarrollo de los medios de transporte, con el impulso del ferrocarril y los grandes barcos de vapor. El alto poder calorífico del carbón fue aprovechado en forma de energía térmica y mecánica con los primeros sistemas de generación de energía eléctrica para alumbrado urbano y de calefacción en los hogares. Posteriormente, aunque no se abandonó el uso del carbón, comenzó con fuerza el uso del petróleo como combustible fósil (Juan, 1993; Fernández, 2012). Este compuesto ya se conocía desde finales del siglo XVIII, pero su explotación y refino comenzó a implementarse a mediados del siglo XIX. Su mejor eficiencia como fuente de energía terminó por asentar el nuevo modelo de desarrollo humano, basado en la explotación de los distintos yacimientos del llamado “oro negro” y su combustión para la generación de energía térmica, principal motor de los diferentes procesos de producción tecnológicos con los que hoy cuenta la humanidad.

Los problemas derivados de la contaminación por la quema de estos combustibles ya se manifestaron en los grandes centros industriales de Inglaterra y Alemania a finales del siglo XIX y principios del XX, por lo que, a comienzos de los años veinte del pasado siglo, se comenzó a explorar las primeras fuentes alternativas de energía (Martínez, 2013; Ripoll, 2016). La primera de ellas, la hidráulica, fue utilizada mucho tiempo antes y se empleaba en los diferentes sistemas de transporte de agua desde los ríos o manantiales a las distintas poblaciones; pero en esta ocasión la invención resultó del acoplamiento de una turbina en contacto con el agua en movimiento con un generador eléctrico, de manera que se pudo transformar la energía potencial de los saltos de agua en energía mecánica y, ésta a su vez, en energía eléctrica lista para su distribución y utilización. La segunda, la energía

nuclear, tuvo un impulso inicial después de la II Guerra Mundial, aunque, como es sabido, derivada de este conflicto bélico. Su uso militar dejó una huella imborrable en la historia, de modo que su empleo en la producción de energía eléctrica fue limitado debido a su imagen problemática.

La huella de la combustión se hizo patente con la constatación del aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera y su efecto en el calentamiento global por el llamado efecto invernadero. A esta situación se unieron las dos crisis del petróleo, en 1973 y 1979, respectivamente, el supuesto agotamiento de las reservas de petróleo y gas natural, y la destrucción de importantes ecosistemas marinos y terrestres como consecuencia de la explotación de numerosos yacimientos de recursos naturales y algunos accidentes de gran trascendencia, sobre todo en el transporte (Meadows y col., 2006).

El consumo de energía no ha dejado de aumentar durante los últimos 200 años; la demanda energética se incrementa año tras año por el aumento de población y por el aumento del nivel de vida de regiones muy pobladas. Esta situación llevó a la comunidad científica a explorar fuentes alternativas de energía a partir de los años noventa. Así surgieron las llamadas energías renovables, tales como la eólica, la solar y la geotérmica, y los biocombustibles, entre los que destacan el bioetanol y el biodiesel, aunque los combustibles fósiles siguen representando más del 80 % del consumo energético global (ver Figura 1).

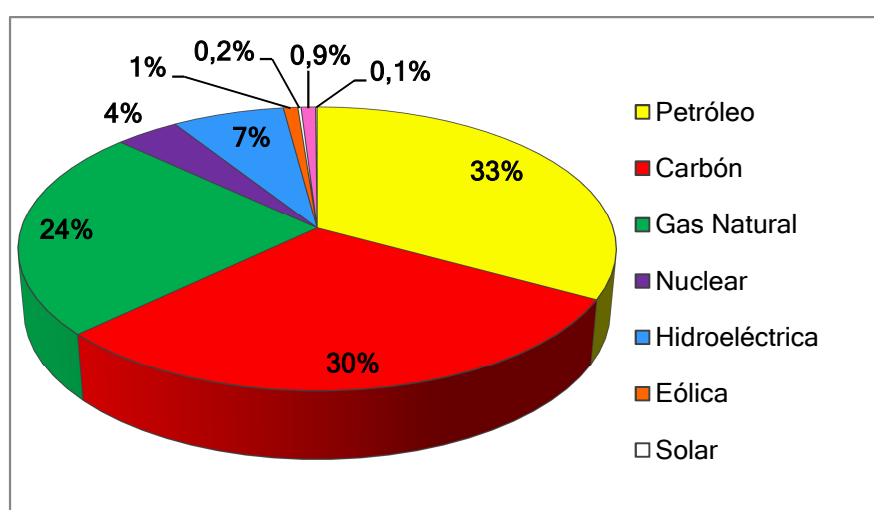


Figura 1. Distribución del consumo energético mundial en 2013 (BP, 2014).

Simultáneamente, de nuevo a partir de la II Guerra Mundial, con la producción de antibióticos como primer gran producto ampliamente demandado, comienza lo que hoy día se llama Biotecnología. Se desarrollan investigaciones para modificar los procesos de fabricación dentro de la industria química, con el objetivo de reducir el consumo energético, aumentar la selectividad de las transformaciones y reducir la cantidad y peligrosidad de los residuos generados y, sobre todo, para obtener nuevos productos no sintetizables por vía química.

Este impulso permitió el surgimiento de la Biotecnología, como *“la aplicación de principios de la ciencia y la ingeniería para tratamientos de materiales orgánicos e inorgánicos por sistemas biológicos para producir bienes y servicios”* (Duque, 2010). Esta área incluye ramas de la ingeniería, la biología, la física, la química, la medicina y la veterinaria, con aplicaciones en la industria farmacéutica, la industria alimentaria y cosmética, el tratamiento de residuos urbanos y de otros tipos, aplicaciones en agricultura, en la producción de monómeros, polímeros y combustibles, etc.

La Biotecnología representa un sector industrial en pleno desarrollo, con un volumen de negocio que en 2010 ya alcanzó los 74.000 M\$ en Estados Unidos y más de 15.000 M€ en Europa, con una demanda creciente que aumentó en un 80 % desde 2009 a 2015 (Biocomb, 2015). Las principales ventajas de estos procesos residen en el empleo de condiciones de operación más suaves que los procesos industriales convencionales, ya que se trabaja con catalizadores que incluyen enzimas o células completas. La selectividad hacia los productos de interés es mayor que en las transformaciones químicas clásicas, y se ha visto sensiblemente mejorada con el aporte de la Biología Molecular, y en particular de la Ingeniería Genética, que permite modificar el genoma de los microorganismos empleados como biocatalizadores para dirigir su metabolismo hacia las rutas deseadas (Garibay y col., 1993; Castillo, 2005).

Este gran impulso de la Biotecnología ha supuesto el desarrollo y la implantación de los bioprocesos dentro de la industria química, como procesos que emplean células vivas o algunos de sus componentes (enzimas, cloroplastos, etc) para obtener los cambios físicos o químicos deseados (Papoutsakis y Titchener-Hooker, 2016). Como en todo proceso de transformación, el transporte de materia y energía es fundamental para la mejora y utilización industrial de este tipo de sistemas, ya que permite incrementar la selectividad, el rendimiento y la eficiencia del proceso en diferentes modos de operación,

tanto si los sistemas trabajan en discontinuo o por cargas, como si lo hacen con un aporte continuo de las fases en contacto o con alguna de ellas alimentada cada cierto tiempo mediante pulsos, como ocurre en las producciones en *fed-batch* (Telen y col., 2012; Trinh y Mendoza, 2016).

En este contexto, el estudio de la fluido-dinámica en los bioprocesos supone una herramienta fundamental para su desarrollo y puesta en marcha, ya que determina aspectos fundamentales del sistema como el grado de mezcla o la eficiencia de transporte entre las distintas fases (García-Ochoa y Gómez, 2009; Escobar, 2013). Por otro lado, las condiciones fluido-dinámicas pueden incidir sobre la actividad metabólica del biocatalizador y su integridad, afectando consigo al rendimiento y la selectividad del proceso. Por último, los resultados del estudio de la fluido-dinámica pueden determinar los criterios de cambio de escala del bioproceso (García-Ochoa y col., 2010); es decir, las condiciones de operación en reactores de mayor tamaño (en planta piloto o industrial) para reproducir los resultados obtenidos a escala de laboratorio (Merchuk, 1991; Puthli y col., 2005; Bandaipheth y Prasertsan, 2006).

1.1. LA IMPORTANCIA DE LA FLUIDO-DINÁMICA EN EL DESARROLLO DE BIOPROCESOS

Como ya se ha comentado, los estudios de fluido-dinámica en los bioprocesos se enmarcan dentro de las etapas de mejora de las transformaciones que tienen lugar en el interior de un biorreactor, donde se ponen en contacto fases de diferente naturaleza: una fase líquida donde se encuentran disueltos los sustratos, que así son disponibles para el biocatalizador; una fase sólida, el biocatalizador puede estar disuelto en el propio líquido (enzimas) o en suspensión (células completas), pero forma una nueva fase, o bien puede estar, en ambos casos, inmovilizados, o claramente separados del resto del medio de reacción; y una fase gaseosa en la que puede estar presente algún nutriente necesario para el biocatalizador que deben incorporarse al líquido (oxígeno) o, al revés, la evacuación de un compuesto que debe pasar del líquido al gas. A esto hay que sumar la posibilidad de que puedan ponerse en contacto fases líquidas no miscibles o parcialmente miscibles, como ocurre en los algunos bioprocesos, con enzimas en fase orgánica, como ciertas

esterificaciones y trans-esterificaciones, de tratamiento de aguas o purificación de fracciones orgánicas, etc. (Escobar, 2013).

En este sentido, la fluido-dinámica constituye una importante herramienta para determinar aspectos fundamentales de los procesos biotecnológicos y mejorar con ello la operatividad, la selectividad, la productividad o el rendimiento hacia los productos de interés.

1.1.1. La fluido-dinámica en los bioprocesos: grado de mezcla, aporte de nutrientes gaseosos y efectos sobre la integridad celular

El transporte entre las fases líquidas es un fenómeno trascendental para asegurar la eficiencia del biocatalizador en un bioproceso. Ya sea un biocatalizador disuelto o en suspensión, los sustratos carbonados y nitrogenados que forman parte del medio de cultivo deben estar disponibles para las células o las enzimas que catalizan la transformación, de modo que si la etapa limitante de la velocidad del proceso es dicho transporte, su efecto en el progreso del proceso debe ser tenido en cuenta, como ya se ha indicado en múltiples aspectos, cinéticos fundamentalmente.

Fluido-dinámica y grado de mezcla

El grado de mezcla en un biorreactor se logra a través de la agitación de la fase líquida por diversos sistemas que posibilitan su movimiento continuo. Los más utilizados son elementos sólidos insertos en un eje acoplado a un motor que gira a diferentes revoluciones en función de las necesidades del proceso. El objetivo es lograr una buena mezcla que proporcione un medio y un cambio homogéneo en todo el volumen del reactor.

Para lograr ese objetivo no sólo es necesario determinar la velocidad de agitación más adecuada para un bioproceso concreto, sino también cómo corregir las deficiencias del flujo en el interior del reactor y si el hecho de emplear un biocatalizador puede modificar con el tiempo alguna de las propiedades físicas del fluido, de manera que el flujo no sea el ideal a lo largo de todo el volumen y tiempo de reacción.

En un biorreactor industrial es fácilmente imaginable que el grado de mezcla no va a ser totalmente uniforme en cada elemento de fluido considerado. Esto implica que, en función de la posición de la porción de líquido considerada con respecto al agitador, la

eficiencia del transporte entre las fases va a ser mayor o menor. Uno de los fenómenos más comunes, sobre todo en medios muy viscosos (relativamente frecuentes) es el de la existencia de volúmenes muertos o regiones de muy baja o nula agitación, en aquellas regiones más alejadas de los agitadores. Para evitar este tipo de situaciones suelen instalarse elementos sólidos próximos a las paredes del reactor, conocidos como tabiques deflectores. Se trata de estructuras metálicas que mejoran la mezcla del fluido, rompiendo las líneas de flujo o de corriente durante la agitación y evitan la formación de remolinos próximos al eje del motor de agitación.

Otro aspecto fundamental del empleo de biocatalizadores en sistemas de reacción es el posible cambio a lo largo de la transformación de alguna de las propiedades de la fase líquida, sobre todo si se emplean células en suspensión. En algunos casos, los microorganismos excretan ciertas sustancias al medio de reacción como resultado de su metabolismo, que pueden ser perjudiciales para el comportamiento global del sistema, pues modifican el grado de mezcla, reduciendo consigo la eficiencia del proceso (García-Ochoa y Gómez, 2005; García-Ochoa y col., 2010). Esto puede ocurrir cuando se produce la generación de espumas, que empeoran el contacto entre el líquido y las células y reducen la tensión superficial; o con la secreción de exo-polisacáridos, que incrementan la viscosidad del líquido, o el crecimiento de un biofilm: una matriz proteica alrededor de la pared bacteriana que supone una resistencia adicional al transporte de materia (Joshi y col., 1996; Bandaipheth y Prasertsan, 2006; Gambino y Cappitelli, 2016). Por todo ello, es común la adición de sustancias antiespumantes o la instalación de discos rompe-espumas en la parte superior del eje del agitador, para controlar también el volumen de reacción y que éste sea lo más homogéneo posible.

El estudio de la fluido-dinámica, por tanto, implica considerar todos los efectos anteriormente descritos a escala de laboratorio y desarrollar estrategias o protocolos de adecuación de las condiciones de operación del proceso para asegurar una buena mezcla durante toda la transformación y minimizar los efectos derivados de la agitación sobre el biocatalizador; aspectos de deberán ser tenidos en cuenta cuando se realice el cambio de escala.

Transporte gas-líquido

En la mayor parte de los bioprocesos, en los sistemas aerobios, se requiere del aporte de una fase gaseosa que contiene un nutriente imprescindible para el crecimiento microbiano y el desarrollo del bioproceso, el oxígeno. Pero en los sistemas anaerobios, desde un punto de vista fundamental, la situación es similar, ya que algún compuesto, o varios, como CO₂, metano u otros, deben ser evacuados de la fase líquida hacia la fase gas para que el bioproceso progrese.

El transporte gas-líquido es uno de los fenómenos clave de este tipo de sistemas, especialmente porque los nutrientes contenidos en la fase gaseosa son poco miscibles en el líquido, como ocurre con el oxígeno o el dióxido de carbono. El transporte gas-líquido fue descrito ya en 1923 gracias a la teoría de la doble película de Lewis y Whitman, basada en dos postulados fundamentales (Whitman, 1923; Lewis y Whitman, 1924):

- El transporte de un componente contenido en una fase gaseosa hacia una fase líquida se produce en la interfase gas-líquido. A ambos lados de ésta existen dos películas o capas de fluido en las que se produce un gradiente de concentraciones por difusión molecular del componente a transferir y que, por ello, constituyen una resistencia al transporte de materia. Este gradiente es lineal en cada una de las películas y nulo fuera de ellas, ya que en el seno de cada una de las fases la agitación provoca una difusión del componente por turbulencia, siendo uniforme la concentración de éste.
- En la interfase, las concentraciones del componente a transferir se encuentran en equilibrio y, por tanto, la cantidad transportada a la capa líquida desde la fase gaseosa será aquella que se encuentre en equilibrio con la presión parcial del componente en el gas, conforme a la Ley de Henry ($p_i = K_H \cdot C_i$).

Considerando estas dos resistencias en serie, el flujo a través de cada película (N_A) se define como el producto de una fuerza impulsora, la diferencia de concentraciones entre la interfase y el seno del fluido, por un coeficiente de transferencia de materia local de las fases gaseosa (k_G) y líquida (k_L):

$$N_A = k_G \cdot (p_G - p_i) = k_L \cdot (C_i - C_L) \quad (1)$$

Donde p_G es la presión parcial del componente en el seno de la fase gaseosa, p_i la presión parcial en la interfase, C_i la concentración de la interfase líquida y C_L la concentración del componente en el seno del líquido. Teniendo en cuenta la dificultad de medir la presión y la concentración en la interfase se aplica el segundo postulado de la teoría de la doble capa, que el equilibrio en la interfase se alcanza instantáneamente, de forma que el transporte global entre ambas fases puede definirse mediante la siguiente ecuación:

$$N_A = K_G \cdot (p_G - p^*) = K_L \cdot (C^* - C_L) \quad (2)$$

Siendo p^* y C^* la presión parcial y la concentración en equilibrio del componente a transferir dadas por la ley de Henry ($p^* = K_H \cdot C^*$), y K_L y K_G los coeficientes globales de transferencia de materia en las fases líquida y gaseosa, respectivamente (Lewis y Whitman, 1924). Combinando las ecuaciones [1] y [2] se obtiene:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{K_H \cdot k_G} + \frac{1}{k_L} \quad (3)$$

Considerando además que el componente a transferir es poco soluble en la fase líquida, suele admitirse que la mayor resistencia al transporte de materia se produce en la capa líquida próxima a la interfase (ver Figura 2) y, por tanto, que el coeficiente global de transferencia de materia es prácticamente igual al coeficiente local de la fase líquida y que, en consecuencia, $K_L \approx k_L$.

Sin embargo, la teoría de la doble capa no es la única que define por completo la resistencia global a la transferencia de materia en un bioproceso, sino que una vez que el componente es transferido al líquido existen una serie de resistencias adicionales que éste debe superar para estar disponible para el biocatalizador, conforme muestra la Figura 3 (García-Ochoa y Gómez, 2009).

El esquema de la Figura 3 indica que, además de la transferencia entre fases, los diferentes nutrientes deben transferirse, algunos, desde la película de líquido que rodea la burbuja de gas al seno del líquido y, todos ellos, de ahí a la región de líquido que rodea a la superficie externa de las células. Una vez allí debe ser transportado al entorno de la membrana plasmática y, mediante los sistemas de transferencia del biocatalizador, se traslada al interior de la célula donde es utilizado como nutriente.

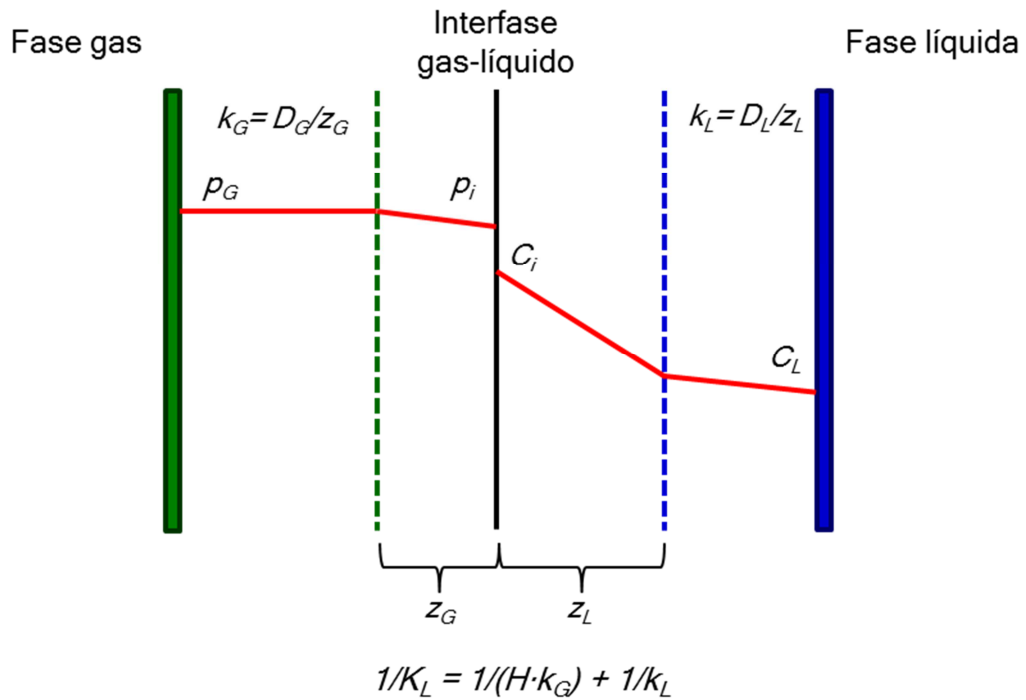


Figura 2. Esquema del transporte gas-líquido conforme a la teoría de la doble capa de Lewis-Whitman. Adaptado de (García-Ochoa y Gómez, 2009).

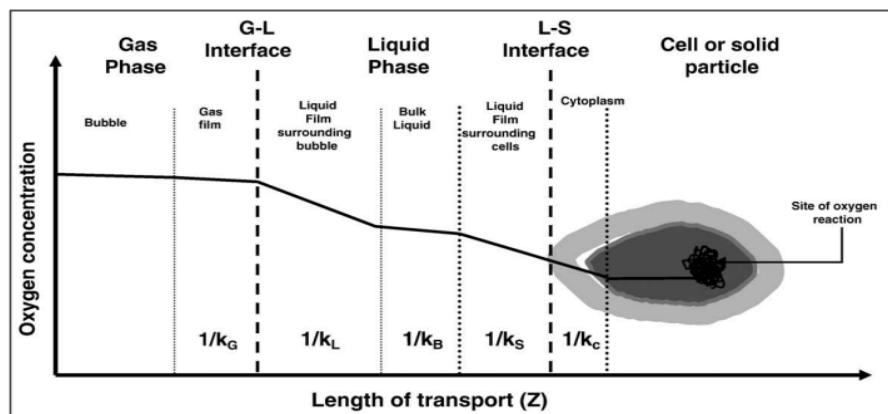


Figura 3. Resistencias adicionales al transporte de materia gas-líquido en un bioproceso con células en suspensión (García-Ochoa y Gómez, 2009).

Englobando todos estos fenómenos se considera que el caudal transferido de una fase a otra (J^0) es el producto de la densidad de flujo, N_A , por el área de intercambio (a), definido a partir de la ecuación (1) como un coeficiente volumétrico global de transferencia de materia ($k_L a$) por una fuerza impulsora ($C^* - C_L$):

$$J^0 = N_A \cdot a = k_L a \cdot (C^* - C_L) \quad (4)$$

Teniendo en cuenta que C^* viene determinada por la solubilidad, es decir, por el equilibrio y coeficiente de reparto entre fases, por tanto solo depende de la presión y de la temperatura en el interior del reactor, el mayor efecto que ejercen las condiciones fluido-dinámicas sobre el transporte gas-líquido se realiza sobre el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, cuya dependencia será descrita en detalle en el apartado 3.1.1 de la presente Introducción.

En los sistemas que operan con células en suspensión, la fluido-dinámica no sólo determina la eficiencia del contacto entre las fases, sino también el comportamiento y la integridad del propio biocatalizador, como ocurre en la mayor parte de bioprocesos aerobios o en aquéllos cuyo nutriente clave se encuentra en una corriente gaseosa que atraviesa el medio de cultivo. El caudal de aireación y la velocidad de agitación pueden tener efectos negativos sobre las células, modificando su morfología, su fisiología y su viabilidad, pudiendo producirse situaciones de estrés de diferente naturaleza. Estos fenómenos serán descritos en detalle en el apartado 2.1.3. de este documento.

1.1.2. La relevancia del oxígeno en los procesos aerobios

En el metabolismo celular hay dos formas de obtención de energía química en forma de la molécula de intercambio por excelencia en los seres vivos, el adenosín trifosfato (ATP) (Voet y col., 2007; Escobar, 2013):

- *Fermentación:* se trata de un conjunto de reacciones de oxidación-reducción (fosforización a nivel de sustrato), que ocurren en el interior de la célula en ausencia de oxígeno, sin la participación de una cadena transportadora de electrones. En una fermentación son los propios compuestos orgánicos los que funcionan como dadores y/o aceptores finales de electrones, junto con otros

co-factores metabólicos como el nicotín-adenín dinucleótido en su forma oxidada (NAD^+) o reducida ($\text{NADH}+\text{H}^+$).

- *Respiración:* las reacciones de oxidación-reducción se producen con la participación de una cadena transportadora de electrones. En función de la naturaleza del aceptor final de electrones se puede diferenciar entre la respiración aerobia (cuando es el oxígeno el aceptor final) y la respiración anaerobia, que emplea otros compuestos oxidados como el nitrato, el sulfato o el propio dióxido de carbono.

El rendimiento energético de la respiración es mucho más alto que el de la fermentación, pero en aquellos microorganismos aerobios que disponen de cadena respiratoria el metabolismo puede ir de uno a otro en función de la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. La energía obtenida por ambos mecanismos es imprescindible para las reacciones anabólicas del metabolismo celular; es decir, aquellas que suponen la biosíntesis de moléculas orgánicas complejas a partir de precursores sencillos que ejercen una función celular, como las proteínas, los fosfolípidos y los lipopolisacáridos de membrana o los lípidos de reserva (Melo y col., 2007; Voet y col., 2007). Es por ello que tanto la fermentación como la respiración forman parte del metabolismo, concretamente del catabolismo, cuya función es la degradación de compuestos orgánicos para la obtención de energía química. Las moléculas empleadas por las células como fuente de energía pueden ser de naturaleza orgánica, como la glucosa, el glicerol o los ácidos orgánicos de cadena corta (butírico, octanoico, glutámico, etc), o inorgánica (CO , CO_2). Si la fuente es orgánica se habla de metabolismo heterótrofo, mientras que si es de origen inorgánico, como ocurre con las células vegetales que emplean el dióxido de carbono, se trata de un metabolismo de tipo autótrofo.

Las rutas de degradación de moléculas orgánicas en el interior de las células incluyen la glucólisis, la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, el ciclo de Krebs o ciclo de ácidos tricarbóxicos, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, tal y como se esquematiza en la Figura 4 (Voet y col., 2007):

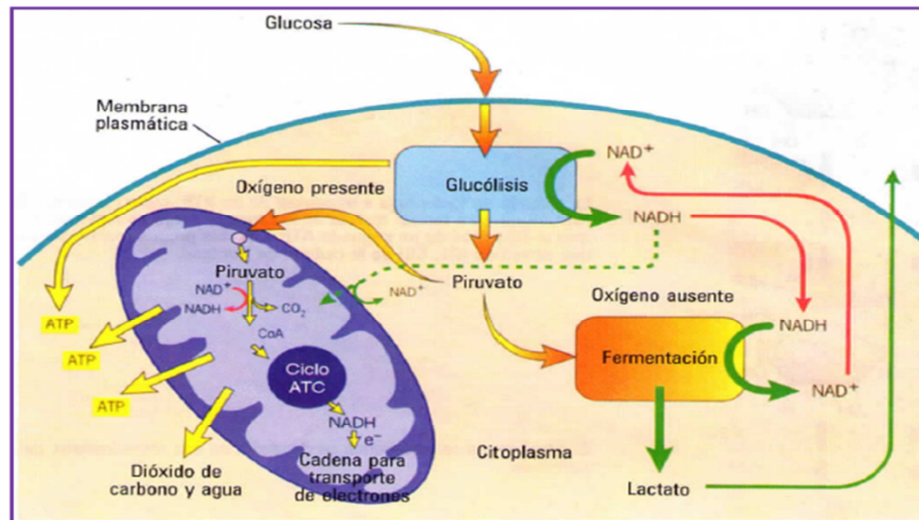


Figura 4. Esquema de la fermentación y la respiración celular en un organismo eucariota (Voet y col., 2007).

Tal y como se ha descrito anteriormente, la disponibilidad de oxígeno es un factor determinante para el comportamiento de un cultivo microbiano de tipo aerobio, ya que condiciona el flujo metabólico que van a seguir los sustratos carbonados en el interior de las células, la velocidad de crecimiento del microorganismo y los productos finales de la transformación. El aporte de oxígeno está condicionado en primer lugar por su baja solubilidad en agua (en torno a 7,3 mg/L a 30 °C y 1 atm de presión), de modo que en muchos casos su escasez puede resultar un factor limitante de la velocidad de este tipo de bioprocesos. En el caso de sistemas respiratorios, esta demanda de oxígeno es todavía más elevada y se suele medir en torno al valor del llamado coeficiente respiratorio (CR, ecuación (6)), para conocer la cantidad de oxígeno necesario para producir el dióxido de carbono resultante de la oxidación total del sustrato carbonado (Mora, 2002).

$$CR = \frac{\text{moles de } CO_2 \text{ producidos en la oxidación del sustrato}}{\text{moles de } O_2 \text{ consumidos}} \quad (6)$$

Si el sustrato oxidado es un azúcar, el coeficiente respiratorio suele estar en torno a 1, mientras que en lípidos y proteínas este valor se sitúa en torno a 0,7 y 0,8, respectivamente.

La disponibilidad de oxígeno en un bioproceso aerobio se describe a través de su velocidad de transferencia, en inglés *oxygen transfer rate* (OTR), que aporta el oxígeno disuelto al medio de cultivo. Una vez que éste está disponible para las células será

consumido por ellas a una velocidad determinada, *oxygen uptake rate* (OUR). La dinámica entre ambas magnitudes a lo largo de la transformación determina el comportamiento del cultivo y define las condiciones en que la etapa limitante de la velocidad es el transporte o el consumo de este nutriente. Ambas variables son fundamentales para el cambio de escala del bioproceso, ya que su optimización establece las condiciones de operación del sistema y el diseño del biorreactor a escala de planta piloto e industrial (García-Ochoa y col., 2010; Escobar y col., 2016; Ripoll, 2016).

Relación entre velocidad de transferencia (OTR) y velocidad de consumo (OUR)

La ecuación (4) aplicada al oxígeno se puede escribir de la siguiente manera:

$$J_{O_2} = N_{O_2} \cdot a = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (7)$$

Ésta es la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), que depende fundamentalmente del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, ya que la fuerza impulsora viene dada por las condiciones de presión y temperatura del reactor y por la velocidad de consumo del sistema, que marca el valor de “ C_{O_2} ” en cada momento. El valor del coeficiente “ $k_L a$ ” depende de numerosas variables, como las condiciones de operación, el tipo de reactor y su geometría y las propiedades físicas de las fases líquida y gaseosa (Kawase y col., 1992; Kawase y Hasinguchi, 1996; Tobajas y col., 1999; García-Ochoa y Gómez, 2005).

Cuando se estudia el transporte de oxígeno a pequeña escala, como por ejemplo en un matraz Erlenmeyer agitado en una incubadora orbital, el transporte se produce por la superficie de contacto gas-líquido, así como de la velocidad de intercambio de gases entre el interior y el exterior del matraz, normalmente tapado con un tapón de algodón (u otro material poroso) para evitar la contaminación del cultivo (Klöckner y Büchs, 2011).

En biorreactores de mayor tamaño deben tenerse en cuenta una serie de aspectos y/o variables a la hora de medir y evaluar el transporte gas-líquido (Kawase y Moo-Young, 1988; Kapic y Heindel, 2006; García-Ochoa y Gómez, 2009; Hassan y col., 2012):

- 1) *Condiciones de operación*: temperatura, presión, agitación, aireación, etc.
- 2) *Parámetros geométricos del reactor*: forma, relación altura/diámetro, sistema de agitación, tipo y número de agitadores y distancia entre ellos en el eje del motor, altura de líquido, presencia de tabiques deflectores, sistema de aporte de gas, etc.

- 3) *Propiedades físicas de las fases líquida y gaseosa*: viscosidad, tensión superficial, densidad, difusividad, presencia de electrolitos, de surfactantes, etc.
- 4) *Los requerimientos energéticos del sistema*: normalmente se refieren a la potencia disipada en el fluido, que a su vez depende de la agitación y de la aireación, además de otras variables ya citadas.

Todas estas variables hacen necesario un estudio pormenorizado de las condiciones fluido-dinámicas del sistema, con el fin de cuantificar el coeficiente de transferencia de materia y establecer el régimen de agitación y mezcla más adecuado para el bioproceso de interés.

La transferencia de oxígeno es un fenómeno físico, por consiguiente, OTR puede ser predicho, mientras que el consumo de oxígeno supone un complejo metabolismo que envuelve una red de reacciones bioquímicas y, por tanto, necesariamente, debe ser determinado experimentalmente (Gómez y col., 2006a). Como indica la ecuación (7), OTR es descrita como una magnitud proporcional al gradiente de concentración, donde la constante de proporcionalidad es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia. Este parámetro se determina experimentalmente aplicando diferentes técnicas de medida o métodos (químicos, físicos y biológicos) (García-Ochoa y Gómez, 2010). Por otro lado, los valores experimentales de se pueden encontrar correlacionados mediante ecuaciones empíricas, aunque su posible utilización es muy limitada, pues la extrapolación de un sistema a otro es difícil en la mayoría de los casos (Gómez, 1995; García-Ochoa y Gómez, 1998; García-Ochoa y Gómez, 2005).

Recientemente, se han propuesto métodos de estimación semi-teórica de $k_{L,a}$. Según estas técnicas, para determinar el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia es necesario conocer tanto el coeficiente local " k_L " como el área interfacial de intercambio " a ", cuyo producto se corresponde finalmente con " $k_{L,a}$ ". De acuerdo a estudios realizados al respecto durante décadas, se ha admitido generalmente que el coeficiente local de transferencia es inversamente proporcional al tiempo de contacto entre las fases gas y líquida (t_e), conforme a la teoría de Higbie o de "renovación de la superficie" (Higbie, 1935), de acuerdo a:

$$k_L = 2 \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad (8)$$

Donde “ D_L ” es la difusividad del gas en el líquido. La teoría de Higbie se basa en considerar que se están formando y rompiendo continuamente pequeños remolinos de líquido en la interfase gas-líquido, de modo que en el intervalo de formación de estos remolinos hay un intercambio de soluto por difusión. Así, cuando una burbuja de gas atraviesa el líquido va creando continuamente un área interfacial nueva en su avance y, considerando una difusión no estacionaria de los elementos de líquido en la interfase durante el contacto gas-líquido o el tiempo de exposición “ t_e ” para la transferencia de materia se obtiene la ecuación anterior (Figueiredo y Calderbank, 1979; García-Ochoa y Gómez, 2009).

Este tiempo de exposición o de contacto durante la transferencia de materia es difícilmente cuantificable, pero puede estimarse asumiendo la teoría de la turbulencia isotrópica de Kolmogoroff, como el cociente entre la longitud de los remolinos (η) y su velocidad de fluctuación (u), ambos dependientes de la viscosidad cinemática del líquido (ν) y de la potencia disipada por unidad de masa (ε), conforme a las siguientes ecuaciones (Kolmogoroff, 1941):

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (9)$$

$$u = (\nu \cdot \varepsilon)^{\frac{1}{4}} \quad (10)$$

La viscosidad cinemática depende de la naturaleza reológica de la fase líquida que, en muchas ocasiones, y debido al crecimiento microbiano a lo largo del bioproceso, es de tipo no-newtoniana. Si se considera el modelo de Ostwald-de Waele para describir el comportamiento reológico del líquido (ecuación (11)), como se ha aplicado en el presente trabajo, la combinación de las ecuaciones (7) a (10) conduce a ecuación (12), validada por diversos autores para estimar el coeficiente local de transferencia, k_L (Kawase y Hasinguchi, 1996; García-Ochoa y Gómez, 2005):

$$\tau = K \cdot \gamma^n = \mu_a \cdot \gamma \quad (11)$$

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left(\frac{\varepsilon \cdot \rho_L}{K} \right)^{\frac{1}{2(1+n)}} \quad (12)$$

Donde τ es la tensión tangencial del fluido debida a la agitación, γ la velocidad de deformación, K el índice de consistencia del fluido, n el índice de comportamiento de flujo, μ_a la viscosidad aparente y ρ_L la densidad de la fase líquida. Cuando $n < 1$ se considera que el fluido tiene un comportamiento pseudoplástico, de modo que la viscosidad disminuye cuando aumenta la velocidad de deformación; mientras que si $n > 1$ se trata de un fluido dilatante, de modo que el comportamiento será inverso al anteriormente descrito.

El área interfacial de contacto se puede relacionar con el diámetro de burbuja del gas (d_b) y un parámetro llamado “*hold-up*” (Φ), definido como la fracción de volumen de la fase gas dispersada en forma de burbuja; es decir, el cociente entre el área o volumen de sección transversal ocupada por el gas y el área o volumen total de la sección transversal total (Sieblist y col., 2009):

$$a = \frac{6 \cdot d_b}{\Phi} \quad (13)$$

Teniendo en cuenta los supuestos de la teoría de Kolmogoroff y suponiendo un régimen turbulento en el flujo del fluido, el *hold-up* del gas puede calcularse por la siguiente ecuación (Kudrewizki, 1982; Kudrewizki y Rabe, 1986).

$$\frac{\Phi}{1 - \Phi} = 0,819 \cdot \frac{V_S^{2/3} \cdot N^{2/5} \cdot T^{4/15}}{g^{1/3}} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\sigma}\right)^{1/5} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G}\right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_G}\right)^{-1/15} \quad (14)$$

Donde V_S es la velocidad superficial del gas, N la velocidad de agitación, T el diámetro del agitador, g la constante de gravedad y σ la tensión superficial.

Si se trata de un fluido viscoso, debe tenerse en cuenta en la ecuación anterior el efecto de esta variable en el *hold-up* final (Φ_v), conforme a la ecuación 15 (Bhavaraju y col., 1978):

$$\frac{\Phi_v}{1 - \Phi_v} = \left(\frac{\Phi}{1 - \Phi}\right) \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G}\right)^{-1/4} \quad (15)$$

Para determinar el diámetro de burbuja se suele considerar que existe un balance entre la fuerza de presión dinámica de la propia burbuja debida al régimen de flujo turbulento, que produce la ruptura de la propia burbuja, y las resistencias de la fase líquida al paso del gas, dadas por la tensión superficial y la viscosidad. En bibliografía existen

numerosas correlaciones que describen esta relación (Calderbank, 1958; Parthasarathy y col., 1991), aunque una de las más utilizadas es la propuesta por Bhavaraju y col. (1978), en la que se establece que el diámetro de burbuja depende de la viscosidad y la turbulencia de la fase líquida, expresada como el cociente entre la potencia suministrada al sistema y el volumen de trabajo, de acuerdo a la ecuación (16) (Bhavaraju y col., 1978), que ha sido empleada en diversos trabajos posteriores (Gómez y col., 2015; Martínez y col., 2016; Rodríguez y col., 2016).

$$d_b = 0,7 \cdot \frac{\sigma^{0,6}}{\left(\frac{P}{V}\right)^{0,54} \cdot \rho_L^{0,2}} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G}\right)^{0,1} \quad (16)$$

Esta nueva dependencia supone considerar las necesidades energéticas del sistema de agitación y mezcla del bioproceso, ya planteadas en las ecuaciones (7) a (10) con el parámetro “ ε ”, que representa la energía disipada por unidad de masa. Para tanques agitados, puede considerarse que este término no es muy distinto de su valor promedio, ε_{ave} , que es función de la potencia suministrada al reactor y sus parámetros geométricos, conforme a:

$$\varepsilon \approx \varepsilon_{ave} = \frac{P_0}{\frac{\rho \cdot \pi}{4 \cdot T^2 \cdot H}} = \frac{N_p \cdot N^3 \cdot T^5}{V} \quad (17)$$

Donde P_0 es la potencia consumida y N_p es el número de potencia, obtenido como función del número de Reynolds para diferentes geometrías y conformaciones del reactor. En un sistema aireado, la alimentación del gas afecta a la potencia consumida, de modo que esta potencia (P) es menor que la de un sistema no aireado (P_0). Una buena estimación de la relación entre ambas fue la propuesta por Michel y Miller (1962), en función de la geometría del reactor, el caudal de circulación de gas (Q) y los parámetros empíricos α y β , tal y como muestra la ecuación 18 (Michel y Miller, 1962):

$$P = \alpha \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot T^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad (18)$$

El valor de α y β ha sido establecido para una gran cantidad de configuraciones de tipos de reactores y de agitadores (Abrardi y col., 1988). En el caso de utilizar turbinas de tipo Rushton, como ocurre en la presente Memoria, α y β toman valores de 0,78 y 0,46, respectivamente en caso de utilizar un solo agitador y 1,22 y 0,43 en el caso de un sistema

de agitación dual (Abrardi y col., 1988). La combinación de todas estas ecuaciones permite estimar el valor del coeficiente de transporte y, en consecuencia, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR). Además, a veces, es preciso considerar un factor de mejora en la velocidad de transporte (E), ya que una vez que el oxígeno alcanza la fase líquida y está disponible para las células en suspensión, éstas lo consumen a una velocidad (OUR) que puede ser igual o inferior a la del oxígeno suministrado (García-Ochoa y Gómez, 2005). El esquema de cálculo se describe gráficamente en la Figura 5. El coeficiente volumétrico global de transferencia de materia ($k_L a$) también puede determinarse experimentalmente a través de varios métodos en presencia o ausencia de biomasa. Dependiendo de que haya o no células en el cultivo, la metodología implicará la cuantificación de la velocidad de transferencia de oxígeno a la fase líquida y también la de consumo, en el caso en que se realice sobre un cultivo con células en suspensión. La Tabla 1 resume las principales técnicas de medida de OTR y $k_L a$, con o sin consumo de oxígeno, desarrolladas y/o utilizadas por diferentes autores en bibliografía (García-Ochoa y Gómez, 2009; García-Ochoa y col., 2010; Escobar, 2013).

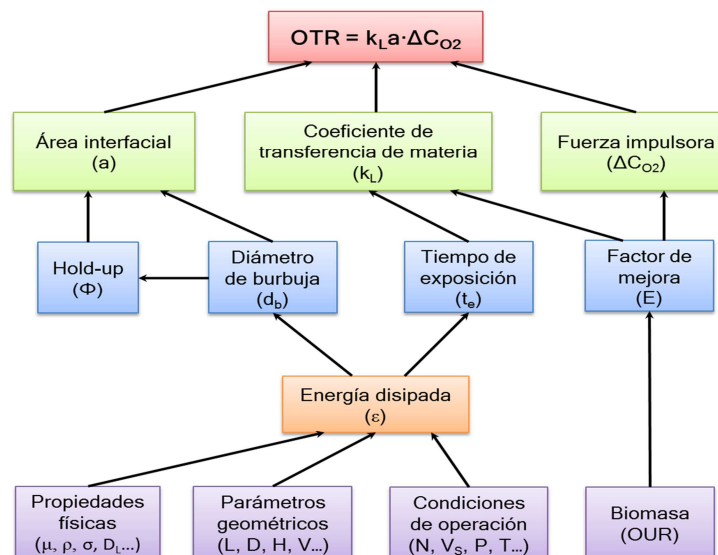


Figura 5. Relación entre OTR, OUR, $k_L a$ y las condiciones fluido-dinámicas en un biorreactor (García-Ochoa y Gómez, 2009).

Tabla 1. Métodos experimentales de determinación de OTR, OUR y k_La . Elaborado a partir de (Escobar, 2013) y (García-Ochoa y Gómez, 2009).

Criterio	Tipo de análisis	Metodología	Características
Sin consumo biológico de oxígeno	Químico	Oxidación de sulfito de sodio	Relativamente sencillo de realizar, aunque laborioso. La reacción cambia las propiedades fluido-dinámicas del líquido. k_La medido suele ser mucho mayor que su valor real en un bioproceso
		Absorción de CO ₂	La reacción se controla más rápidamente que en el método del sulfito. Cambios en las propiedades fluido-dinámicas del líquido
		Oxidación de hidrazina	Es rápido y preciso, pero emplea compuestos tóxicos que no deben acumularse en el caldo
	Físico	Método dinámico	Poco laborioso y no cambia las propiedades del líquido. El tiempo de respuesta de la sonda de O ₂ disuelto es clave
Con consumo biológico de oxígeno	Físico-químico	Balance de oxígeno en la fase gaseosa	Buen método de medida con biorreactores de laboratorio. Supone que hay buena mezcla entre las fases, algo que puede no producirse en reactores industriales
		Método dinámico	Análisis rápido y preciso. Si OUR es muy alto pueden no registrarse datos suficientes para determinar k_La
		Evaluación del crecimiento con un microorganismo aerobio estricto	Se asume que todo el O ₂ alimentado es empleado para el crecimiento. Se trata de un procedimiento experimentalmente muy laborioso

En el grupo de investigación FQPIMA se han desarrollado con éxito los protocolos de medida de OTR, OUR y k_La para el método dinámico con y sin presencia de microorganismos (Gómez y col., 2006a; Escobar, 2013; Martínez, 2013; Ripoll, 2016) para diferentes biocatalizadores en distintos bioprocesos. En la presente Memoria, se ha establecido también la metodología de balance de oxígeno en la fase gaseosa, explicada en detalle en el apartado de Materiales y Métodos.

El balance de materia de oxígeno en la fase líquida, asumiendo un buen grado de mezcla gas-líquido, se puede expresar como:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = k_La \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_X \quad (19)$$

El término de transferencia coincide con la ecuación (5), mientras que el de consumo, OUR, se expresa como el producto de un término de consumo específico (q_{O_2}),

multiplicado por la concentración de biomasa en cada tiempo del experimento (C_X) (Gómez y col., 2006b; García-Ochoa y col., 2010). La evolución de la concentración de oxígeno disuelto determina en cada momento la dinámica OTR-OUR en un bioproceso. Esta dinámica va a cambiar en diferentes regiones del reactor y/o con el tiempo, en distintas etapas del crecimiento celular y del propio proceso de producción; en consecuencia, también puede cambiar la etapa limitante de la velocidad del proceso global; es decir, la que va a condicionar la velocidad de la transformación.

La Figura 6 constituye un ejemplo de la dinámica de estas dos variables en un sistema aerobio. En ella se muestran los perfiles de concentración de oxígeno disuelto y de OUR en un bioproceso, obtenidos a distintas velocidades de agitación en el sistema de producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol con *Raoultella terrigena* (Rodríguez y col., 2016). Como puede observarse, existen comportamientos diferentes de estas dos variables en función de las condiciones fluido-dinámicas dadas en el interior del biorreactor. En el caso del ejemplo, de 100 a 400 rpm, el oxígeno disuelto permanece en cero durante la mayor parte del experimento, al tiempo que OUR aumenta cuando se incrementa la velocidad de agitación. Bajo estas condiciones, todo el oxígeno transferido del gas al líquido es consumido por las células, por lo que se considera que la etapa limitante del proceso es la transferencia de materia o que el sistema evoluciona bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto (García-Ochoa y col., 2015), ya que el microorganismo es capaz de utilizar todo el oxígeno disponible en el caldo. Sin embargo, cuando la velocidad de agitación es superior a 550 rpm, el oxígeno disuelto siempre es mayor que cero en cualquier tiempo de la transformación, mientras que OUR alcanza su valor máximo a 700 rpm y luego desciende drásticamente si se emplean condiciones de agitación más agresivas. En esta segunda región la velocidad de consumo es menor que la de transporte y, por tanto, la resistencia a la transferencia de materia ya no es la etapa limitante del proceso, sino la velocidad de consumo.

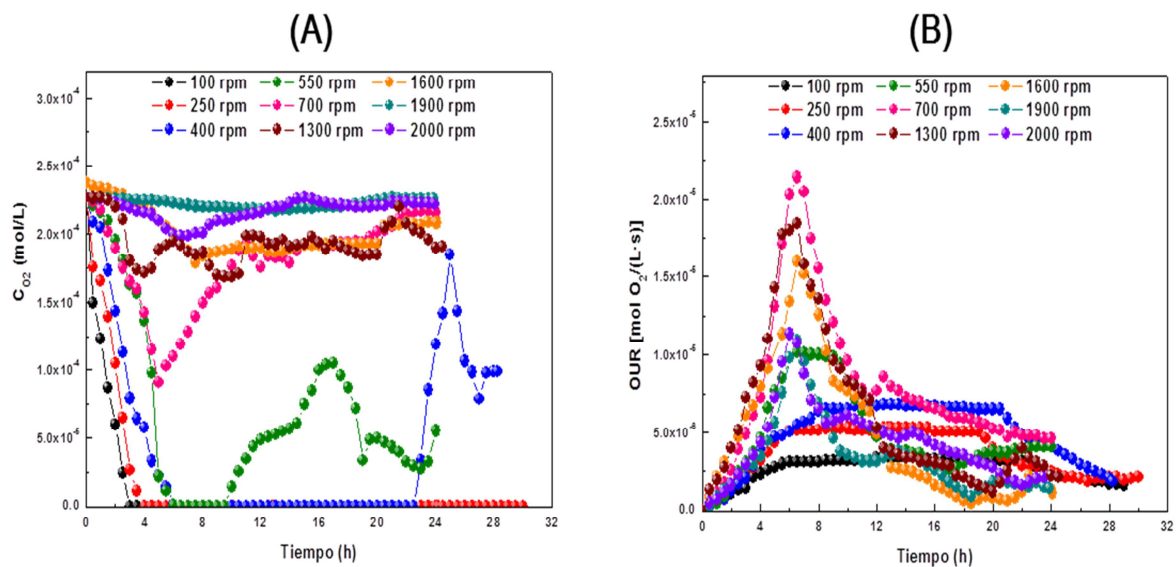


Figura 6. Evolución del oxígeno disuelto (A) y OUR (B) a distintas velocidades de agitación para el sistema de producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol con *R. terrigena*. Basado en (Rodríguez y col., 2016).

Para facilitar la comprensión de la dinámica entre OTR-OUR, el grupo de investigación FQPIMA ha desarrollado una metodología teórica, bajo la cual se pueden explicar las limitaciones al transporte y al consumo de oxígeno en función de un conjunto de parámetros adimensionales (García-Ochoa y col., 2010). El primero de ellos extrapola el concepto de limitación de transporte utilizado en catálisis heterogénea, definido a través del valor del número de *Damköhler* como el cociente entre la velocidad de reacción y la velocidad de transferencia de masa. Para un bioproceso, se define el número de *Damköhler* modificado (Da) como la relación existente entre los valores máximos de OUR y OTR, conforme a la siguiente ecuación (García-Ochoa y col., 2010; Rodríguez y col., 2016):

$$Da = \frac{OUR_{max}}{OTR_{max}} \quad (20)$$

Si el proceso transcurre bajo condiciones de limitación de transporte el valor de Da será 1 o muy próximo a 1 durante todo el experimento, mientras que si la etapa limitante es la velocidad de consumo de oxígeno, “ Da ” se mantendrá por debajo de 1 durante la transformación.

Por otro lado, la evolución de la velocidad de consumo de oxígeno puede oscilar en un amplio intervalo a lo largo de un experimento en relación con su valor máximo, OUR_{max} . Esto permite definir el llamado factor de efectividad de consumo de oxígeno (η), expresado en la ecuación (21):

$$\eta = \frac{OUR}{OUR_{max}} \quad (21)$$

Este parámetro define el grado de utilización del oxígeno transferido por parte del biocatalizador, de manera que si $\eta < 1$ los problemas difusionales están afectando, cuando no controlando la velocidad del proceso, mientras que si η se mantiene próximo a 1 el metabolismo celular no está inhibido por la transferencia de materia (García-Ochoa y col., 2010; Rodríguez y col., 2016).

Recientemente se ha definido otro factor de efectividad referido a la transferencia de materia (η_{MT}), con el objetivo de expresar en qué condiciones la velocidad de transferencia de materia representa la etapa controlante del proceso (Rodríguez y col., 2016). Este coeficiente se define como el cociente entre OTR a un tiempo determinado y su valor máximo observado OTR_{max} (ecuación (22)):

$$\eta_{MT} = \frac{OTR}{OTR_{max}} \quad (22)$$

Este último parámetro adimensional también toma valores entre 0 y 1 a lo largo del proceso y su interpretación es similar al factor de efectividad de la velocidad de consumo de oxígeno. Siempre que η_{MT} esté próximo a 1 la transferencia de materia se produce a su máxima velocidad, por lo que las resistencias al transporte no constituyen una limitación a la velocidad global del proceso. Sin embargo, si $\eta_{MT} < 1$ el proceso está limitado por la transferencia de oxígeno de la fase gas al líquido (Rodríguez y col., 2016).

El establecimiento de estas regiones de limitación de transporte y/o consumo es fundamental para entender bajo qué condiciones se está produciendo la transformación en el interior del biorreactor e, incluso, en algunos bioprocesos, el hecho de trabajar en una región u otra va a determinar el resultado final de los mismos, ya que el biocatalizador puede modificar su comportamiento en función de la disponibilidad de oxígeno. Estos cambios se producen sobre tres variables fundamentales:

- a) Variación de la velocidad de crecimiento (μ).
- b) Distribución de los flujos metabólicos.
- c) Inducción de estrés celular.

Bajo condiciones de limitación de oxígeno, debido a una baja agitación y/o aireación, un aumento de la velocidad de transporte suele conducir a un incremento de la velocidad de crecimiento. Sin embargo, cuando la transferencia de oxígeno no constituye la etapa limitante del proceso, el biocatalizador aumenta su velocidad de consumo hasta alcanzar su “techo” o máximo valor. En esta segunda región, la velocidad de crecimiento también llega a su valor más alto y puede permanecer constante en un determinado rango de condiciones fluido-dinámicas, o bien descender si estas condiciones son cada vez más agresivas. Cuando este descenso se produce entra en juego el estrés celular, que puede ser de tipo oxidativo o hidrodinámico, pudiendo producirse los dos simultáneamente (Camacho y col., 2000; García-Ochoa y col., 2013; Escobar y col., 2016). Las situaciones de estrés microbiano producen daños celulares, que macroscópicamente se traducen en un descenso, tanto de la velocidad de crecimiento como la de consumo de oxígeno. Los efectos de las condiciones fluido-dinámicas sobre la integridad del biocatalizador se resumen en la Figura 7.

La distribución del flujo de carbono también depende de la cantidad de oxígeno disuelto disponible para el biocatalizador. Este fenómeno ha sido descrito en numerosos sistemas, como es el caso de la producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol. Maddox en 2008 resaltó la importancia de la disponibilidad de oxígeno para el resultado final de la transformación, ya que los biocatalizadores utilizados eran capaces de desviar el flujo de carbono hacia unos productos finales u otros en función de esta variable. Así, cuando la disponibilidad era baja se producían mayoritariamente productos de fermentación como el etanol o el lactato (Maddox, 2008). Sin embargo, cuando la disponibilidad de oxígeno aumenta se produce un caldo más concentrado en dioles, pero si se sigue incrementando el nivel de oxígeno disuelto el flujo metabólico se desplaza hacia la formación de acetoína y de acetato (ver Figura 8).

Estos cambios han sido estudiados en otros biocatalizadores, como ocurre con *Azotobacter vivelandii* en la producción de PHB a partir de glucosa (Castillo y col., 2013), *Corynebacterium glutamicum* en la síntesis de dihidroxiacetona (DHA) a partir de glicerol (Wittmann y col., 2003), *Enterobacter cloacae* para mejorar el contenido en

exopolisacáridos (Bandaipheth y Prasertsan, 2006) o *R. erythropolis* o *P. putida* para la bio-desulfuración de dibenzotiofeno (DBT) (Gómez y col., 2006a; Gómez y col., 2006b; Escobar y col., 2016).

El aumento de la disponibilidad de oxígeno debido a la agitación puede inducir situaciones de estrés microbiano, de tipo oxidativo e hidrodinámico. Estos fenómenos, ya apuntados en la Figura 6, serán desarrollados en detalle en el siguiente apartado de la presente Memoria.

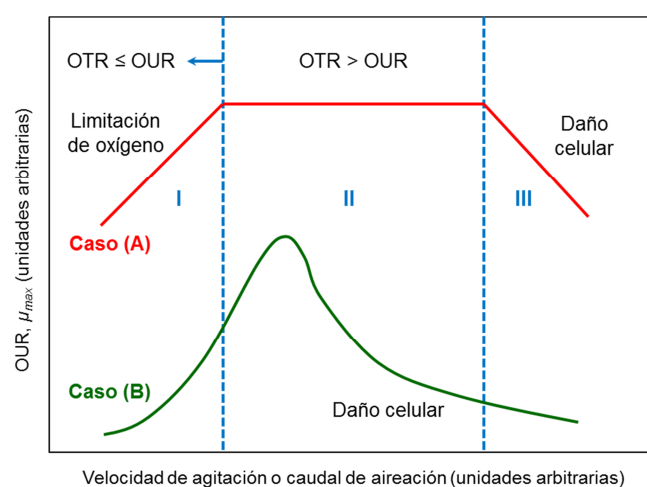


Figura 7. Efectos del aumento de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) sobre OUR y la velocidad de crecimiento (μ_{max}). Adaptado de (García-Ochoa y col., 2015).



Figura 8. Rendimiento hacia los diferentes metabolitos en función de la disponibilidad de oxígeno para el bioproceso de síntesis de 2,3-butanodiol a partir de glicerol. Adaptado de (Maddox, 2008).

1.1.3. Fluido-dinámica y estrés celular

El concepto de estrés aplicado a los cultivos celulares es muy abierto, pues soporta multitud de posibles causas que provocan una respuesta anómala de adaptación o supervivencia de un grupo celular ante un desequilibrio interno o externo. En el caso de la presente Memoria, el estrés microbiano está inducido por causas externas, ya sea por los efectos negativos que supone la agitación agresiva de un cultivo en crecimiento (estrés hidrodinámico) o bien por un elevado nivel de especies reactivas del oxígeno o con capacidad oxidativa (estrés oxidativo). Ambos efectos serán comentados en el presente apartado, así como sus consecuencias para el rendimiento y la productividad de un bioproceso.

Estrés hidrodinámico

Cualquier cultivo sometido a agitación y aireación continua está sometido a un conjunto de fuerzas de tensión y deformación de los elementos del fluido que se encuentra en movimiento y siendo atravesado por una fase gaseosa difundida mediante burbujas. Las células en suspensión sufren este tipo de tensiones como cualquier otro elemento de fluido, pudiendo verse afectada su viabilidad a lo largo de la transformación y, en consecuencia, pudiendo reducirse el rendimiento y la productividad de un bioproceso concreto.

El llamado estrés hidrodinámico se produce por las colisiones de las células entre ellas durante el movimiento de la fase líquida y con los elementos sólidos del interior del biorreactor. En su desplazamiento los microorganismos no sólo chocan entre ellos, sino que también se encuentran con el eje del motor de agitación, los propios agitadores, las paredes del reactor y otro tipo de estructuras como discos rompe-espumas, difusores de gas o electrodos de medida de pH u oxígeno disuelto. Además, debido a la turbulencia se producen gradientes de velocidad entre diferentes elementos del fluido y remolinos, de diferentes tamaños (bacterias, levaduras, células vegetales y de mamífero) y contenido en energía, que pueden tener acciones muy diversas sobre células vivas dependiendo de su tamaño y de su protección (membrana, pared, polisacáridos, etc.). La tensión derivada de todas las colisiones, con elementos del reactor o con los remolinos citados, y de la propia deformación de la fase líquida se caracteriza habitualmente como “tensión de cizallamiento” o “estrés de corte” (en inglés, “*shear stress*”) (Merchuk, 1991; Toma y col., 1991; Joshi y col., 1996; Büchs, 2001). La tensión tangencial que ejercen los elementos de fluido en movimiento sobre las células (τ) es proporcional a la velocidad de deformación

de éstos (γ), conforme a la ecuación (9). La relación entre estas dos magnitudes, dada por la viscosidad del fluido, determina el grado de deformación del caldo y, por tanto, puede tomarse como representativa de los efectos de la tensión tangencial sobre las células (Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006).

Los efectos del estrés hidrodinámico sobre las células se traducen en cambios morfológicos, fisiológicos e, incluso, en una reducción de la viabilidad microbiana a lo largo de la transformación. Por otro lado, el estrés hidrodinámico está íntimamente ligado al conjunto de cambios que se producen durante el transcurso de un bioproceso, que implican, como ya se ha comentado anteriormente, el transporte de materia entre fases, el crecimiento celular gracias al consumo de sustratos, la producción de metabolitos intermedios y finales como consecuencia de la acción del biocatalizador y la modificación de ciertas propiedades del caldo (en especial la viscosidad y la tensión superficial), debido a la presencia de biomasa en crecimiento (ver Figura 9).

Si el microorganismo se ve afectado por estrés hidrodinámico la velocidad de consumo de oxígeno en un sistema aerobio será menor de la esperada, pudiendo afectar también a OTR, de acuerdo a la ecuación (17). Además, si el estrés modifica alguna de las propiedades anteriormente mencionadas, el coeficiente global de transferencia de materia puede verse alterado, reduciéndose la eficiencia del transporte de oxígeno. Por otro lado, si la viabilidad celular se ve afectada negativamente por estrés hidrodinámico, también se verán alteradas tanto la productividad como el rendimiento del bioproceso, ya que el número de unidades productoras, entendida cada célula como una unidad de síntesis de producto de interés, se va reduciendo con el tiempo (Escobar, 2013).

Se ha descrito que, en general, el daño celular causado por estrés hidrodinámico puede ser de tipo letal o subletal, en función de si se trata de un efecto reversible e irreversible (Joshi y col., 1996; Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006). Un daño de tipo subletal provoca cambios fisiológicos o morfológicos severos, pero sin llegar a la lisis de la célula (véase Figura 9). Estas alteraciones suelen ir acompañadas de desviaciones del flujo metabólico, pudiendo producirse compuestos químicos no esperados. Se considera que estos daños subletales son la respuesta más habitual a una situación de estrés de tipo hidrodinámico (Markl y Bronnenmeier, 1985; Märkl y col., 1991; Papoutsakis, 1991). Este daño se ha estudiado no sólo con bacterias, sino también con otro tipo de microorganismos como plantas (Meijer y col., 1994), hongos filamentosos (Chisti y Moo-Young, 1994) e

incluso, células animales (Chisti, 2001). Por otra parte, la identificación de estos efectos como asociados exclusivamente al estrés hidrodinámico puede ser errónea, ya que, como se ha comentado con anterioridad, también pueden estar asociados a una respuesta al estrés oxidativo por exceso de oxígeno disponible en el medio de cultivo; es decir, que ambos tipos de estrés pueden darse simultáneamente y producir respuestas de distinta naturaleza.

Actualmente no existen muchos trabajos en bibliografía que demuestren un daño de tipo letal causado por estrés en biorreactores tipo tanque agitado y aireado; en el grupo de investigación FQPIMA este fenómeno se ha observado con dos sistemas diferentes: la producción de xantano a partir de sacarosa con *Xhantomonas campestris* (García-Ochoa y col., 2013) y la bio-desulfuración de DBT con *R. erythropolis* (Gómez y col., 2015), que se comentan a continuación:

- En el primer caso, las células de *X. campestris* cultivadas a alta agitación en biorreactor, sufren importantes daños fisiológicos y morfológicos a 800 rpm, lo que puede apreciarse gracias a las imágenes reportadas de microscopía de transmisión electrónica (TEM). Por otro lado, el estudio de la viabilidad celular en placa determinó que ésta se reducía drásticamente con el tiempo si la agitación era superior a 350 rpm. En el caso del ensayo realizado a 800 rpm, la viabilidad del cultivo se reducía hasta el 8% con respecto a la inicial (ver Figura 10).
- En el sistema de bio-desulfuración de DBT con *R. erythropolis*, el aumento de la velocidad de agitación en biorreactor supone una mejora del crecimiento y la capacidad desulfurante del biocatalizador entre 250-450 rpm. Sin embargo, bajo condiciones fluido-dinámicas más agresivas, la velocidad de crecimiento se reduce considerablemente, así como el factor de efectividad del proceso, definido éste como la velocidad de crecimiento del ensayo con velocidad de agitación más baja dividido por la velocidad de crecimiento de cada experimento (Gómez y col., 2015).

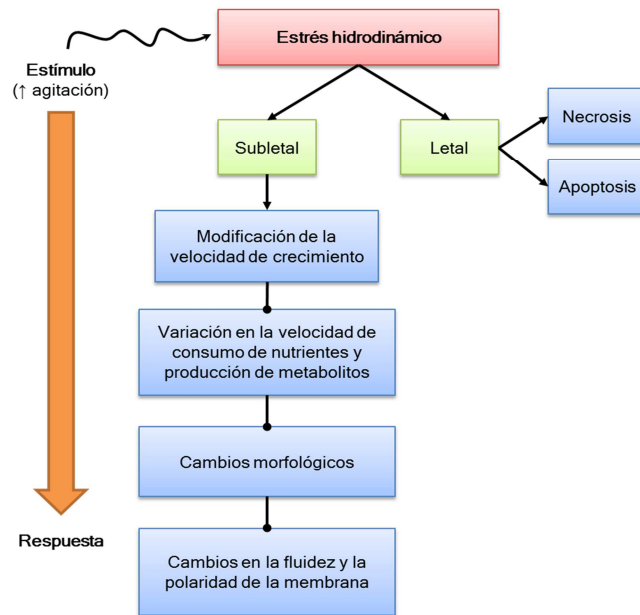


Figura 9. Mecanismo de respuesta al estrés hidrodinámico en cultivos sumergidos, conforme a la hipótesis propuesta por (Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006).

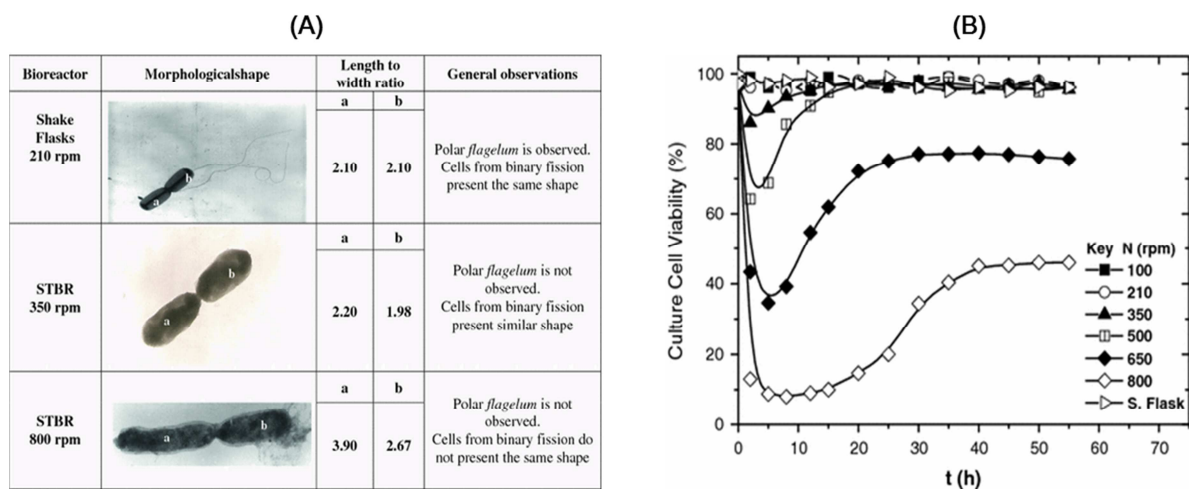


Figura 10. Evaluación de los cambios morfológicos con microscopía TEM (A) y evolución de la viabilidad celular (B) en los cultivos en biorreactor con *X. campestris* en la producción de xantano a partir de sucrosa.

Extraído de (García-Ochoa y col., 2013).

Estrés oxidativo

Se entiende por estrés oxidativo aquel “*desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de la célula para detoxificar el medio*” (Valko y col., 2005). La mayor disponibilidad de oxígeno favorecida por las condiciones fluido-dinámicas del cultivo (ya sea por aumento de la agitación o del caudal de aireación), puede acarrear situaciones de este tipo, alterando el entorno reductor interno natural de las células y provocando una respuesta que puede dañar su viabilidad, su forma de crecimiento y su metabolismo (McDonald y Kuehn, 2013).

El principal efecto del desequilibrio anterior sobre una población microbiana es la disminución de su poder reductor; es decir, de la capacidad reductora de sus pares redox celulares (Schafer y Buettner, 2001). Este fenómeno hace que aumente la concentración de especies de oxígeno reactivo (ROS), tales como los radicales libres “alcoxi” (R-O*) y “peroxi” (R-O-O*), o el anión superóxido (O₂⁻), algunos de los cuales pueden transformarse en quinonas al entrar en contacto con algunos compuestos del medio de cultivo como metales de transición. Las quinonas constituyen la especie más agresiva para el entorno celular, pudiendo causar daños severos en el ADN, las proteínas y los lípidos (Sies, 2015).

Al igual que en el caso anterior, el estrés oxidativo puede producir daños de tipo subletal, en los que la célula es capaz de superar la perturbación y regresar al estado original, o provocar la muerte del individuo por necrosis o apoptosis (ver Figura 11), aunque esta última respuesta no parece ser frecuente.

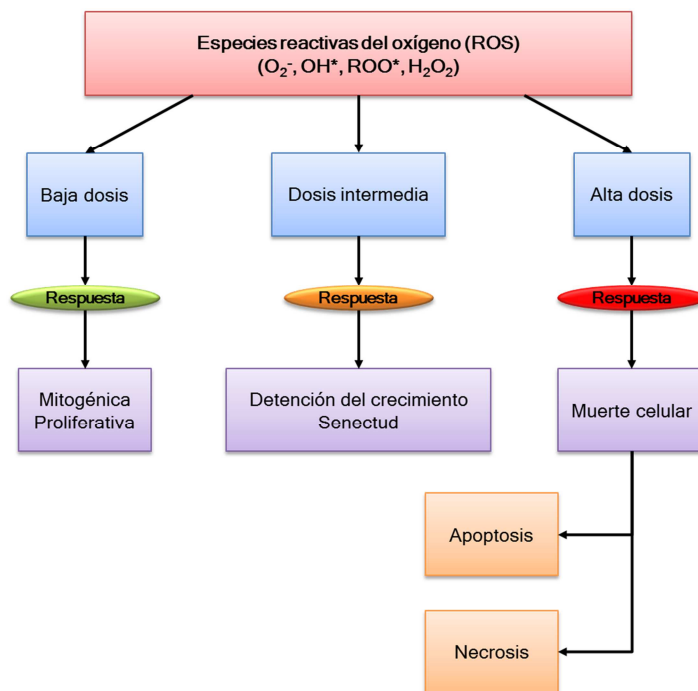


Figura 11. Respuestas celulares a la exposición en distintas dosis a las especies reactivas del oxígeno; extraído de (Martindale y Holbrook, 2002).

Los radicales reactivos del oxígeno, aunque tienen periodos de vida corta, pueden migrar de su zona de ataque inicial hacia otros centros, actuando como “mensajeros tóxicos secundarios”; es decir, que ejercen también la función de informadores de daño en el entorno celular (Cabiscol y col., 2000). La célula dispone también de mecanismos de defensa contra estas moléculas, desarrollados a partir de la aparición del oxígeno en la atmósfera. En primer lugar, las bacterias primigenias se dotaron de proteínas transportadoras que permiten el paso de sustancias sólo a través de receptores específicos. Una vez en el interior de la célula, existen una serie de moléculas constitutivas que ayudan a mantener un ambiente reductor a nivel intracelular, como los cofactores NADH o NADPH, el ácido ascórbico, el α -tocoferol o el glutatión (Crawford y Davies, 1994). Este tipo de moléculas se conocen con el nombre de antioxidantes y son ampliamente utilizadas en nutrición y dietética, para evitar este tipo de fenómenos en los seres humanos. En algunas especies, como *E.coli*, existen una serie de enzimas superóxido dismutasas, capaces de transformar el O₂⁻ en peróxido de hidrógeno y éste, a su vez, en oxígeno. Si el estrés oxidativo afecta al genoma, las enzimas endonucleasas pueden reparar los errores de

mutación y/o replicación del ADN y, en el caso de las bacterias, existen también una serie de proteínas que pueden reparar algunos enlaces peptídicos por errores de traducción.

La respuesta celular al estrés oxidativo puede implicar también otro tipo de mecanismos de defensa o transmisión del peligro al resto de la población. Varios autores han observado que algunas células crecen en biofilm; esto es, sobre una matriz proteica, para evitar el contacto con unas condiciones externas que contienen altas concentraciones de ROS (Gambino y Cappitelli, 2016). Este fenómeno ha sido observado en especies como *Azotobacter vivelandii* (Tomida y col., 2010), *Burkholderia thailandensis* (Loprasert y col., 2004), *Serratia marcescens* (Shanks y col., 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Huang y col., 2013) y *Pseudomonas aeruginosa* (Hassett y col., 1999; Polo y col., 2011).

Otro tipo de respuesta puede ser la liberación de vesículas extracelulares de membrana, como mecanismo de comunicación intercelular de la perturbación originada. Las vesículas extracelulares son unas estructuras liberadas por los microorganismos para transportar biomoléculas entre las células o comunicar un cambio metabólico debido a un estímulo interno o externo (McDonald y Kuehn, 2013). Entre las sustancias que pueden contener este tipo de estructuras se encuentran ADN, ARN, proteínas, endotoxinas y moléculas virulentas. La secreción de estas vesículas puede provocar modificaciones genéticas, translocación de proteínas y la propia formación del biofilm, al llegar de una célula a otra.

Por último, se ha descrito también que una posible respuesta al estrés oxidativo puede ser la secreción de exo-polisacáridos, como respuesta a los sensores externos ambientales (Gambino y Cappitelli, 2016). Este fenómeno se ha observado en *A. vivelaandii* y *B. subtilis*, cuando sus cultivos se exponen a agentes potenciales de estrés oxidativo. En *P. aeruginosa* se libera una gran cantidad de alginato en presencia de peróxido de hidrógeno, mientras que en *E. coli* se excreta ácido colánico. Los exo-polisacáridos suponen una barrera física y química contra compuestos biocidas, la mayor parte de los cuales libera ROS al medio. La secreción de estas sustancias como respuesta a condiciones fluido-dinámicas agresivas ha sido demostrada con *E. cloacae* en el cambio de escala del proceso de producción de biopolímeros a través de este biocatalizador (Bandaipheth y Prasertsan, 2006).

La liberación al medio de restos celulares o biopolímeros por efecto del estrés oxidativo tiene una repercusión inmediata en la eficiencia del transporte de oxígeno, ya que modifica ciertas propiedades de la fase líquida (la viscosidad y la tensión superficial, fundamentalmente), y, por tanto, afecta negativamente al valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia. Esta disminución reduce la velocidad de transporte de oxígeno, OTR, y, en consecuencia, también puede afectar a la velocidad de consumo, OUR, y debe ser tenido en cuenta a la hora de realizar el cambio de escala, para evitar situaciones no deseadas en un reactor de planta piloto o industrial.

Evaluación del estrés microbiano y su naturaleza

Los efectos de la agitación y/o aireación sobre los cultivos microbianos han sido ampliamente descritos en bibliografía, utilizando distintos biocatalizadores. Sin embargo, el concepto de estrés microbiano es a la vez amplio y ambiguo, pues no siempre se diferencia el daño celular causado por la deformación tangencial (hidrodinámico), del provocado por el transporte de materia gas-líquido, especialmente en cultivos de tipo aerobio (Escobar, 2013). Aun con estas dificultades, existen varias respuestas microbianas que pueden asociarse a un tipo de estrés característico; respuestas que incluyen cambios fisiológicos, morfológicos y metabólicos, y que han sido apuntadas ya en el apartado anterior de la presente Memoria.

Una de las principales evidencias de un cultivo afectado por estrés hidrodinámico es el cambio morfológico de los microorganismos sometidos a altas velocidades de agitación. En bacterias, estos cambios implican primero una elongación de las células, gracias a la flexibilidad de la pared bacteriana, y una posterior reducción de su diámetro debido a la tensión tangencial continua a la que están sometidas en el caldo (Merchuk, 1991; Kao y col., 2007; García-Ochoa y col., 2013). Si el estrés es continuado y el daño se convierte en letal, es común observar restos celulares suspendidos en el caldo y una disrupción completa de los individuos, incluso los que conservan la pared bacteriana intacta (Joshi y col., 1996; Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006). Otra respuesta asociada al estrés hidrodinámico es un cambio en la asociación entre los individuos. Normalmente, en un cultivo agitado mecánicamente y/o por burbujeo, las células se encuentran de forma individual, manteniendo un tamaño uniforme y poco variable a lo largo del tiempo. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que al someter a estos sistemas a un estrés de tipo hidrodinámico, las células se asocian entre sí para protegerse de las condiciones

externas adversas, formando agregados o cadenas de varios individuos juntos (Kao y col., 2007; Simões y col., 2008; Li y col., 2014). En algunos cultivos de levaduras se ha observado un crecimiento con división celular o en forma de hifas dependiendo de las condiciones fluido-dinámicas.

La secreción de diferentes sustancias al medio es otro tipo de respuesta común al estrés microbiano, aunque en este caso la causa no siempre es debida a un tipo de alteración, ya que se han observado los mismos efectos en distintos biocatalizadores provocados por estrés hidrodinámico u oxidativo. En este sentido, el trabajo de Simoes (2008) demostró que varias cepas de *P. fluorescens* eran capaces de crecer en biofilm sometidas a alta agitación y que, incluso, la composición y las propiedades de estas estructuras eran diferentes bajo condiciones de estrés hidrodinámico (Simões y col., 2008). Esta respuesta ha sido descrita para varios sistemas microbianos, tanto aerobios como anaerobios (Joshi y col., 1996).

Por otro lado, esta misma respuesta ha sido observada en diferentes bioprocesos, pero provocada por un estrés de tipo oxidativo; esto es, por la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el medio de cultivo (Ziegelhoffer y Donohue, 2009; Imlay, 2013). Existen numerosos estudios que demuestran que las bacterias se protegen contra estas especies biocidas creciendo en biofilm, cuya producción está regulada por la interacción entre distintas moléculas que funcionan como mensajeros químicos y las propias proteínas de membrana. Muchas de estas moléculas son las propias causantes del estrés oxidativo; es decir, ROS (Gambino y Cappitelli, 2016). La respuesta microbiana al estrés oxidativo, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, puede conllevar la secreción de exo-polisacáridos como barrera de protección (Costerton y col., 1995).

El estrés microbiano puede conllevar también cambios metabólicos, como por ejemplo la alteración de la velocidad de crecimiento (García-Ochoa y col., 2013; García-Ochoa y col., 2015), la disminución de la velocidad de consumo de sustratos y producción de metabolitos (Yerushalmi y Volesky, 1985; Çalik y col., 2004; Zou y col., 2009) e, incluso, de la disponibilidad de ATP intracelular, como demostraron Takeda y col. (1994) con *Carthamus tinctorius* (Takeda y col., 1994). El estrés celular afecta además a la viabilidad celular; es decir, a la proporción de células con capacidad para reproducirse después de una perturbación determinada (Escobar, 2013). Esto implica analizar el número de individuos que mantienen su membrana intacta y la capacidad de éstos para poder

formar una población o unidad formadora de colonias (Boswell y col., 2003). Bajo situaciones de estrés, las células pueden reducir significativamente su nivel de reproducción, permaneciendo en un estado de “latencia” hasta que las condiciones externas mejoren. Si el daño es de tipo irreversible o letal, el número de viables se irá reduciendo con el tiempo y el cultivo perderá su capacidad catalítica (Hewitt y col., 1998).

El seguimiento de la viabilidad celular es fundamental a la hora de evaluar la naturaleza del estrés inducido y el tipo de daño causado. Las técnicas tradicionales emplean conteo de colonias en placas Petri, pero debido al elevado error experimental está siendo sustituida por otras de mayor precisión, como es el caso de la citometría de flujo (Hewitt y col., 2000; Vermes y col., 2000; Ben Amor y col., 2002).

1.1.4. Fluido-dinámica y cambio de escala

El concepto de cambio de escala consiste en “*cómo diseñar un reactor industrial o de planta piloto capaz de reproducir los resultados obtenidos en el laboratorio a través de una metodología estándar*” (Donati y Paludetto, 1997). Es la tarea fundamental del ingeniero químico en este tipo de sistemas y permite la optimización y puesta en marcha de un bioproceso a escala industrial.

Aunque no existe como tal una metodología estándar para lograr un cambio de escala, este concepto engloba un conjunto de estudios a escala de laboratorio que permiten determinar los parámetros cinéticos, matemáticos y fluido-dinámicos necesarios para diseñar un reactor de mayor tamaño en el que se puedan reproducir los resultados logrados en equipos más pequeños. En el caso de los bioprocesos, el cambio de escala implica la selección de las condiciones y la forma de operación a escala de laboratorio, la modelización matemática del proceso y su simulación para un reactor más voluminoso y, finalmente, el diseño del equipo y la reproducción en él de los resultados obtenidos anteriormente. Esta metodología ha sido desarrollada por el Grupo de Investigación FQPIMA del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid y se esquematiza en la Figura 12.

Dentro de todas estas etapas, el estudio de la influencia de las condiciones fluido-dinámicas es fundamental para el desarrollo de los modelos físico y cinético del sistema y, posteriormente, para establecer las condiciones de operación de los sistemas de transporte

de materia y mezcla de reacción en la nueva escala (García-Ochoa y Gómez, 2009). En el primer caso, el modelo físico va a permitir predecir el comportamiento de las fases en contacto y de la mezcla de reacción, mientras que el modelo cinético determina la velocidad de la transformación, fundamental para el balance de materia del proceso y, en consecuencia, para determinar la capacidad instalada del reactor industrial y los servicios auxiliares necesarios. En el segundo caso, el cambio de escala implica reproducir las mismas condiciones de transporte y mezcla logradas en el laboratorio, para lo cual es necesario establecer una serie de criterios que faciliten o aseguren dicha reproducibilidad.

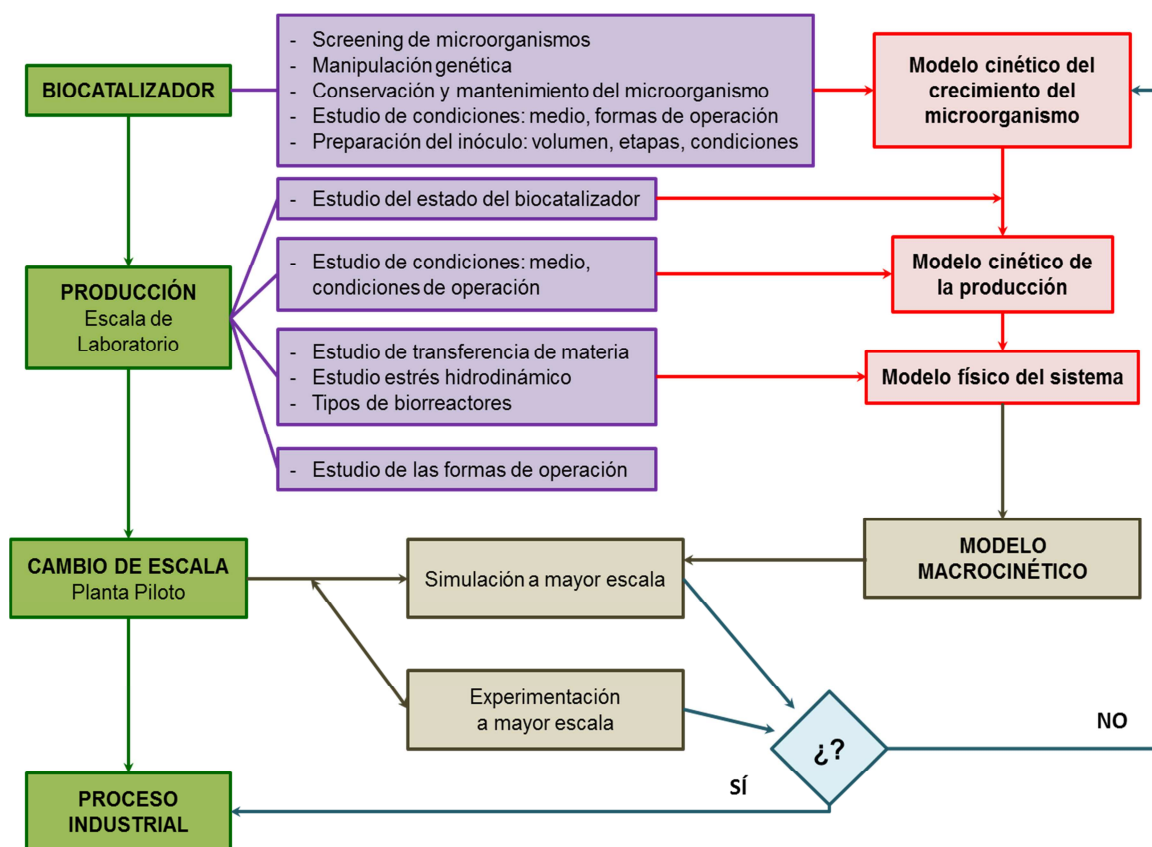


Figura 12. Metodología del cambio de escala de un bioproceso desarrollada por el Grupo de Investigación FQPIMA.

- **Criterio de $k_L a$ constante:** permite calcular el volumen del reactor y los parámetros de trabajo de los sistemas de agitación considerando que el coeficiente volumétrico de transferencia de materia en el nuevo equipo tome un valor similar que en el equipo empleado a escala de laboratorio. Cuando se usa este criterio se siguen los pasos esquematizados en la Figura 4, pero a la inversa: partiendo esta

vez del coeficiente de transporte se calcula la energía disipada por el sistema de agitación conociendo las propiedades físicas de las fases puestas en contacto, considerando diferentes geometrías y/o configuraciones de los elementos internos del biorreactor y partiendo también del nivel de consumo de oxígeno seleccionado para el proceso (ver Figura 5).

- **Criterio de P/V constante:** en este caso se considera que la relación entre la potencia suministrada al sistema y el volumen del reactor debe permanecer aproximadamente constante, de modo que los requerimientos energéticos del nuevo equipo quedan automáticamente determinados cuando se selecciona su tamaño. Una vez que se obtiene esta magnitud se puede determinar el nuevo coeficiente de transporte y el rango de trabajo de los sistemas de agitación y mezcla siguiendo los pasos de la Figura 5.

Por otra parte, el estudio de las condiciones fluido-dinámicas guarda una relación adicional con el cambio de escala, ya que reproduce los distintos regímenes de circulación del fluido con células en suspensión que van a producirse en un reactor a escala industrial (ver Figura 13).

Como puede observarse en la Figura 13, los elementos de fluido más próximos a los agitadores y los elementos rígidos del biorreactor, tales como tabiques deflectores o sondas, estarán sometidos a una tensión tangencial mayor, lo que implica que el biocatalizador tendrá más tendencia a sufrir situaciones de estrés hidrodinámico. En el caso contrario, las regiones más alejadas del eje del motor de agitación tendrán un grado de mezcla muy bajo, incluso con riesgo de representar un volumen muerto. En consecuencia, las células pertenecientes a estos elementos de fluido tendrán un nivel de transporte de materia gas-líquido mucho más pequeño, similar al que se produce en el laboratorio cuando se estudia la fluido-dinámica del proceso a baja agitación.

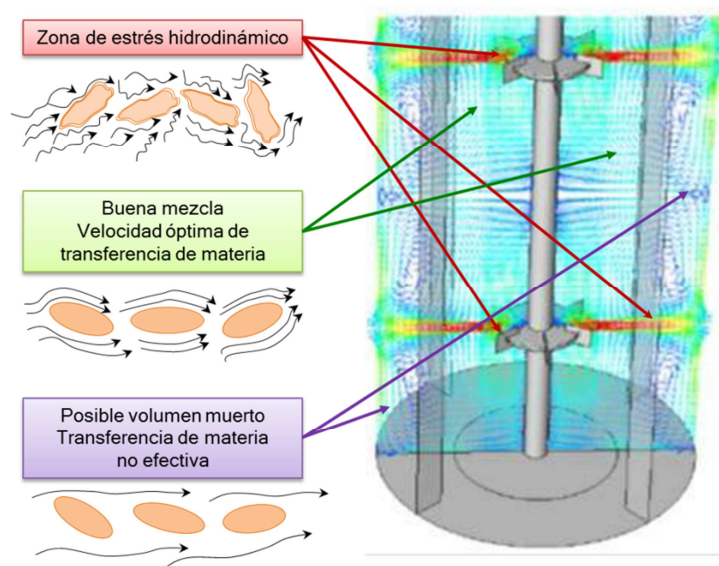


Figura 13. Regímenes de circulación del fluido en un biorreactor industrial. Adaptado de (Junker, 2004).

1.2. LA GLICERINA: CO-PRODUCTO DEL BIODIÉSEL

Las consecuencias del modelo de consumo humano, caracterizado por una creciente e interminable demanda energética, han provocado el interés por parte de la comunidad científica de explorar otras fuentes de energía alternativas a los combustibles fósiles, cuyas reservas se encuentran comprometidas a corto plazo o en peligro de agotamiento.

En este contexto, la producción de biodiesel se ha convertido en una de las principales alternativas, promovida por la directiva occidental para la generación y aprovechamiento de los biocombustibles, que culmina el trabajo previo puesto en marcha a partir de 1997 por la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) a través del Protocolo de Kyoto. El principal objetivo de este acuerdo internacional es reducir las emisiones de seis gases contaminantes causantes del efecto invernadero: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) y los agentes hidrofluorocarburos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y el hexafluoruro de azufre (SF_6) en, al menos un 5% entre 2008 y 2012, con respecto a las emisiones del año 1990 (ONU, 1998). Este protocolo, firmado actualmente por 187 países a excepción de Estados Unidos y China (entre otros), se ha ido desarrollando en el marco de las distintas instituciones regionales a nivel mundial desde su entrada en vigor en el año 2005.

La Unión Europea (UE), uno de los principales impulsores del Protocolo, se comprometió a reducir sus emisiones globales en el periodo anteriormente mencionado en un total de un 8% con respecto a los niveles de 1990. Sin embargo, esta reducción se diseñó mediante el llamado “reparto de carga”, en función del nivel de desarrollo económico e industrial de cada uno de los Estados miembros. Así, por ejemplo, a Alemania, Dinamarca o Luxemburgo se les asignaron cuotas de reducción superiores al 20%, mientras que a otros países como Grecia, Portugal y España se les permitieron aumentos por encima del 15% de sus emisiones globales (ONU, 1998).

En materia de biocombustibles, la Unión Europea promulgó en 2003 la Directiva 2003/30/CE para promover la fabricación y el uso de estas fuentes de energía renovables en los sectores industrial y de transporte. Dos años más tarde, el impulso fue mayor con la publicación del Plan de Acción sobre la Biomasa (2005) y la Estrategia Europea sobre Biocarburantes (2006), que culminaría posteriormente con la Directiva 2009/28/CE (UE, 2006; UE, 2009). En ella se marcan objetivos concretos y obligaciones para los miembros de la Unión de cara al año 2020; entre ellos el imperativo de que el 20% de la energía consumida dentro de la UE sea producida a partir de fuentes renovables. En cifras, esta Directiva proyecta un consumo de 2713 ktep de biocombustibles, siendo en un 85% biodiesel (UE, 2009).

1.2.1. El auge del biodiesel y el excedente de glicerina cruda

El carburante conocido como biodiesel es un producto de la trans-esterificación de aceites vegetales con alcoholes en presencia de catalizadores de distinta naturaleza. La reacción se desarrolla en varias etapas, en las que las distintas cadenas de ácidos grasos presentes en el aceite se van liberando de los acilglicéridos en forma de metil-ésteres, generando glicerol como principal subproducto (ver Figura 14). En la mayor parte de los procesos de producción de biodiesel se generan entre 100 y 110 kg de glicerina por cada tonelada de biodiesel producido.

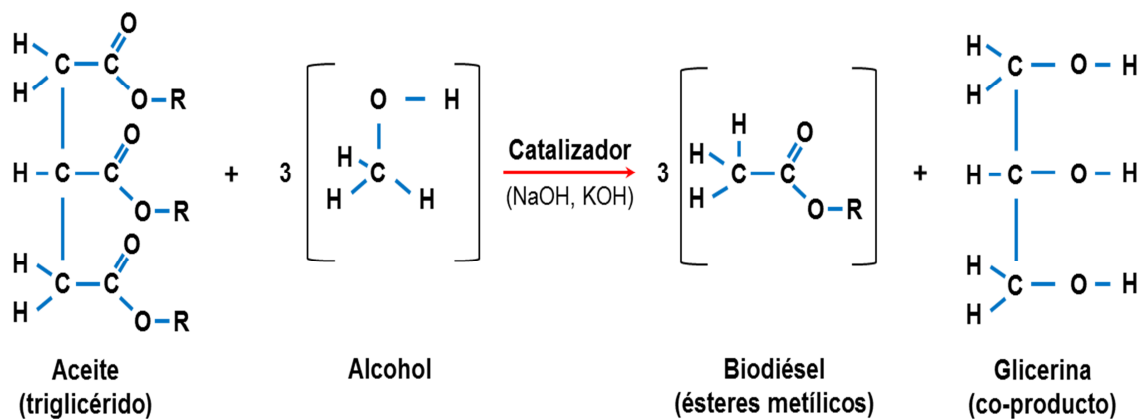


Figura 14. Reacción de transesterificación de aceites para la producción de biodiesel. Adaptado de (Yang y col., 2013).

Existe una amplia gama de materias primas para la fabricación de este biocombustible, que suelen clasificarse según su origen de la siguiente forma (Tan y col., 2013):

- **Materias primas de primera generación:** aceites de palma, soja, girasol, cacahuete o colza. Su uso está limitado por su competición en el mercado alimentario, especialmente en las zonas cultivables de los países pobres, y la alteración del precio de las materias primas de alimentos de primera necesidad (véase el caso del precio de las tortillas de maíz en México durante el periodo 2008-2011) (Lang y col., 2001; Singh y Singh, 2010).
- **Materias primas de segunda generación:** aceites de jatropha, de las semillas del tabaco y el mango, de la materia grasa del salmón, aceites de cocina usados y sebos de origen ovino. Su uso es menos competitivo con la industria alimentaria, pero en algunos casos presentan problemas de rendimiento en el motor a baja temperatura y otras complicaciones de tipo biosanitario en relación con los compuestos emitidos durante la combustión del biodiesel (Usta, 2005; Reyes y Sepúlveda, 2006; Aransiola, 2013).
- **Materias primas de tercera generación:** se trata principalmente de los aceites acumulados en el interior de las microalgas. Presentan las mejores condiciones medioambientales de producción y no son competitivas con el mercado alimentario. Su empleo como materias primas es económicamente más barato y

renovable, además de que su producción contribuye a la fijación por parte de las microalgas del CO₂ atmosférico. Su coste de producción es comparativamente bajo y conlleva la generación de subproductos de alto valor añadido como proteínas o bioplásticos. El principal inconveniente es el tiempo de cultivo necesario para lograr una producción rentable (Chisti, 2007; Brennan y Owende, 2010; Moazami y col., 2011).

La producción de biodiesel requiere de catalizadores que reduzcan el tiempo de reacción. En función del tipo de componente que se emplee como catalizador se distinguen tres formas distintas de síntesis (Tan y col., 2013):

- **Catálisis ácida:** se realiza con catalizadores homogéneos (ácidos de Brönsted) y heterogéneos. Presentan alta selectividad hacia los ésteres metílicos, aunque el tiempo de reacción es largo (3 horas al menos). Si el catalizador es de tipo heterogéneo, se suelen utilizar combinaciones de metales dobles Fe/Zn sobre ciadina u óxidos de circonio o titanio. Con estos últimos se han obtenido muy buenos rendimientos con respecto al aceite inicial y una glicerina residual con casi un 98% de pureza (Bournay y col., 2005).
- **Catálisis básica:** se emplean bases fuertes como sosa, potasa o metóxidos. Tiene la ventaja de que los tiempos de reacción son más cortos y las condiciones de operación más suaves. Sin embargo, los catalizadores básicos son más sensibles al tipo de aceite empleado como sustrato, concretamente a su contenido en ácidos grasos, y el producto presenta un mayor contenido en impurezas, en especial jabones.
- **Catálisis enzimática:** las enzimas son mucho más específicas con los sustratos, generando una corriente de salida con menos impurezas. Las condiciones de operación son moderadas y la purificación, más sencilla. Sin embargo, la velocidad de reacción es muy baja, ya que se producen inhibiciones en el proceso si el ratio alcohol-aceite es muy alto. Por otra parte, el coste del catalizador es muy elevado (Lara y Park, 2003).

El empleo del biodiesel como biocombustible se desarrolla fundamentalmente como sustituto total o parcial del gasóleo en motores de combustión. El biodiesel puede mezclarse con el gasoil en diferentes proporciones de forma que se distinguen distintos tipos de denominaciones en función del porcentaje en volumen de biodiesel en la mezcla

(B100, B5, B15, etc). Por regla general, el rendimiento en el motor es bueno, aunque en ocasiones es necesario modificar algunas partes internas del mismo, ya que la mezcla es capaz de degradar el caucho (Verma y Sharma, 2016).

Los diferentes impulsos estatales a lo largo de la primera década del siglo XXI han favorecido a la industria del biodiesel. Así, por ejemplo, en el periodo 2000-2006 la producción de biodiesel en Estados Unidos creció sensiblemente, con unas perspectivas de crecimiento hasta 300 millones de m³ en 2012 (Ayoub y Abdullah, 2012). Sin embargo, el impacto de la crisis económica a partir de 2007 dejó estas cifras en 12 millones de toneladas a finales de 2011. A nivel mundial, hubo una tendencia similar; así, en 2007 la producción global se situó en 7,9 millones de toneladas, siendo Alemania el primer país productor (2 Mt), seguido de los Estados Unidos, Francia (1,15 Mt) e Italia (0,55 Mt). El impulso de esta industria se mantuvo durante varios ejercicios, con un aumento de la producción de un 65% con respecto a 2008 a finales del año 2013. En dicho ejercicio se alcanzó la cifra de 27,06 Mt, mientras que en 2014 se produjeron 29,12 millones de toneladas (Ayoub y Abdullah, 2012; Renovables, 2015).

Los últimos datos disponibles de producción mundial indican un importante descenso, ya que en el periodo comprendido entre octubre de 2014 y septiembre de 2015 se produjeron 19,74 Mt, lo que supone una reducción del 24% en términos anuales. La causa fundamental es una modificación de los planes de desarrollo en el sector del transporte, especialmente en la Unión Europea, donde desde septiembre de 2014 entró en vigor la Normativa Euro 6, que impone más restricciones a las emisiones contaminantes de los motores diésel y gasolina, tanto en turismos como en vehículos industriales, autobuses y maquinaria agrícola. Esta normativa perjudica especialmente a los motores diésel, ya que sus emisiones en partículas en suspensión y óxidos de nitrógeno son superiores a las de gasolina.

La producción mundial de biodiesel está liderada por la Unión Europea, con casi 10,2 millones de toneladas a finales de 2013 y una capacidad instalada en las fábricas en torno a 23 millones de toneladas (ver Figura 15). Sin embargo, el estancamiento del sector anteriormente mencionado ha supuesto que en los últimos cinco años la capacidad instalada se ha incrementado de 21,3 a 23 Mt, mientras que en el lustro anterior creció desde 3,6 a 21,3 Mt entre 2005 y 2010. Dentro de los Estados de la Unión, Alemania lidera la industria europea con una producción de 2,6 Mt, seguido de Francia (1,93 Mt), Holanda

(1,22 Mt) y España, que ocupa el cuarto lugar con 580.000 toneladas al año. Por países, Estados Unidos encabeza esta lista con 4,53 millones de toneladas en 2013 y 105 fábricas de producción abiertas. Le siguen Indonesia, Brasil, Alemania y Argentina.

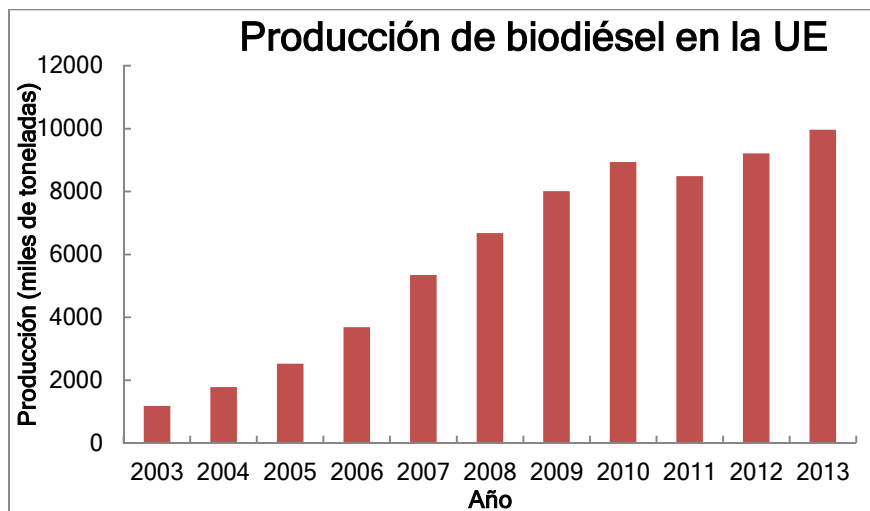


Figura 15. Evolución de la producción de biodiesel dentro de la Unión Europea en el periodo 2003-2013.

Extraído de (Renovables, 2015).

El estancamiento en la producción también se refleja en el consumo de biocombustibles que, en 2013, descendió en la UE un 8%, con respecto al año anterior. España, que cuenta con la mayor capacidad europea instalada en sus plantas (casi 5 Mt), por encima de Alemania, Francia e Italia, tiene uno de los niveles de consumo de biocarburantes más bajos del continente. Ocupa el cuarto puesto en este ámbito con 816.461 toneladas en 2013, un 57% menos que en 2012. Ello es consecuencia de la rebaja de los objetivos obligatorios de sustitución del gasóleo de automoción por fuentes renovables decretada por el gobierno para 2013 y años sucesivos del 7 al 4,1%. Por ello, el mercado de los biocombustibles en España está casi un 20% por debajo del de la media europea (5,15%) y debería multiplicarse por tres para alcanzar los objetivos fijados en la legislación comunitaria de que las fuentes de energía renovables satisfagan el 20% de la demanda energética en 2020 (Renovables, 2015).

Como consecuencia de esta situación, 15 de las 35 plantas de biodiesel existentes en España han cerrado durante el año 2013, al tiempo que el 85% de las 38 restantes estuvieron paradas o funcionando muy por debajo de su capacidad instalada.

1.2.2. Propiedades, calidades y usos tradicionales de la glicerina

La glicerina, principal subproducto del proceso de producción del biodiesel, es un líquido viscoso, soluble en agua, incoloro, inodoro e higroscópico con un alto punto de ebullición (ver Tabla 2). Su solubilidad en agua y su alto contenido en carbono y oxígeno le conceden un alto número de aplicaciones industriales, siendo muy versátil como materia prima o intermedio en la fabricación de diversos productos. Sin embargo, la glicerina resultante de la fabricación del biodiesel, conocida como glicerol crudo por su alto contenido en impurezas, ha contribuido a aumentar el excedente de esta sustancia, ya de por sí con un mercado saturado y bien definido, y ha pasado a ser considerada como un residuo (Ayoub y Abdullah, 2012; Tan y col., 2013). A esta situación hay que añadir que las especificaciones de pureza de la glicerina para su uso en industrias como la farmacéutica o la alimentaria son muy estrictas (superior al 99%), de modo que se hace necesario el desarrollo de procesos de purificación o revalorización de esta glicerina cruda para su uso directo o su transformación en otros productos de alto valor añadido e interés industrial. A nivel comercial existen tres tipos de glicerina en función de su nivel de pureza (Ayoub y Abdullah, 2012):

- **Glicerol puro:** es la fracción con mayor nivel de pureza, 99,1-99,8%, con un mínimo contenido en cenizas y jabones y un pH muy ácido (0,04-0,07).
- **Glicerol refinado:** su pureza es ligeramente inferior (99,2-99,8%). Incluye pequeñas trazas de cenizas, jabones y cloruros, del orden de 1 ppm.
- **Glicerol crudo:** está formado por una glicerina entre un 60 y un 85% en peso, con alto contenido en jabones (3-5%), cenizas (2,5%) y humedad (6,5%).

Las aplicaciones tradicionales de la glicerina comprenden un amplio espectro de sectores, tal y como se apuntó anteriormente, entre los que destacan las industrias farmacéuticas, de cuidado personal y alimentaria. La glicerina es empleada en productos de higiene personal, cosmética y como aditivo en la fabricación de medicamentos por su alta viscosidad y su capacidad higroscópica de conservación de la humedad. Estas aplicaciones

suponen actualmente el 34 % de los usos de este producto a nivel industrial, según datos de 2013. En alimentación se usa como agente disolvente, edulcorante o conservante, mientras que también es la materia prima en la producción de poliéteres y triacetín (ver Figura 16). La industria del tabaco la utiliza para conservar la frescura de los cigarrillos y regular su humedad, mientras que algunos fabricantes de papel la añaden como agente plastificante y lubricante.

Tabla 2. Propiedades fisico-químicas de la glicerina. Adaptado de (Perry y col., 1997).

Propiedad		Valor
Estado de agregación en condiciones normales (1 atm, 25 °C)		Líquido
Color		Incoloro
Punto de fusión (° C)		17,9
Punto de ebullición (° C)		290
Solubilidad en 100 partes de disolvente		
Agua		Infinita
Alcohol		Infinita
Éter		Insoluble
Viscosidad (cP)		
Al 100% de pureza		10
Al 50% de pureza		25
Difusividad en ($\times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$)		
Etanol		0,56
Agua		0,94
Calor específico en disolución acuosa (% mol)	15 °C (cal/g· °C)	30 °C (cal/g· °C)
5	0,961	0,96
10	0,851	0,924
45	0,671	0,672
100	0,555	0,576

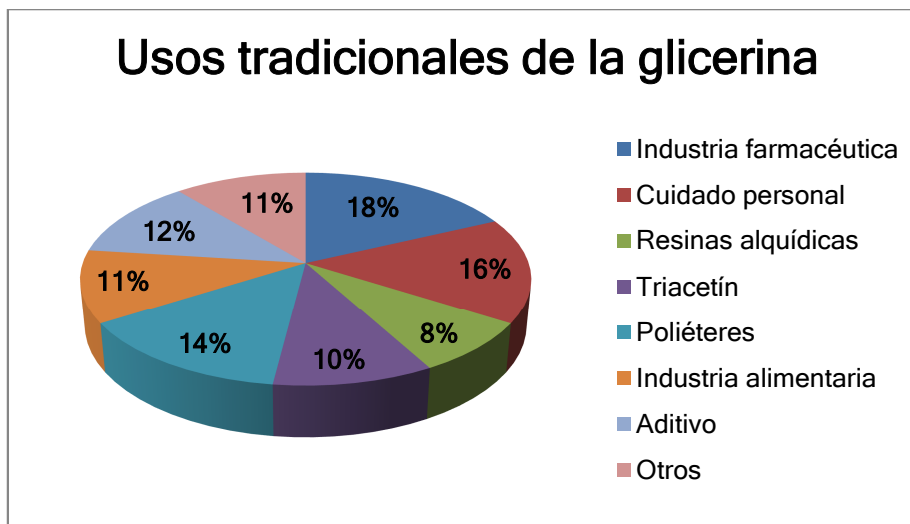


Figura 16. Distribución de los usos tradicionales de la glicerina, adaptado de (Tan y col., 2013).

El impacto negativo del exceso de glicerina en el mercado se ha visto reflejado en la práctica con el cierre de varias plantas de producción de glicerina sintética por parte de *Dow Chemical* y *Procter & Gamble* en Texas e Inglaterra, respectivamente (Anitha y col., 2016). La necesidad de buscar alternativas para la glicerina cruda ha sido una constante durante los últimos quince años, cuando ya el 65% del glicerol producido a nivel mundial era originario de la transesterificación del biodiesel (Quispe y col., 2013). Esto supone que los principales productores de glicerol crudo sean países de la UE como Alemania, seguido de Estados Unidos, Indonesia, Argentina y Francia. El mercado se encuentra, por tanto, en una etapa de arranque, debido a la falta de desarrollo de procesos químicos de conversión en sustancias de alto valor añadido. Esto hace que el precio del glicerol crudo sea un 92% inferior al de la glicerina pura, cuyo valor también se ve desestabilizado por los excedentes industriales. Ya en el año 2006, el remanente industrial de 200 millones de libras de glicerol crudo alteró el precio de la glicerina hasta situarlo en niveles mínimos históricos (0,11 \$/kg). Su impulso como materia prima en biorrefinerías supone la eliminación de los residuos de la industria del biodiesel, la producción de sustancias de alto valor añadido y un descenso en el coste de producción del propio biodiesel, ya que la mayor parte de las inversiones en las fábricas de este compuesto se destinan a tratamientos de refinado del glicerol crudo obtenido como subproducto (Quispe y col., 2013; Anitha y col., 2016).

Antes de la explosión de la industria del biodiesel, en torno al año 2003, la síntesis de glicerina cruda provenía principalmente de la producción de jabones (24%) y ácidos grasos (47%). Sin embargo, en el periodo 2004-2006 la producción de glicerol crudo se

multiplicó por cuatro a nivel mundial, momento en el que no sólo China y la India imitan el modelo europeo de sustitución de los combustibles fósiles por fuentes renovables, sino que también Canadá y Argentina empiezan a comercializar biodiesel.

Se calcula que en 2015 la producción mundial de glicerol crudo alcanzó los 1.920 millones de kilogramos. Estas cifras alteran más si cabe el valor comercial de la glicerina, dentro de un mercado ya de por sí muy saturado. La fluctuación de las importaciones ha sido mucho mayor que la de las exportaciones a nivel global. El caso más paradigmático es el de Estados Unidos; hasta 2010 este país mantiene un nivel más o menos estable de exportaciones de glicerol crudo, pero no así de importaciones, con un importante descenso de éstas desde 2005. La crisis económica encareció desde 2007 los costes de envío por parte de los países productores, por lo que ya en 2009 el volumen de importaciones de glicerol crudo en Norteamérica era prácticamente nulo.

La estabilidad de las exportaciones de glicerina (entiéndase los tres tipos de glicerina descritos anteriormente) se ha debido al peso del glicerol refinado, que, al ser más puro, puede emplearse directamente en la industria alimentaria. En los últimos años, Malasia ha dado un gran impulso a las exportaciones y va camino de convertirse en el primer ofertante de glicerina a nivel mundial. Actualmente, Europa, Estados Unidos y los países del Sudeste Asiático y Latinoamérica son los principales productores de glicerol crudo y en todos ellos la demanda está satisfecha; mientras que China, Japón y Oriente Próximo son potenciales receptores de este producto en gran parte gracias a la creación en estas regiones de importantes empresas en industrias de alto valor añadido como la alimentaria, la farmacéutica y la cosmética.

El precio de mercado del glicerol se ha mantenido constante hasta inicios del siglo XXI, donde, a excepción del periodo 2007-2008, cuando su demanda por parte de los países asiáticos incrementó su valor comercial en un 69%. A partir de 2009 el descenso ha sido muy drástico por exceso de oferta. En el caso particular de glicerol crudo, su precio actual es tan bajo que al productor de biodiesel le sale más barato pagar por su incineración que venderlo en el mercado (12,5 cts \$/kg).

El excedente de glicerol crudo, cuya pureza no satisface los requerimientos para ser empleada en sus usos tradicionales, ha influido muy negativamente en el precio del biodiesel, cuyo coste es entre 2 y 1,5 veces el precio del gasoil convencional. Este

incremento se debe fundamentalmente al coste de procesamiento de la corriente de salida, formada por glicerol crudo en su mayoría (Anitha y col., 2016). Para lograr un glicerol más concentrado apto para su uso industrial se utilizan varias técnicas combinadas como la destilación, la decantación, la filtración, el tratamiento químico, la adsorción, la extracción o la cristalización. Los dos más destacados son la destilación, para eliminar la fracción alcohólica, y el intercambio iónico, para separar las sales inorgánicas e iones libres procedentes de la transesterificación (Ripoll, 2016). El rendimiento de la destilación es bajo (en torno al 15%), pero la glicerina resultante presenta un alto grado de pureza (superior al 96,6%). El intercambio iónico emplea resinas de *Amberlita* en columnas de lecho fijo, combinadas con un paso por una fase sólida de carbón activo. En este caso los rendimientos son altos y el coste de operación muy bajo, por lo que este método se ha generalizado en las fábricas de producción de biodiesel (Quispe y col., 2013; Anitha y col., 2016).

1.2.3. Desarrollo de nuevas formas de valorización

Teniendo en cuenta todo lo anterior, resulta evidente considerar el desarrollo de procesos de revalorización del glicerol crudo en la actualidad. Las posibilidades son altas, debido al gran número de aplicaciones que puede tener, especialmente en el campo de las biorrefinerías, donde puede utilizarse para la producción de sustancias de alto valor añadido.

Este impulso puede suponer la reducción del excedente que supone su consideración como residuo industrial y también el descenso de los costes de producción del biodiesel. El consorcio GRAIL (Glycerol Biorefinery Approach Towards) elaboró ya en 2013 una colección de potenciales usos de este glicerol crudo, divididos en cuatro grupos de reacciones químicas:

- **Deshidratación.**
- **Hidrogenolisis.**
- **Oxidación selectiva.**
- **Biotransformación.**

Uso energético

En el primer grupo destacan sus potenciales aplicaciones como aditivo para combustibles. La glicerina puede transformarse en aditivos oxigenados para gasolina o diésel, con importantes ventajas para el motor y la combustión. La mezcla de estas sustancias con estos combustibles aumenta el índice de octano y la viscosidad, reduce el punto de niebla y las emisiones contaminantes gaseosas y mejora las propiedades del combustible en frío. El principal aditivo es el metil terc-butil éter (MTBE) (Tan y col., 2013). La conversión de glicerina en aditivos oxigenados se realiza mediante transformación catalítica por eterificación, esterificación, acetilación y transesterificación. Dentro de la gama de aditivos procedentes de la glicerina destacan también el éter de terc-butil glicerol (TTBG) o el ditercbutil glicerol éter (DTBG).

La conversión de glicerol en hidrógeno recibe el nombre de “*reformado*” y puede realizarse por diferentes procesos. La más común es el reformado con vapor, en la que el sustrato reacciona directamente con vapor de agua con la ayuda de un catalizador formando hidrógeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono. Los catalizadores que suelen emplearse consisten en óxidos metálicos (Al, Ce, Zr), que sirven de soporte a metales como el iridio, el níquel o el cobre. Los procesos de reformado con vapor requieren altas temperaturas (600-800°C) y ratios molares de agua-glicerol entre 3 y 9. El reformado en fase acuosa ha sido estudiado en catalizadores de Pt, Pd, Ni o Co sobre óxidos de magnesio y circonio (Ayoub y Abdullah, 2012; Tan y col., 2013).

Materia prima en síntesis química

El tercer grupo de reacciones está constituido por procesos de pirolisis y gasificación, como alternativas para la síntesis de compuestos de alto valor energético. En ambos se generan metanol, CO, CO₂, hidrógeno, formaldehído, etanol, acetaldehído y otras sustancias de bajo peso molecular. La mayor parte de los procesos pirolíticos sobre la glicerina se llevan a cabo para producir hidrógeno o gas de síntesis (CO + H₂), vía *Fischer-Tropsch* o sobre carbón activado. La gasificación se emplea para obtener gas de síntesis en reactores de lecho fijo (Anitha y col., 2016).

Por otro lado, a través de oxidación selectiva empleando catalizadores heterogéneos se pueden sintetizar otros compuestos de interés a partir de glicerina como la dihidroxiacetona, el gliceraldehído o la acroleína, así como materias primas en la industria

polimérica como los “*dendrímeros*” y los monómeros del poliéster ramificado y sus variedades, que incluyen compuestos con alta relación superficie/volumen y numerosos grupos funcionales. El principal producto de la oxidación catalítica es la acroleína, intermedio fundamental en la síntesis del ácido acrílico y sus ésteres, usados como aditivos antifúngicos en el tratamiento de la piel, y como antimicrobianos en los pozos de petróleo (Rao Gijnjupalli y col., 2014).

Materia prima en bioprocesos enzimáticos y microbianos

El glicerol es un sustrato con muchas posibilidades para ser utilizado como materia prima (sustrato carbonado) en muchos bioprocesos, aerobios y anaerobios. En estos procesos se sintetizan ácidos orgánicos, alcoholes o gases de interés industrial como el metano, principal componente del “*biogás*”. En este último caso, la adición de glicerol crudo en pequeñas cantidades favorece la digestión, así como la calidad del biogás obtenido y el rendimiento del proceso.

El uso de glicerol como sustrato en fermentación permite obtener una gran cantidad de productos como dioles (1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol), alcoholes (metanol, etanol), ácidos orgánicos (acetato, lactato, formiato) e hidrógeno (Celińska y Grajek, 2009; Saxena y col., 2009; Ji y col., 2011). La mayor parte de los procesos de bioconversión estudiados se llevan a cabo con microorganismos de especies como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella* o *Lactobacillus* (Celińska y Grajek, 2009; Ji y col., 2011; Ripoll y col., 2016). La degradación microbiana del glicerol se realiza a través de la ruta ácido-mixta, cuyo esquema aparece representado en la Figura 17. Como puede observarse en dicha figura, la ruta ácido mixta está formada por dos ramificaciones acopladas: la vía oxidativa y la vía reductiva. A través de la primera, el glicerol se convierte en piruvato vía dihidroxiacetona (DHA) y fosfoenolpiruvato (PEP). A continuación el piruvato se metaboliza en tres ramas para regenerar el poder reductor (NAD^+), formando lactato, acetyl-CoA o α -acetoacetato. Estos dos últimos continúan la ruta oxidativa hasta formar una mezcla de alcoholes (etanol, butanol y 2,3-butanodiol vía acetoína) y ácidos orgánicos (succínico, acético y butírico) (Chatzifragkou y col., 2011). Mediante la vía reductiva el glicerol es convertido en 3-HPA por deshidratación con la participación de la enzima glicerol deshidratasa (GDHt). Posteriormente, la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa (1,3-PD DH) transforma el 3-HPA en 1,3-PD mediante hidratación, regenerando consigo el poder reductor necesario para el mantenimiento activo del metabolismo (Ji y col., 2011).

La conversión del glicerol lleva acoplada la producción de biomasa y el flujo metabólico de carbono puede desplazarse hacia una u otra rama de la ruta, en función de las condiciones de operación empleadas (aerobiosis, anaerobiosis o microaerobiosis) y la naturaleza del biocatalizador empleado (ver también Figura 8).

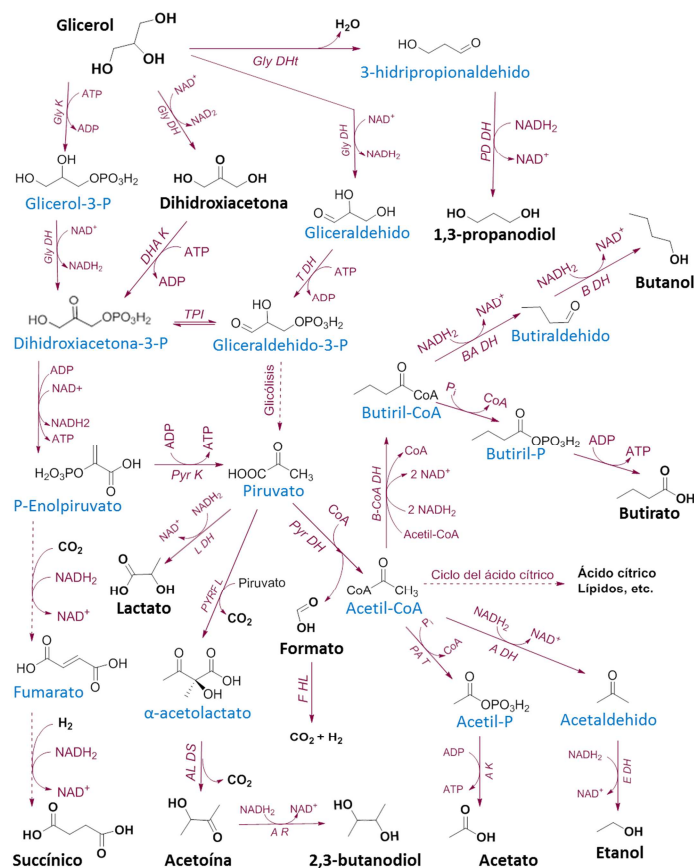


Figura 17. Esquema simplificado de la degradación del glicerol a través de la ruta metabólica ácido-mixta.

Extraído de (Ripoll, 2016).

Por último, dentro de las nuevas vías de revalorización del glicerol crudo que emplean microorganismos completos como biocatalizadores, destacan su uso en células de combustible y como fuente de carbono en la desnitrificación de las aguas residuales (Tan y col., 2013; Anitha y col., 2016). La primera permite obtener energía eléctrica así como otros productos de alto valor añadido como sales de ácidos orgánicos (tartrato, hidroxipiruvato) o dioles (1,3-propanodiol). Las células de combustión pueden ser microbianas (hay resultados prometedores con este tipo de sistemas empleando bacterias

como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Nimje y col., 2011; Reiche y Kirkwood, 2012) o de combustión directa, en las que el glicerol se emplearía como sustituto de los alcoholes tradicionales (Ilie y col., 2011). En el ámbito del tratamiento de aguas residuales, hay estudios recientes que utilizan glicerol en lugar de metanol como sustrato en la desnitrificación, ya que su adición a los lodos mejora el rendimiento en nitratos eliminados (Lu y Chandran, 2010; Cyplik y col., 2013; Bernat y col., 2015)

Los dos productos obtenidos mediante transformaciones microbianas a partir de glicerol en la presente Memoria son de gran interés en diversos ámbitos de la industria química. El 1,3-propanodiol (1,3-PD) es un líquido incoloro, viscoso y no inflamable, miscible en agua y varios disolventes orgánicos como alcoholes y éteres. Está considerado como un producto de altísimo valor añadido debido a sus propiedades físicas y su versatilidad en numerosas reacciones de síntesis (Kaur y col., 2012). Sin embargo, su alto coste y su baja disponibilidad provocaron que durante décadas sus aplicaciones estuvieran muy restringidas, principalmente como disolvente. Sin embargo, el anuncio por parte de las empresas *DuPont* y *Shell* en el periodo 1995-1998 de la comercialización de un derivado directo, el polimetilentereftalato (PTT), disparó su demanda a nivel mundial y su producción a gran escala (Lee y col., 2015; Wojtusik y col., 2015). El PTT es un producto de la condensación del 1,3-PD y el ácido tereftálico, que se emplea como plástico en la manufactura de alfombras y fibras textiles.

Las excelentes propiedades del PTT impulsaron el uso del 1,3-PD en otras reacciones de condensación y en poco tiempo se demostró que su adición en este tipo de procesos modificaba ciertas propiedades de los plásticos. Por ejemplo, en los termoplásticos uretanos (TPU) mejora las propiedades hidrolíticas y térmicas, mientras que en los materiales empleados en cubiertas de almacenes aumentaba la flexibilidad del polímero sin afectar a otras propiedades clave como la estabilidad y la resistencia al frío o el calor (Zeng y Sabra, 2011; Kaur y col., 2012).

Además de su uso en la industria de los plásticos, el 1,3 PD tiene otras aplicaciones en numerosos ámbitos. En las industrias cosmética y farmacéutica es un aditivo en detergentes, repelentes de insectos, perfumes y funciona como intermedio de reacción en la fabricación de la vitamina H y algunos medicamentos inmunodepresores (Celinska, 2010). También se añade a los anticongelantes tradicionales para mejorar su resistencia térmica y

a la corrosión, así como para reducir su toxicidad. Por último, tiene aplicaciones en la fabricación de resinas, disolventes, moldes y materiales laminados (Kaur y col., 2012).

En cuanto al 2,3-butanodiol (2,3-BD), se trata de un compuesto con dos centros quirales, característica que le confiere tres posibles configuraciones en el espacio, que forman los estereoisómeros *meso*, 2*R*, 3*R* (-) o isómero levógiro y 2*S*, 3*S* (+) o isómero dextrógiro. Es un líquido inodoro e incoloro, con alta capacidad higroscópica y elevada solubilidad en agua; propiedades que permiten su uso como aditivo en industrias como la farmacéutica, la cosmética, la fabricación de explosivos, pinturas, insecticidas y gasolina (Ripoll, 2016). Es también considerado como compuesto químico de base o “*bulk chemical*” para la fabricación de sustancias de alto valor añadido, como la metiletilcetona (MEK), empleada como aditivo en combustibles fósiles y como disolvente en resinas y lacas (Celińska y Grajek, 2009).

La deshidrogenación del 2,3-BD produce acetoína, si afecta a un solo grupo hidroxilo, o bien al diacetilo, si la reacción se completa en los dos grupos funcionales. Ambos productos son empleados en la industria alimentaria como sustancias aromatizantes. Por otro lado, a través de una reacción de acetilación, el 2,3-BD se transforma en un compuesto muy similar estructuralmente al metil terc-butil, aditivo muy utilizado en la formulación de gasolinas (Garg y Jain, 1995) y, por tanto, con potenciales aplicaciones en este ámbito. Por último, mediante esterificación se pueden obtener precursores de numerosos polímeros termoplásticos, como el nitrato de celulosa, el cloruro de polivinilo y algunos metacrilatos, sintetizados a partir del diéster del 2,3-BD (Ji y col., 2011).

1.3. BIO-DESULFURACIÓN DE COMBUSTIBLES

Debido a los efectos negativos sobre el medio ambiente, la eliminación de la fracción azufrada en los combustibles fósiles ha sido impulsada por la comunidad científica para tratar de lograr emisiones más limpias como resultado de su uso como fuente de energía. La cantidad de azufre que contienen este tipo de sustancias depende de su origen y su formación, incluso no es uniforme dentro del mismo combustible. En valor promedio, el carbón contiene entre un 5 y un 11% de azufre, mientras que en el gas natural este porcentaje es muy inferior, en torno a las 50 partes por millón (Lee y col., 2005). Por

su parte, en el petróleo el azufre es el tercer elemento más abundante tras el carbono y el hidrógeno, y su contenido varía entre el 0,03 y el 8% en peso (Mohebbali y Ball, 2008).

El azufre presente en los combustibles puede encontrarse en forma inorgánica, como ocurre con la pirita o el sulfuro de hidrógeno, o bien formando parte del propio compuesto orgánico, normalmente compuestos aromáticos, tales como tioles, tiofenos o compuestos ciclo-alquílicos. La fracción azufrada del petróleo suele ser inversamente proporcional a la volatilidad de la fracción de crudo considerada. Así, si se trata de una fracción ligera como la gasolina no suele sobrepasar el 0,02% en peso, mientras que en los asfaltos alcanza porcentajes superiores al 4%. En el caso del diésel, este contenido puede llegar hasta el 2% y, teniendo en cuenta su grado de utilización en los motores actuales, la mayor parte de los estudios de eliminación de azufre en el campo de los combustibles, suelen centrarse en el gasóleo. A esta situación hay que unir también la legislación internacional en cuestiones medioambientales, cada vez más restrictiva en cuanto al contenido de azufre en el diésel (Monticello, 2000).

En la actualidad, la máxima concentración de azufre permitida en un combustible como el gasóleo en la Unión Europea no puede superar las 10 ppm, de acuerdo a la Directiva 2003/17/CE. En Estados Unidos, desde 2006 el objetivo es reducir este contenido de 500 a 15 ppm hasta comienzos de la segunda década del siglo XXI, mientras que en Japón ya en 2004 se impuso un contenido máximo de 50 ppm (Nemoto, 2002; Stanislaus y col., 2010).

Las principales alternativas para reducir el contenido de azufre en los combustibles fósiles se muestran en la Tabla 3, junto con su fundamento y sus características más representativas. Como puede observarse, las técnicas físico-químicas convencionales tienen serios problemas para eliminar los compuestos recalcitrantes como el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados alquilados, a la vez que las condiciones de operación necesarias para lograr unos buenos resultados en lo que respecta al rendimiento y los requisitos legales previamente descritos son severas desde el punto de vista medioambiental (Soleimani y col., 2007). En el caso de utilizar metodologías basadas en la adsorción física de estos compuestos, las principales limitaciones residen en que los sólidos utilizados como adsorbentes se sobrecargan fácilmente cuando el contenido en azufre de la corriente de partida es elevado (Babich y Moulijn, 2003).

Teniendo en cuenta estos inconvenientes, en muchos de los casos se ha optado por combinar la hidrosulfuración con las nuevas tecnologías alternativas, aunque los resultados no permiten todavía su implantación a nivel industrial. Por ello, la bio-desulfuración representa una alternativa interesante en este campo, cuyas ventajas, además de las que aparecen en la Tabla 3, permiten reducir los costes de inmovilizado y operación entre un 10 y un 15% (Javadli y de Klerk, 2012).

Sin embargo, a pesar de los numerosos aspectos positivos del tratamiento biológico, la bio-desulfuración presenta una serie de inconvenientes, derivados de la difícil miscibilidad entre la fase orgánica que contiene el combustible y la fase acuosa en la que suele encontrarse el biocatalizador, aumentando el tiempo de operación y reduciendo la eficiencia de la transferencia de materia (Stanislaus y col., 2010; Escobar, 2013; Martínez, 2013). Además, los procesos de separación de las fases y recuperación y reutilización del biocatalizador son largos y tediosos. En bio-desulfuración (BDS) se utiliza el DBT como compuesto modelo, ya que tanto éste como sus derivados representan el 90% del azufre del crudo fraccionado y son altamente recalcitrantes en el proceso de hidrosulfuración (Javadli y de Klerk, 2012). En el siguiente apartado se resume el estado del arte de la BDS y los principales aportes realizados en esta área por el grupo de investigación FQPIMA.

Tabla 3. Principales técnicas de desulfuración de combustibles. Adaptado de (Stanislaus y col., 2010; Martínez, 2013).

Técnica	Tipo de tratamiento	Fundamento	Observaciones
Hidrodesulfuración	Químico	Transformación de los compuestos azufrados en hidrocarburos y H ₂ S mediante catálisis heterogénea	Requiere condiciones de alta presión (10-15 atm) y temperatura (200-450 °C). Los catalizadores no suelen ser lo suficientemente activos como para que el diésel tratado cumpla la legislación vigente.
Desulfuración oxidativa		Oxidación de los compuestos sulfurados a sulfonas y posterior extracción de éstas	Baja eficiencia. Necesidad de desarrollar nuevos catalizadores
Adsorción reactiva		Conversión de los compuestos en H ₂ S y posterior retención en un adsorbente	Problemas de eficiencia si el adsorbente se sobrecarga al tratar corriente con alto contenido en azufre
Adsorción no reactiva	Físico	Retención de la fracción azufrada en un sólido adsorbente	La capacidad de carga de los adsorbentes es baja para cumplir la legislación
Desulfuración extractiva		Puesta en contacto del diésel con disolventes orgánicos o líquidos iónicos para extraer los compuestos del azufre	Alta selectividad. Condiciones de operación suaves. Problemas para recuperar el disolvente o el líquido iónico. Empleo de agentes contaminantes
Bio-desulfuración	Biológico	Empleo de enzimas u organismos vivos para eliminar los compuestos azufrados	Empleo de condiciones de operación suaves. Alta selectividad. Tiempos largos de operación

1.3.1. Aplicaciones con el DBT como compuesto modelo

Los primeros trabajos disponibles en bibliografía que abordan el problema de la eliminación de compuestos azufrados del diésel mediante un tratamiento biológico datan de las décadas de los años 70 y 80 del siglo pasado, aunque los biocatalizadores seleccionados por aquel entonces no eran los más adecuados para el proceso (Ohshiro y Izumi, 1999). Las legislaciones medioambientales impulsadas a partir de los años noventa centraron la atención masiva de la comunidad científica en este ámbito y el descubrimiento de la ruta denominada 4S en *Rhodococcus erythropolis* como microorganismo capaz de convertir el DBT en 2-hidroxibifenilo (HBP).

Posteriormente se descubrieron otros microorganismos capaces de degradar el DBT a través de diferentes rutas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium meliloti* (Hou y Laskin, 1976; Frassinetti y col., 1998). Dentro de las bacterias de tipo anaerobio, las del género *Desulfovibro*, capaces de convertir el compuesto modelo en HBP y H₂S (Onodera-Yamada y col., 2001). Sin embargo, el mantenimiento del proceso en estas condiciones es difícil y la actividad del biocatalizador es mucho más baja que si su metabolismo es de tipo aerobio (Soleimani y col., 2007). Las rutas que mejores resultados presentan son aquéllas en las que se mantiene la estructura carbonada del compuesto inicial, ya que no afectan al poder energético del diésel. La principal es la “ruta 4S”, ensayada con éxito por primera vez con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gallagher y col., 1993).

La ruta 4S está formada por cuatro reacciones en serie (ver Figura 18), en las que el DBT se transforma en HBP, con la participación de las enzimas DszA, DszB y DszC, cuyos genes forman parte del operón *dsz*, (Gray y col., 1996). Para que la actividad de estas enzimas no se interrumpa a lo largo del proceso es necesario regenerar continuamente el poder reductor para que haya disponibilidad de FMNH₂, que a su vez depende de la oxidación del NADH a NAD⁺ (ver Figura 18). Esto requiere de la presencia de una enzima oxidorreductasa NADH:FMN, que en *R. erythropolis* se denominó DszD (Oldfield y col., 1997).

Debido a la especificidad del género *Rhodococcus* en esta ruta, la utilización de microorganismos modificados genéticamente ha sido habitual en la bio-desulfuración, sobre todo cuando los genes de las enzimas DszA-C fueron codificados y aislados mediante técnicas de biología molecular. Sus secuencias han sido incorporadas a otras

cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Mycobacterium*. Como enzima de regeneración de los cofactores FMNH_2 y NADH_2 , además de la DszD, se ha empleado la oxidorreductasa HpaC de *Escherichia coli* W, mejorándose la conversión de DBT (Galán y col., 2000). Esto permitió desarrollar las cepas *Pseudomonas putida* KTH2 y KTH2 peSOX3, empleadas como biocatalizadores en la presente Memoria.

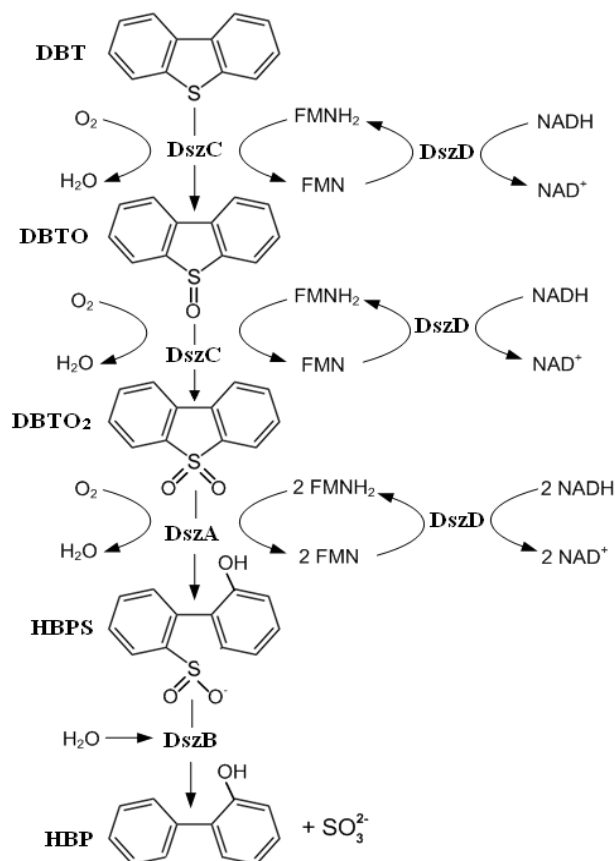


Figura 18. Esquema de reacción de la ruta 4S en *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Extraído de (Martínez, 2013).

Dentro de esta área, el Grupo de Investigación de Físico-química de los Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA) ha desarrollado el bioproceso de desulfuración de DBT desde el año 2002 con tres biocatalizadores diferentes: *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* CECT 5279 y *Pseudomonas putida* KHT2 peSOX3.

En el primer caso, se estudió la influencia de las condiciones de operación del proceso para lograr un biocatalizador que pudiera operar en estado de *resting cells*; esto es, con células suspendidas en un tampón sin fuente de nitrógeno, en el que sólo se añade el sustrato carbonado que quiere emplearse para obtener un determinado compuesto de interés (del Olmo y col., 2005a). Posteriormente, se determinaron también las condiciones de operación más adecuadas para el proceso con células en crecimiento, estableciéndose un modelo cinético capaz de reproducir el comportamiento del sistema (del Olmo y col., 2005a; del Olmo y col., 2005b). Por último, se analizó la influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre la viabilidad celular y la capacidad desulfurante del biocatalizador, variando tanto el caudal de aireación como la velocidad de agitación (Gómez y col., 2006a; Gómez y col., 2015).

En el caso de *Pseudomonas putida* CECT 5279, los primeros trabajos determinaron el protocolo de obtención del biocatalizador, la composición del medio de cultivo para el crecimiento y las condiciones de operación (Alcón y col., 2005; Gómez y col., 2006b). Posteriormente se observó que el rendimiento del proceso depende de la edad celular (Alcón y col., 2005; Calzada y col., 2011) y se analizó la capacidad desulfurante del biocatalizador a diferentes tiempos de cultivo (Calzada y col., 2011). Una vez determinada la mezcla celular más adecuada para la bio-desulfuración, se describió cinéticamente la transformación con células en crecimiento para todas las condiciones de operación estudiadas (Alcón y col., 2008). Este modelo fue desarrollado también para células en estado de *resting cells* (Calzada y col., 2012).

Los estudios con *Pseudomonas putida* KTH2 peSOX3 han sido realizados siguiendo la misma metodología que con los biocatalizadores anteriores. En primer lugar se estudió el proceso con células de distinta edad, incluyendo la formulación de un modelo cinético empírico (Martínez, 2013). A continuación, se estudió la mejora del proceso mediante la adición de co-sustratos y se modelizó matemáticamente la transformación (Martínez y col., 2015). Posteriormente se investigó la influencia de la velocidad de transporte de oxígeno para células en estado de *resting cells* y el cambio de escala de matraz agitado a biorreactor (Martínez y col., 2016).

En la presente Memoria se incluyen dos publicaciones empleando *P. putida* como biocatalizador en las que se determinó, en primer lugar, el efecto de la variación de las condiciones fluido-dinámicas sobre el crecimiento y la capacidad desulfurante, mediante

cambios en el caudal de aireación y la velocidad de agitación, en la cepa KTH2 peSOX3 (Escobar y col., 2016). A continuación, se evaluó el crecimiento, la viabilidad celular y el consumo de los sustratos carbonados bajo diferentes condiciones fluido-dinámicas en cuatro cepas de este microorganismo, tanto las modificadas genéticamente (KTH2 y KTH2 peSOX3), como dos nativas o *wild-type* (KT2440 y KT2442). El objetivo de este último estudio es determinar los efectos de las modificaciones genéticas sobre el comportamiento de estas cepas en condiciones de bajo nivel de aporte de oxígeno, comparándolas con los microorganismos nativos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los resultados reflejados en las publicaciones de la presente Memoria ha sido necesario el empleo de diferentes materiales y equipos de laboratorio, así como el establecimiento de protocolos experimentales y de métodos de análisis de diferente naturaleza. El presente apartado recoge resumidamente los más relevantes, los cuales se describen con más detalle en las publicaciones que forman el cuerpo de esta Tesis Doctoral.

2.1. MATERIALES

La descripción de los materiales empleados en el presente trabajo se ha realizado en tres apartados: en primer lugar, sobre los biocatalizadores empleados; posteriormente, se relacionan los reactivos de laboratorio; y, en último lugar, se detalla la composición de los medios de cultivo empleados en los diferentes sistemas estudiados.

2.1.1. Biocatalizadores

Al tratarse de una Tesis Doctoral en la que se trabaja con diferentes bioprocesos, se han utilizado diversos biocatalizadores formados por células completas. Cada uno de ellos depende el bioproceso en cuestión, de modo que se clasificarán según la transformación estudiada.

Biocatalizadores empleados en la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol

En esta transformación se han utilizado dos cepas de distintos microorganismos: *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 y *Shimwellia blattae* ATCC 33430. El primero de ellos es una bacteria Gram-negativa, del filo proteobacteria, con un nivel de bioseguridad de tipo 2; es decir, potencialmente patógena para el ser humano, que ha sido empleada anteriormente para la síntesis de bioetanol. Se trata de un microorganismo modificado genéticamente para potenciar la desviación del flujo de carbono hacia la producción de dioles en la ruta de los ácidos mixtos (ver Figura 17), cuya productividad depende del nivel de oxígeno disponible en el medio de reacción (Maddox, 2008). La peligrosidad de esta bacteria para

el organismo ha sido descrita en enfermedades de tipo nosocomial, sobre todo infecciones urinarias o renales en pacientes diabéticos tratados con antibióticos o que presentan alguna enfermedad previa de gravedad (Champluvier y col., 1989).

Por su parte, *Shimwellia blattae* ATCC 33430 es una enterobacteria Gram-negativa, con un metabolismo anaerobio facultativo y con un nivel de bioseguridad de tipo 1 (no patógena para el ser humano). Para la presente Memoria, el microorganismo ha sido proporcionado por el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Fue aislada por primera vez del aparato digestivo de las cucarachas (Burgess y col., 1973) y es capaz de sintetizar “*de novo*” la coenzima B₁₂, propiedad que le confiere un enorme potencial en bioprocesos, como por ejemplo la síntesis del poli-3-hidroxipropionato (Heinrich y col., 2013; Sato y col., 2015), la producción de enzimas dehalogenasas para los procesos de eliminación de alcanos halogenados en el tratamiento de aguas residuales (Mac Nelly y col., 2014) y la síntesis de 1-propanol a partir de diversos azúcares (Urano y col., 2015).

Biocatalizadores empleados en la producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol

En este segundo bioproceso se ha utilizado *Raoultella terrigena* CECT 4519 como biocatalizador, proporcionado por la empresa Biópolis S.L. El género *Raoultella* pertenece a la familia de las enterobacterias, muy próximo al género *Klebsiella*, por lo que en muchas ocasiones resulta difícil diferenciar ambos géneros por parte de las instituciones competentes. La mayor parte de las cepas se han aislado de muestras vegetales, del suelo y del agua en atmósferas que no superan los 10 °C de temperatura (Drancourt y col., 2001). Es un microorganismo aerobio no estricto, de modo que, en determinadas condiciones, puede adaptarse a crecer en ambientes anaerobios. Además de las características anteriores, la Colección Española de Cultivos Tipo la clasifica como una bacteria de tipo 1; es decir, no patógena para el ser humano. Las especies del género *Raoultella* presentan una serie de características comunes como ser oxidasa-negativas, catalasa-positivas, sin movilidad y con una gruesa cápsula de polisacáridos. Su versatilidad metabólica las convierte en biocatalizadores muy prometedores en biotecnología, dado que presentan tanto respiración como rutas metabólicas fermentativas (Ripoll y col., 2016).

Biocatalizadores empleados en el proceso de bio-desulfuración de DBT

En este último caso todos los biocatalizadores utilizados pertenecen a la especie *Pseudomonas putida*, proporcionadas por el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Se trata de un microorganismo perteneciente a la familia de las proteobacterias, con forma de bacilo ligeramente curvado, Gram-negativo, aerobio estricto, oxidasa positiva y quimioheterótrofo. Su interés biotecnológico reside en su aplicación en métodos de biorremediación de suelos, sobre todo en la degradación de tolueno y xileno y, por otra parte, en la síntesis de biopolímeros. En este trabajo se han empleado dos cepas “wild type”: KT2440 y KT2442, y dos cepas modificadas genéticamente: KTH2 y KTH2 peSOX3. La cepa KTH2 se obtuvo de introducir en su genoma los genes que codifican la enzima HpaC, una oxidorreductasa obtenida de *E. coli* W que funciona como regeneradora del poder reductor en la ruta 4S, liberando al medio peróxido de hidrógeno (ver Figura 18) (Galán y col., 2000). A partir de ella, se desarrolló el plásmido peSOX3, que contiene los genes de las enzimas DszA, DszB y DszC, resistente a tetraciclina e inducido por IPTG. La cepa que contiene dicho plásmido junto con la enzima HpaC en su cromosoma recibió por ello el nombre de KTH2 peSOX3 y es la única de las cuatro con capacidad desulfurante del DBT, transformándolo, al final de la ruta 4S, en 2-HBP (Martínez, 2013).

2.1.2. Reactivos

En este apartado se detallan los reactivos empleados para la realización de los distintos experimentos que componen las publicaciones de la presente Tesis Doctoral. Todos ellos son reactivos comercializados por diferentes compañías, a excepción del glicerol crudo, que ha sido suministrado directamente del proceso de fabricación de biodiesel por parte de la empresa *Biocomb Energía S.L.* En la Tabla 4, se describen los productos químicos empleados para el análisis de muestras, reactivos necesarios para el seguimiento de los distintos sustratos carbonados y productos de reacción de los tres bioprocesos estudiados.

El análisis de la composición del glicerol crudo procedente de la fabricación del biodiesel ha sido realizado por el grupo de investigación de *Físicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* de la Universidad Complutense de Madrid a través de diferentes técnicas instrumentales como la cromatografía líquida de alta resolución, la termogravimetría, la cromatografía iónica y la volumetría de Karl-Fisher (Ripoll, 2016). A lo largo de la realización de la presente Tesis Doctoral se han empleado diferentes muestras de glicerol crudo de composición variable (entre el 55 y el 85% en peso) detallada en la Tabla 5. A pesar de las diferencias entre unas y otras en el contenido de ciertos componentes, como ésteres metílicos, monoglicéridos o cenizas, en líneas generales la naturaleza del glicerol crudo utilizado como sustrato carbonado no ha influido significativamente en los resultados recogidos en las publicaciones realizadas con este bioproceso.

Tabla 4. Reactivos utilizados para el seguimiento de los sustratos carbonados y productos de reacción

Compuesto	Marca	Código	Pureza
(2R, 3R) (-) 2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	237639	97
(2S, 3S) (+) 2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	300349	97
1,3-propanodiol	Sigma-Aldrich	P50404	98
Ácido succínico	Panreac Applichem	161883	99
meso-2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	361461	99
K ₂ HPO ₄	Panreac Applichem	A1042	99
Ácido acético glacial	Sigma-Aldrich	338826	99,99
Ácido láctico	Sigma-Aldrich	252476	> 85
Acetoína	Sigma-Aldrich	W200808	> 96
Ácido (L) glutámico	Sigma-Aldrich	G1251	> 99
Glicerol	Sigma-Aldrich	G9012	> 99,5
Etanol	Sigma-Aldrich	2860	> 99,8
Acetonitrilo	Sigma-Aldrich	675415	> 99,9
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich	320501	95-98

Tabla 5. Composición de las diferentes muestras de glicerol crudo empleadas como sustrato carbonado en el bioproceso de producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol.

Compuesto	Concentración	Muestra				
		A	B	C	D	E
Glicerol	g/L	88	55	55	85	68
Agua	% p/p	2	1,8	45	3	32,5
Cloruros	g/L	33,7	24,6	17,3	56,6	44,1
Fosfatos	g/L	5,2	4,5	2,5	6,1	3,7
Ésteres metílicos de ácidos grasos	% p/p	-	5	-	-	-
Monoglicéridos	% p/p	-	16	-	-	-
Diglicéridos	% p/p	-	-	-	-	-
Jabones	% p/p	-	3	-	-	-
Cenizas	% p/p	10	8	5	12	5
Ácidos grasos libres	% p/p	-	3	-	-	-

En la Tabla 6 se muestran los compuestos necesarios para la formulación de los medios de cultivo, el suministrador y su pureza.

Tabla 6. Reactivos empleados para la formulación de los medios de cultivo y los ensayos de contaje de viables en placa.

Compuesto	Marca	Código	Pureza
Acetato de uranilo	Merck	-	-
Ácido (L) glutámico	Sigma-Aldrich	G1251	> 99
Agar	Sigma-Aldrich	A1296	-
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	746495	97
Extracto de levadura	Sigma-Aldrich	1497	-
FeCl ₃ · 6H ₂ O	Merck	103943	97
Glicerol	Sigma-Aldrich	G9012	> 99,5
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	Sigma-Aldrich	I6758	> 99
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	P2222	> 98
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	795488	> 99
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Sigma-Aldrich	M2670	> 99
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma-Aldrich	63140	> 99
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	S7907	> 99
NaCl	Merck	106406	99,99
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	S8282	> 99
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich	A9434	> 99,5
Peptona bacteriológica	Sigma-Aldrich	P0556	-
Silicona antiespumante	Sigma-Aldrich	85390	-
Tetraciclina	Sigma-Aldrich	87128	> 98
Triptona	Sigma-Aldrich	T7293	-

2.1.3. Medios de cultivo

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo empleados en las etapas de conservación y obtención del biocatalizador, contaje de viables en placa y experimentos en biorreactor. La Tabla 7 recoge la composición del medio de conservación del stock concentrado del biocatalizador a -80 °C.

En el caso de los bioprocesos que emplean glicerol como sustrato carbonado para la obtención de 1,3-propanodiol ó 2,3-butanodiol, el medio de cultivo para los ensayos mostrados en las publicaciones es siempre M92X (ver Tabla 8), mientras que en los experimentos de crecimiento de varias cepas de *Pseudomonas putida* para la bio-desulfuración de DBT el medio de obtención del biocatalizador es LB líquido (ver Tabla 9), mientras que el del biorreactor es el BSM (ver Tabla 11). Para todos los casos, las pruebas de contaje de viables en placa han sido realizadas en medio LB sólido (ver Tabla 10).

Tabla 7. Composición del medio de conservación del stock concentrado del biocatalizador a -80 °C.

Compuesto	Concentración (g/L)
Glicerol	500
NaCl	4,5

Tabla 8. Composición del medio de cultivo M92X.

Compuesto	Concentración
CaCl ₂	0,11
Extracto de levadura	1,50
Glicerol	30,0
KH ₂ PO ₄	6,00
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25
Na ₂ HPO ₄	12,0
NaCl	1,00
NH ₄ Cl	2,00

Tabla 9. Composición del medio de cultivo LB líquido. (*) Sólo para los cultivos con la cepa KTH2 peSOX3

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	5,00
NaCl	10,00
Tetraciclina (*)	0,025
Triptona	10,00

Tabla 10. Composición del medio de cultivo LB sólido.

Compuesto	Concentración
Agar	20,0
Extracto de levadura	5,0
NaCl	10,0
Triptona	10,0

Tabla 11. Composición del medio de cultivo BSM. (*) Sólo para los cultivos realizados con la cepa KTH2 peSOX3.

Compuesto	Concentración (g/L)
Ácido (L) glutámico	20,0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	10 ⁻³
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	10 ⁻³
Glicerol	2,00
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (*)	2 · 10 ⁻⁶
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4,00
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,044
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	4,00
NH ₄ Cl	2
Tetraciclina (*)	0,025

2.2. EQUIPOS EMPLEADOS

En este apartado se detallan brevemente las características y condiciones de operación de los equipos de laboratorio utilizados para realizar los experimentos recogidos en las publicaciones de la presente Memoria. Su clasificación se ha realizado en función de su uso: como sistemas de reacción, equipos de análisis o equipos auxiliares, ya sea aquéllos necesarios para las etapas de obtención y conservación del biocatalizador, o bien para el seguimiento de las principales variables experimentales en los ensayos de crecimiento y/o producción de metabolitos.

2.2.1. Sistemas de reacción

Incubadora orbital

Las etapas previas a los experimentos realizados en biorreactor, así como los estudios de las condiciones de operación en los biocatalizadores que transforman el glicerol en 1,3-propanodiol, han sido realizadas en botellas anaerobias de 10 ó 100 mL de vidrio, o bien en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL con tapón de algodón en la parte superior para permitir el intercambio de gases. Estos recipientes se colocan en la incubadora orbital GALLENKAMP, modelo INR-200, que dispone de una plataforma giratoria con una capacidad para 30 matraces y que puede controlar tanto la temperatura (5-70 °C) como la velocidad de agitación (0-400 rpm).

Estufa de suelo

Para el cultivo de los biocatalizadores en medio sólido; esto es, para el contaje de viables en placa Petri, se ha empleado una estufa termostatzada por convección natural de la marca HERAEUS, serie Function Line. El equipo puede controlar la temperatura de la cámara de incubación entre 5 y 70 °C, con una estabilidad de ± 1 °C y un incremento mínimo de $\pm 0,2$ °C.

Biorreactor

Los experimentos recogidos en las publicaciones que componen el cuerpo de la presente Tesis Doctoral han sido realizados en biorreactores diseñados y comercializados por Sartorius BBI Systems. Concretamente, se ha utilizado el modelo BIOSTAT® B-Plus, formado por una cuba de vidrio y una unidad de medida y control del pH, oxígeno disuelto, caudal de aireación, agitación y temperatura gracias al software MFCS/WIN 3.

La cuba de vidrio está formada por un recipiente de doble pared de vidrio borosilicato de 3 litros de volumen total (2 litros de volumen máximo de trabajo) y una tapa metálica con un motor eléctrico acoplado a un eje metálico cilíndrico para permitir la agitación. La tapa dispone también de varios orificios para conectar diferentes sensores (electrodos de pH, oxígeno disuelto o densidad óptica), el condensador, la membrana de inoculación y diferentes conexiones con otros recipientes. El conjunto se encuentra esquematizado en la Figura 19.

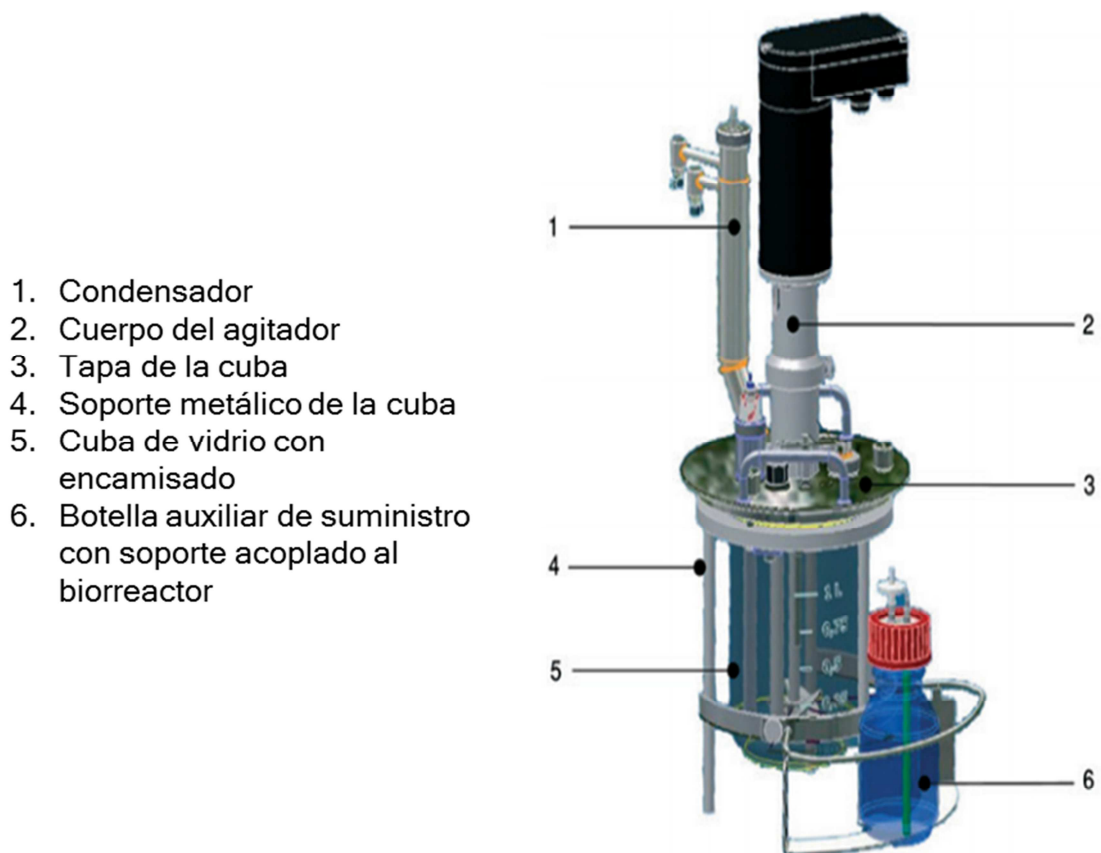


Figura 19. Esquema del biorreactor BIOSTAT® B-Plus con sus principales elementos.

La velocidad de agitación se controla a través de un lazo PID ejercido sobre un motor eléctrico acoplado a la tapa de la cuba, de forma que el eje metálico anteriormente descrito gira a la velocidad escogida. Dicho eje dispone de dos turbinas de tipo *Rushton* de seis palas planas cada una, de altura variable. La agitación se mide a través de un tacómetro con un rango entre 0 y 2000 rpm y una resolución de ± 10 rpm.

La temperatura se controla mediante un encamisado que ocupa la pared externa de la cuba y que está lleno de agua desionizada procedente de un depósito externo FRIGOMIX® 1000 Sartorius que recircula el refrigerante continuamente gracias a un condensador instalado en la tapa de la cuba y que impide también que el caldo de reacción se evapore a lo largo del experimento.

El pH se mide gracias a un electrodo esterilizable, fabricado por Hamilton, conectado a la unidad de reacción. Ésta dispone de un controlador PID capaz de actuar sobre dos bombas peristálticas, una de disolución ácida y otra de disolución básica en función del valor de consigna. El valor de medida varía entre 2 y 12 y la calibración de la sonda se realiza previamente a la esterilización, con dos tampones de referencia: uno de pH 4 y otro de pH 7.

El oxígeno disuelto en el líquido se mide mediante a un electrodo polarográfico esterilizable suministrado también por Hamilton. En su interior se hallan dos electrodos, un ánodo de plata y otro de platino en disolución de cloruro potásico, separados del medio de reacción por una membrana de teflón permeable al oxígeno. La sonda es capaz de medir entre un 0% y un 100% de saturación, con una compensación automática de temperatura. La estación de reacción es capaz de controlar el nivel de oxígeno disuelto, actuando sobre el caudal de aireación y/o la velocidad de agitación en función del tipo de control deseado y del valor de consigna.

Por último, el biorreactor dispone de un analizador de gases situado en la corriente de salida; esto es, justo después del condensador, que permite determinar instantáneamente el contenido de oxígeno y dióxido de carbono del gas que abandona el biorreactor. El medidor está formado por una conducción metálica cilíndrica por la que circula el gas con dos membranas permeables al O₂ y al CO₂ que miden el porcentaje en volumen de cada uno de ellos mediante sendas reacciones redox. El equipo tiene un rango de medida entre 0-50% para el oxígeno y entre 0-10% para el dióxido de carbono. Estas medidas incluyen una compensación automática de temperatura y presión y se registran cada 30 minutos durante cada experimento.

2.2.2. Equipos de análisis

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)

El seguimiento y la cuantificación de los diferentes metabolitos a lo largo de cada experimento se ha realizado empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) de la marca Agilent, serie 1100. El equipo consta de 6 módulos en serie, que se describen brevemente a continuación y cuya disposición se muestra en la Figura 20:

- *Desgasificador*: elimina las posibles burbujas de aire de los canales por los que circula la fase móvil.
- *Bomba cuaternaria*: proporciona el caudal deseado de la fase o las fases móviles empleadas y la proporción en la que éstas se mezclan en el caso de que sea necesario. Cuenta además con una válvula de purga para limpiar los canales cuando se modifica la naturaleza de la fase móvil empleada.
- *Sistema de inyección automático*: está formado por una bandeja portaviales de hasta cien unidades, un brazo automático que transporta la muestra contenida en el vial hasta la zona de inyección, una jeringa que extrae el volumen de muestra deseado y una válvula de seis vías donde la muestra es introducida y se pone en contacto con la fase móvil.
- *Sección de columna*: compartimento termostatzado con capacidad para dos columnas en serie en el que se instala la columna de cromatografía que separa en distinto orden de elución los diferentes componentes de la muestra a analizar.

- *Detector de Diodo de Array (DAD)*: este módulo consta de una lámpara de deuterio, cuya radiación pasa a través de la muestra y permite obtener el espectro de absorción de cada compuesto que ésta contiene, previo paso de la radiación emergente por una red de dispersión halográfica de las distintas radiaciones monocromáticas.
- *Detector de índice de refracción (RID)*: este detector compara la desviación de un haz de luz de la muestra que lo atraviesa con la de una celda de referencia por la que sólo circula la fase móvil. La desviación del haz de luz es detectada por un fotorreceptor que proporciona una corriente eléctrica acorde con la cantidad de luz que recibe.



Figura 20. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100 Series acoplado a un ordenador para la recogida de datos.

El equipo está controlado por un software informático *Agilent ChemStation* que permite fijar los parámetros de operación del cromatógrafo a través de la definición de un método de análisis, donde se introducen variables como el caudal de circulación de la fase móvil, la temperatura de la columna, el volumen de muestra, la temperatura de los detectores, etc. Por otro lado, el software adquiere y almacena los datos de cada muestra en varios archivos o cromatogramas, a partir de los cuales se pueden cuantificar las concentraciones de cada uno de los metabolitos contenidos en una muestra. Además, el programa permite hacer tareas de reparo y test de funcionamiento del equipo, así como la realización de las rectas de calibrado de cada uno de los compuestos que se pretenden analizar.

Espectrofotómetro de absorción de UV/visible

La cuantificación de la concentración de biomasa por absorbancia se ha realizado en un espectrofotómetro de ultravioleta/visible de la marca Shimadzu, modelo UV1603. El equipo cuenta con dos lámparas, una de deuterio para un intervalo de longitudes de onda en el espectro ultravioleta y otra de tungsteno para longitudes de onda del espectro visible y el infrarrojo próximo.

Microscopio electrónico de transmisión

El análisis de la viabilidad celular y los cambios morfológicos ocurridos en los cultivos a lo largo de los experimentos han sido evaluados a través de fotografías de muestras de tinción negativa observadas a través de una técnica de microscopía electrónica de transmisión en un microscopio modelo JEOL JEM 1010, del Centro Nacional de Microscopía Electrónica, situado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. El equipo dispone de un voltaje de aceleración de 100 kV y un cañón de electrones termoiónico de B₆La. La resolución entre puntos es de 0,35 nm y la captación de imágenes se realiza con una cámara *megaview II*. La manipulación de las imágenes recogidas se realiza a través del software informático *Soft Imaging System*.

Viscosímetro

La medida de la viscosidad aparente de acuerdo con el modelo reológico de Ostwald-De Waele (ver ecuación (11)) se ha realizado en un viscosímetro de la marca BROOKFIELD®, modelo LTV SHYNCRO-LECTRIC, con un encamisado bañado con agua para mantener la temperatura constante de la muestra durante el análisis. La muestra líquida es introducida en un cilindro metálico que se fija a un pie en contacto con la camisa. En el interior del cilindro se suspende el usillo de medida (en todos los casos el número 18 de este equipo) que se hace girar a distintas velocidades conocidas para determinar la evolución de la tensión tangencial de la muestra.

2.2.3. Equipos auxiliares

Autoclave

La esterilización de todos los materiales y medios de reacción ha sido realizada en un autoclave de la marca JP SELECTA, modelo Presoclave II 80. El equipo tiene una capacidad de hasta 80 L y puede trabajar en un rango de temperaturas desde 80 a 134 °C y de 0,6 a 2 bar de presión.

Centrífuga

Este equipo es necesario para eliminar la biomasa del caldo de cultivo de las muestras recogidas, ya sea porque éstas van a ser posteriormente analizadas por cromatografía líquida o bien porque se requiera cuantificar el peso seco de la biomasa centrifugada para relacionarlo con las medidas de absorbancia que proporciona el espectrofotómetro de UV/visible. El equipo es de la marca SIGMA, modelo 4-16K. Dispone de dos rotores: uno de 6 espacios para botes de 250 mL, con una velocidad máxima de giro de 9.000 rpm; y otro de 30 espacios para tubos Eppendorf de 1,5 mL de volumen. Este último rotor puede girar a una velocidad máxima de 14.000 rpm. La centrífuga cuenta con un sistema de control de la temperatura, entre -20 y 70 °C.

Balanza de precisión

Para la formulación de los medios de cultivo se ha utilizado una balanza de precisión de la marca SARTORIUS, modelo Handy. La balanza puede medir hasta un máximo de 1.000 mg, con una precisión de $\pm 0,1$ mg.

Estufa de secado

El secado de la biomasa se ha realizado en una estufa de la marca SELECTA, modelo S-202. La temperatura se puede fijar entre 40 y 200 °C, con una precisión de $\pm 0,5$ °C.

Cámara de flujo laminar

La manipulación del biocatalizador asegurando condiciones de una atmósfera inerte para evitar su contaminación se logra trabajando en el interior de una cámara de flujo laminar de la marca TELSTAR, modelo MicroV/PCR. El equipo dispone de un motor capaz de impulsar el aire a 0,45 m/s hasta un filtro de aspiración y un filtro HEPA, que impiden la entrada de microorganismos al interior de la cámara. Como medida adicional, la cámara cuenta con una lámpara de ultravioleta en la parte superior.

Ultracongelador

El microorganismo concentrado en stocks se conserva en un congelador de ultra baja temperatura de la marca SANYO, modelo VIP, serie MDF U33V. La temperatura de operación para stocks microbianos es de -80 °C, aunque el equipo tiene un rango de operación entre -50 y -86 °C.

2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A continuación se describen brevemente los procedimientos experimentales llevados a cabo para la obtención de los resultados presentes en las Publicaciones de la presente Tesis Doctoral. Entre ellos, se han distinguido los protocolos de obtención y conservación del biocatalizador, el cultivo de células en biorreactor, los métodos de análisis para el seguimiento de la biomasa y la cuantificación de los metabolitos, la medida de las velocidades de transporte y consumo de oxígeno, los métodos de estimación del coeficiente volumétrico global de transferencia de materia, el protocolo de contaje de viables en placa y de tinción negativa para la obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

2.3.1. Protocolos de obtención y conservación del biocatalizador

Todos los biocatalizadores empleados en las Publicaciones que forman parte de la presente Memoria son recibidos en placa de Petri al laboratorio y transferidos a un medio líquido con asa de siembra donde son cultivados en incubadora orbital durante 12-14 horas hasta obtener un caldo altamente concentrado en biomasa. Esta etapa se lleva a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL de volumen, con 50 mL de medio de cultivo. Éste es diferente en función del biocatalizador empleado: para los sistemas de conversión de glicerol en 1,3-propanodiol o 2,3-butanodiol, este medio será el M92X, mientras que en el caso de *Pseudomonas putida*, el medio será LB líquido. Una vez transcurrida esta etapa de cultivo las células se separan del caldo por centrifugación (9.000 rpm, durante 5 min), se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en el medio de conservación (ver Tabla 7), empleando un volumen adecuado para la que la concentración de biomasa en el stock sea de unos 10 g/L. Éste se transfiere a tubos *Eppendorf* de 1,5 mL y se almacena en el congelador de ultra baja temperatura a -80 °C.

A partir de este stock congelado se desarrolla el protocolo de obtención del biocatalizador para los ensayos con células en crecimiento. Las etapas del mismo han sido previamente establecidas por el *Grupo de Investigación de Fisicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* y comprenden dos periodos de crecimiento del biocatalizador para asegurar que todas las células se encuentren en el mismo estado metabólico antes de comenzar los ensayos de crecimiento y producción en biorreactor. Estas dos etapas previas, reciben el nombre de preinóculo e inóculo, respectivamente. La duración y características de cada una en función del biocatalizador empleado se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Características de las etapas de obtención del biocatalizador para los experimentos con células en crecimiento.

Biocatalizador	Medio de cultivo	Duración preinóculo (h)	Duración inóculo (h)	Reactor
<i>Klebsiella oxytoca</i>	M92X	24	12	Botellas anaerobias de 20 mL (10 mL de medio)
<i>Shimwellia blattae</i>	M92X	4,5	8	Botellas anaerobias de 110 mL (90 mL de medio)
<i>Raoultella terrigena</i>	M92X	7	4	Matraces Erlenmeyer de 250 mL (50 mL de medio)
<i>Pseudomonas putida</i>	LB líquido	12	4,5	Matraces Erlenmeyer de 250 mL (50 mL de medio)

2.3.2. Cultivo de células en biorreactor

Para la realización de los experimentos con células en crecimiento en biorreactor es necesario primero llevar a cabo la esterilización de la cuba y los dispositivos que van a estar en contacto con el biocatalizador a lo largo del ensayo. En primer lugar se calibra el electrodo de pH en la estación de fermentación a la temperatura a la que va a realizarse el ensayo, poniéndolo en contacto con las dos disoluciones tampón descritas en el apartado 4.2.1. A continuación se llena la cuba con el medio de cultivo deseado, considerando el volumen final que quiere alcanzarse al añadir el inóculo y los co-sustratos que se esterilizan por separado para evitar reacciones no deseadas con el resto del medio a altas temperaturas. La cuba se sella con la tapa metálica y se introduce en el autoclave, donde va a permanecer a 121 °C durante 21 min.

Posteriormente se termostatiza el biorreactor a la temperatura deseada, se fija la velocidad de agitación (especificada en cada una de las Publicaciones que figuran en el anexo de la presente Memoria) y el caudal de aireación que se va a utilizar en el ensayo. Para que el sensor de oxígeno disuelto se polarice, es necesario que pase a través de él la corriente de aire durante un par de horas, después de lo cual se procede a su calibración considerando que el valor 0% se corresponde con electrodo desconectado y el 100% a la señal que éste recibe cuando pasa el aire a través de su membrana. En el caso de trabajar en condiciones anaerobias, una vez que la sonda de oxígeno haya sido calibrada, se hace pasar a través del biorreactor una corriente de nitrógeno hasta que la lectura de la presión parcial de oxígeno en el medio sea del 0%. A partir de ahí se puede optar por cerrar la entrada de gas al biorreactor, como ocurre con los experimentos realizados con *S. blattae*, o bien alimentar continuamente nitrógeno a lo largo del ensayo, como sucede cuando se utiliza *K. oxytoca*.

Seguidamente se añaden los co-sustratos necesarios para finalizar la formulación de los medios de cultivo (las sales de calcio, magnesio y el extracto de levadura en el caso del medio M92X; las sales de hierro, calcio, magnesio, el ácido glutámico y la silicona antiespumante en el caso del medio BSM) y se calibra el analizador de la corriente de salida de gases, haciendo pasar a través de él una corriente de aire durante 30 min.

El experimento comienza cuando se inocula el fermentador. La proporción de inóculo añadida depende de cada bioproceso estudiado y se realiza con jeringas estériles de 60 mL de volumen a través de la membrana de inoculación. En el caso de utilizar *K. oxytoca* como biocatalizador la proporción en volumen de inóculo añadido es del 10%, mientras que en *S. blattae* es del 13,5%. En ambas situaciones, la concentración inicial de biomasa es de 0,1 g/L. Si se trabaja con sistemas de tipo aerobio, esta proporción también es diferente, siendo del 12,5% en volumen para *R. terrigena* (0,25 g/L de biomasa inicial) y 6,7% para *P. putida* (0,1 g/L de biomasa inicial).

Durante cada ensayo se recogen muestras del caldo para cuantificar los metabolitos por cromatografía líquida de alta resolución y la concentración de biomasa por medidas espectrofotométricas, detallados en las Publicaciones recogidas en la presente Memoria. Simultáneamente, la estación donde opera el biorreactor recoge *on-line* los perfiles de oxígeno disuelto, agitación, pH, temperatura y composición del gas de salida, necesarios para la interpretación de los resultados obtenidos.

2.3.3. Métodos de análisis: seguimiento de la biomasa y la composición del caldo a lo largo de las transformaciones

La cuantificación de la concentración de biomasa en peso seco ha sido determinada a través de medidas espectrofotométricas, para lo cual es necesario realizar un calibrado para cada biocatalizador que relacione la absorbancia de una muestra de caldo con el peso seco de la biomasa que contiene. Para obtener la recta de calibrado se parte de un cultivo con alta densidad óptica, del cual se separan varias alícuotas teniendo en cuenta el volumen total de la suspensión. Tres de estas alícuotas se centrifugan a 9.000 rpm durante 5 min, se elimina el sobrenadante y se seca el pellet a 105 °C hasta alcanzar una pesada constante. Considerando el volumen de sobrenadante eliminado se puede calcular la concentración en peso seco de cada una de estas alícuotas.

Por otro lado, con el resto del caldo se realizan diluciones seriadas y se mide la absorbancia de cada una de ellas. Aplicando el correspondiente factor de dilución se pueden establecer un conjunto de pares de valores absorbancia-concentración de biomasa y se puede ajustar éstos mediante regresión lineal, siempre y cuando la absorbancia se sitúe entre 0,1 y 0,8, conforme a la Ley de Lambert-Beer. Las constantes de calibrado para cada uno de los biocatalizadores empleados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Pendiente de la recta de calibrado para determinar la concentración de biomasa por absorbancia para cada uno de los microorganismos empleados.

Microorganismo	Constante de calibrado
<i>Klebsiella oxytoca</i> NRRL-B199	0,895 ± 0,003
<i>Shimwellia blattae</i> ATCC 33430	0,403 ± 0,002
<i>Raoultella terrigena</i> CECT 4519	1,62 ± 0,02
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	0,533 ± 0,005
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	0,566 ± 0,007
<i>Pseudomonas putida</i> KTH2	0,591 ± 0,006
<i>Pseudomonas putida</i> KTH2 peSOX3	0,621 ± 0,01

La cuantificación de los metabolitos a lo largo de cada experimento ha sido realizada por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Cada una de ellas está descrita con detalle en las Publicaciones de la presente Memoria. Para relacionar el área de cada pico cromatográfico con la concentración del compuesto es necesario identificar primero el tiempo de retención de cada compuesto en la columna cromatográfica (t_R) y, posteriormente, realizar un calibrado a diferentes concentraciones de cada metabolito. De esta forma se puede establecer para cada compuesto una recta de calibrado que relaciona el área del pico del detector con la concentración del analito.

Las características del método de análisis para cada compuesto se resumen en la Tabla 14. Cabe destacar que para el bioproceso de síntesis de 2,3-butanodiol a partir de glicerol la columna utilizada no es capaz de separar las señales de los isómeros (2*R*, 3*R*) y (2*S*, 3*S*), de modo que el área de dicho pico se corresponde a la suma de los dos. Por otro lado, los picos cromatográficos del isómero meso y de la acetoína se eluyen solapadamente, de modo que esta última ha sido analizada también por el detector de Diodo de Array (DAD) a 270 nm. A partir de ahí es posible medir el área del pico en el detector de índice de refracción (RID) correspondiente a la acetoína y, por diferencia, obtener el área correspondiente al isómero *meso*-2,3-butanodiol.

Tabla 14. Características del método de análisis de los diferentes metabolitos por cromatografía líquida de alta resolución.

Compuesto	Detector	t_R (min)	Constante de la recta de calibrado ($\cdot 10^5$)
(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-2,3-BD	RID	20,2	$1,53 \pm 0,01$
(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-2,3-BD	RID	20,2	$1,53 \pm 0,01$
1,3-propanodiol	RID	19,2	$1,31 \pm 0,03$
Acetoína	RID	18,9	$3,59 \pm 0,02$
Acetoína	DAD	18,7	153 ± 4
Ácido (L) glutámico	DAD	22,1	$15,1 \pm 0,3$
Ácido acético	RID	16,2	$2,33 \pm 0,04$
Ácido láctico	RID	13,9	$1,68 \pm 0,01$
Ácido succínico	RID	13,1	$1,81 \pm 0,02$
Etanol	RID	22,5	$6,32 \pm 0,02$
Glicerol	RID	14,5	$1,61 \pm 0,03$
<i>meso</i> -2,3-BD	RID	19,5	$1,64 \pm 0,04$

2.3.4. Medida de las velocidades de transporte (OTR) y consumo de oxígeno (OUR)

La velocidad de transporte de oxígeno (OTR) en biorreactor ha sido determinada gracias a las medidas proporcionadas por el analizador de gases de la corriente de aire de salida, que permite conocer el cambio de composición que va experimentando ésta con respecto al oxígeno y al dióxido de carbono. Considerando que la composición del aire de entrada es constante y realizando el balance de materia en la fase gaseosa se puede determinar que la velocidad de transporte de oxígeno es la diferencia entre el caudal de entrada y de salida de este componente en el aire ($F_{O_2}^{IN} - F_{O_2}^{OUT}$) que atraviesa el medio de reacción, por unidad de volumen, de acuerdo con la ecuación (23):

$$OTR = \frac{F_{O_2}^{IN} - F_{O_2}^{OUT}}{V} \quad (23)$$

Aplicando la ecuación de los gases ideales a la expresión anterior y teniendo en cuenta la definición de OTR dada por la ecuación (7), se obtiene:

$$OTR = \frac{p \cdot \left(\frac{\%O_2^{IN} - \%O_2^{OUT}}{RT} \right)}{V} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (24)$$

donde “%O₂^{IN}” y “%O₂^{OUT}” son los porcentajes de oxígeno a la entrada y la salida (señal proporcionada por el analizador), “p” la presión ambiental y “V” el volumen de trabajo en el reactor.

Con los valores de OTR obtenidos por el procedimiento anterior y empleando el perfil de concentraciones de oxígeno disuelto que proporciona el electrodo de membrana acoplado al biorreactor, se puede aplicar directamente la ecuación (19) y determinar así el valor de OUR en cada momento.

2.3.5. Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia

El coeficiente global de transferencia de materia para los experimentos realizados en biorreactor ha sido estimado conforme al esquema presentado en la Figura 5. Los pasos llevados a cabo se desarrollan en profundidad en el Anexo que contiene las Publicaciones de la presente Memoria, y se esquematizan brevemente a continuación:

- 1) Determinar los parámetros geométricos del biorreactor, el comportamiento reológico del fluido (acorde con el modelo de Ostwald-De Waele) y recopilar el conjunto de condiciones de operación del sistema para cada experimento.
- 2) Aplicar los coeficientes “ α ” y “ β ” de la ecuación (18) para calcular la potencia consumida por el sistema.
- 3) Sustituir dicha potencia en la ecuación (17) para obtener la potencia disipada por el biorreactor, “ ϵ ”.
- 4) Introducir los parámetros reológicos del caldo y la potencia disipada en la ecuación (12). De esta manera se obtiene el coeficiente individual de transferencia de materia en la fase líquida, k_L .
- 5) Utilizar la ecuación (14) para calcular el *hold-up* del gas (Φ) para fluidos no viscosos y sustituirlo en la ecuación [15], obteniéndose así su valor corregido para líquidos viscosos (Φ_v).
- 6) Estimar el diámetro de burbuja (d_b) del gas a través de la ecuación (16).
- 7) Combinar Φ_v y d_b en la ecuación (13) para determinar finalmente el área de intercambio de materia (a).
- 8) Obtener el valor del coeficiente global de transferencia de materia como producto entre “ k_L ” y “a”.

2.3.6. Evaluación de la integridad celular por conteo de viables en placa y fotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En el presente epígrafe se describe la metodología experimental llevada a cabo para el conteo de viables en placa y la obtención de imágenes de los distintos biocatalizadores por una técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). En el primer caso se parte de una muestra líquida del biorreactor y se realizan diluciones seriadas en tubos de ensayo con suero salino hasta alcanzar aquélla que permita obtener un número de colonias por placa entre 30 y 300. Las placas contienen medio LB sólido y se siembran añadiendo 100 μ L de muestra diluida en cada una. Cada dilución escogida se siembra por triplicado repartiendo el líquido sobre el medio sólido con asa de siembra hasta que éste se seque. A continuación se introducen en incubadora 24 horas a 30 °C y se cuenta el número de colonias en cada placa. Conocido el factor de dilución se puede determinar la concentración de colonias viables que contiene el caldo original. Para comprobar que las diluciones se han realizado correctamente, se siembran tres distintas por cada muestra tomada del biorreactor.

El protocolo para la obtención de imágenes por microscopía electrónica de transmisión pasa por una tinción negativa de una muestra que contiene las células suspendidas con acetato de uranilo. Se parte de una muestra líquida tomada del biorreactor y se diluye entre 10 y 15 veces en suero salino para evitar que el número de individuos que aparezcan en las imágenes posteriores sea muy elevado. A continuación se toma una cuadrícula de *Parafilm* y se vierten sobre ella tres gotas de la suspensión con una pipeta *Pasteur*. Con la ayuda de unas pinzas de precisión, se coloca una rejilla de microscopía electrónica de 3 mm de diámetro encima de cada gota y se espera unos 45 segundos. Seguidamente se seca la rejilla levemente en papel de filtro y se coloca durante 30 segundos sobre una gota de acetato de uranilo, vigilando que ésta no esté expuesta a la luz para evitar que el tinte se oxide. Por último, se vuelve a secar la rejilla y se guarda en posición vertical en un rejillero, con capacidad para 50 muestras.

De esta forma se pueden obtener multitud de imágenes de cada una de las rejillas cuando éstas se vean al microscopio electrónico, pudiendo evaluar parámetros como la morfología, el tamaño celular y la viabilidad de los individuos.

2.4. MÉTODOS MATEMÁTICOS

En este apartado se describen brevemente los métodos de cálculo empleados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral para la propuesta de diferentes modelos cinéticos que permitan describir con precisión los resultados experimentales obtenidos en relación al crecimiento de la biomasa y la evolución de los diferentes sustratos carbonados y productos finales del metabolismo en los bioprocesos estudiados.

2.4.1. Modelización cinética del crecimiento microbiano y las velocidades de consumo de sustratos y producción de metabolitos

La determinación de las velocidades de reacción y los parámetros cinéticos que intervienen en las ecuaciones que describen la variación de las distintas concentraciones de los compuestos durante las transformaciones que se producen en los bioprocesos estudiados se ha aplicado el “*método de las velocidades de producción*” (García-Ochoa y Romero, 1993), que considera que la velocidad de síntesis o consumo de un compuesto determinado dentro de una red de reacciones es la suma de las velocidades de reacción en las que éste interviene (r_i) multiplicada por el coeficiente estequiométrico de dicho compuesto en cada una de ellas (v_{ij}), conforme a la ecuación (25). Si se consideran todos los compuestos de la red de reacciones se obtiene la matriz “R”, formada por el conjunto de velocidades de producción de la transformación, tal y como muestra la ecuación (26):

$$R_j = \sum_{i=1}^{NR} v_{ij} \cdot r_i \quad (j = 1, \dots, NC) \quad (25)$$

$$R = \vartheta \cdot r \quad (26)$$

El llamado “*método de las velocidades de reacción*”, desarrollado en trabajos previos, permite determinar los parámetros cinéticos de un modelo formado por una red de reacciones tratando cada ecuación cinética por separado (García-Ochoa y Romero, 1993; García-Ochoa y col., 1993). Esto es posible cuando la matriz de los coeficientes estequiométricos de la ecuación (26) es cuadrada y puede despejarse el vector de velocidades de reacción (r), de forma que se obtiene la ecuación (27):

$$r = \vartheta^{-1} \cdot R \quad (27)$$

La aplicación del método de las velocidades de reacción permite obtener valores discretos de esta variable para cada una de las reacciones consideradas en la red. A partir de un conjunto de éstos se puede proponer la ecuación cinética más adecuada para describir el comportamiento de la velocidad de reacción para cada una de las transformaciones de la red. En los dos métodos previamente descritos se puede realizar un tratamiento con datos diferenciales; es decir, con velocidades, o bien integrales; esto es, con concentraciones de las distintas especies químicas. En las Publicaciones adjuntas de la presente Memoria se emplean datos integrales, ya que contienen menos error que el método diferencial (García-Ochoa y col., 1993).

El método de las velocidades de reacción ha sido utilizado para la obtención de los valores iniciales de las ecuaciones cinéticas propuestas. A partir de ellos se ha aplicado el método de las velocidades de producción, necesario además para la simulación de los modelos cinéticos considerados, empleando Aspen Custom Modeler[®] como herramienta de cálculo. La integración de las ecuaciones diferenciales de los modelos cinéticos se ha realizado utilizando el método implícito de Euler, mientras que la estimación de los parámetros y el ajuste no lineal de los modelos a los datos experimentales se ha realizado con el algoritmo NL2SOL (non-linear least-squares solver), cuya función objetivo es minimizar la suma al cuadrado de los residuos (SCR), conforme a la ecuación (28):

$$SCR = \sum_{j=1}^{NR} (C_j^{exp} - C_j^{cal})^2 \quad (28)$$

La validación de los modelos y la bondad de los ajustes han sido evaluadas de acuerdo a una serie de criterios estadísticos, como la F de Fisher, que informa acerca del ajuste global teniendo en cuenta el número de grados de libertad y para un nivel determinado de confianza (95%, por defecto en Aspen Custom Modeler), la SCR, que incide sobre la calidad de simulación del modelo a los datos experimentales, el error cuadrático medio (ECM) y el porcentaje de variación explicado (%VE), ambos indicativos del grado de semejanza entre los datos de partida y la reproducción dada por el modelo. El valor de estos parámetros, así como las ecuaciones cinéticas utilizadas para cada modelo propuesto se desarrollan con detalle en el Anexo de la presente Memoria.

2.4.2. Diseño de experimentos a través de la metodología Taguchi

El llamado “*método de Taguchi*” se enmarca dentro del diseño de experimentos y permite determinar la influencia de los niveles de los factores seleccionados para el estudio con respecto a una serie de funciones objetivo. La metodología combina protocolos estadísticos e ingenieriles para optimizar los procesos de diseño y puesta en marcha a nivel industrial y se diferencia del diseño clásico de experimentos en la selección de las interacciones entre los factores de entrada (Taguchi, 2001). Mientras el diseño clásico considera todas las interacciones posibles en la matriz de experimentos, la metodología Taguchi trabaja con una pequeña proporción de las mismas, de manera que permite obtener la influencia de cada factor por separado sobre las funciones objetivo reduciendo considerablemente el número de experimentos a realizar.

Una vez seleccionados los factores y sus correspondientes niveles que se desean probar en el estudio, así como las funciones objetivo que se pretenden optimizar, la metodología utiliza un diseño ortogonal estandarizado para determinar la matriz experimental (con el nivel de cada factor en cada ensayo). A continuación se procede a la realización de los ensayos y al análisis de sus resultados. Este método define la señal de ruido (RSR) como el ratio entre la parte útil de la respuesta del sistema y el ruido de ésta (Taguchi, 2001). Este parámetro sirve para establecer la relación entre la sensibilidad y la variabilidad de la respuesta a los niveles de un factor. Para un caso en el que el resultado deseado de la función objetivo sea “*mayor es mejor*” (utilizado en el estudio que figura en la Publicación 1 de la presente Memoria), el valor de la RSR para un factor F al nivel N se obtiene aplicando la ecuación (29):

$$RSR_{F/N} = -10 \cdot \log_{10} \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right] \quad (29)$$

siendo “ y_i ” el valor de la función objetivo y “ n ” el número de repeticiones realizadas para cada experimento.

Representando para factor los valores de RSR para cada nivel con respecto al valor medio de la señal de ruido se puede determinar qué nivel de cada factor influye más en el valor de la función objetivo y, en consecuencia, seleccionar el más adecuado para mejorar los resultados del estudio.

Por último, una vez que se han seleccionado los niveles óptimos de cada factor se debe realizar un experimento de confirmación en dichas condiciones. Los resultados obtenidos deben proporcionar una mejora de las variables consideradas como funciones objetivo, con respecto a los extraídos de la matriz ortogonal de experimentos. La metodología Taguchi ha sido aplicada en la Publicación 1 que figura en el Anexo de la presente Tesis Doctoral, donde se describe y se pone en práctica detalladamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se resumen los resultados más relevantes obtenidos a lo largo de la realización de la presente Tesis Doctoral, agrupados en tres bioprocesos o sistemas distintos:

- Producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol: sus resultados se encuentran en las publicaciones 1, 2, 3 y 4.
- Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol: correspondiente a la publicación 5.
- Bio-desulfuración de dibenzotiofeno a 2-hidroxi-bifenilo con *Pseudomonas putida*: con resultados en las publicaciones 6 y 7.

En las publicaciones recogidas en esta Memoria, incluidas en el Anexo de este documento, se detallan los materiales y métodos experimentales, analíticos y matemáticos empleados, así como la totalidad de los resultados, conclusiones y nomenclatura, así como las referencias bibliográficas relevantes en cada caso. Las publicaciones son las siguientes:

Publicación 1:

Autores: Mateusz Wojtusik, Alberto Rodríguez, Vanessa Ripoll, Victoria E. Santos, José L. García y Félix García-Ochoa.

Título: 1,3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions.

Revista: *Biotechnology Reports* (2015), 6: 100-107.

Publicación 2:

Autores: Alberto Rodríguez, Mateusz Wojtusik, Vanessa Ripoll, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: 1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations.

Revista: *Bioresource Technology* (2016), 200: 830-837.

Publicación 3:

Autores: Alberto Rodríguez, Mateusz Wojtusik, Florina Masca, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: Kinetic modeling of 1,3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: Influence of the initial substrate concentration.

Revista: *Biochemical Engineering Journal* (2017), 117: 57-65.

Publicación 4:

Autores: Alberto Rodríguez, Victoria E. Santos, Emilio Gómez y Félix García-Ochoa.

Título: Influence of fluid dynamic conditions on 1,3-propanediol production from glycerol by *Shimwellia blattae*: Carbon flux and cell response.

Revista: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Aceptado en enero de 2017.

DOI: 10.1002/jctb.5200

Publicación 5:

Autores: Alberto Rodríguez, Vanessa Ripoll, Victoria E Santos, Emilio Gómez and Félix García-Ochoa.

Título: Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: Oxygen transfer and uptake rates.

Revista: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2016). Aceptado en diciembre de 2016. DOI: 10.1002/jctb.5120.

Publicación 6:

Autores: Sebastián Escobar, Alberto Rodríguez, Emilio Gómez, Almudena Alcón, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida*: Effects on growth rate and biodesulfurization capacity.

Revista: *Bioprocess and Biosystems Engineering* (2016), 39(4): 545-554.

Publicación 7:

Autores: Alberto Rodríguez, Sebastián Escobar, Emilio Gómez, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa.

Título: Behavior of the *Pseudomonas putida* strains growth under different agitation and oxygen supply conditions.

Revista: *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Enviado el 18 de febrero de 2017.

Código identificativo: BPBSE-17-0091.

3.1. PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL CON *Shimwellia blattae* ATCC 33430: CONDICIONES DE OPERACIÓN, INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE SUSTRATO Y DE LAS CONDICIONES FLUIDO-DINÁMICAS

En este primer bioproceso se han empleado dos microorganismos diferentes para sintetizar 1,3-propanodiol a partir de glicerol: *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 y *Shimwellia blattae* ATCC 33430. La primera publicación se corresponde con un estudio previo de las condiciones de operación y el cambio de escala a biorreactor con un microorganismo de tipo 2, mientras que las Publicaciones 2, 3 y 4 desarrollan el proceso con un microorganismo de tipo 1, estableciendo tanto las condiciones de operación como el modelo cinético con células en crecimiento, así como la influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre el metabolismo y la viabilidad celular.

Publicación 1

Este estudio preliminar tiene como objetivo establecer las condiciones de operación más adecuadas con células en crecimiento y la influencia del cambio de escala de botella anaerobia a biorreactor empleando *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 como biocatalizador, catalogado como un microorganismo con riesgo biológico de tipo 2; es decir, potencialmente patógeno. Para ello, se aplicó la metodología Taguchi sobre cuatro factores relacionados con el medio de cultivo en experimentos realizados en botellas anaerobias de 20 mL con 10 mL de líquido: la concentración inicial de glicerol (20, 40 y 80 g/L), la concentración de fosfatos (1,6, 3,1 y 6,2 g/L), la concentración de sales de magnesio (0,5, 1 y 2 mM) y la proporción másica de sodio-potasio (0,33, 1 y 3 g/g). Las funciones objetivo seleccionadas para determinar el nivel óptimo de cada factor fueron: la producción de biomasa, la productividad y la selectividad del producto de interés. Todo este primer bloque experimental se realizó en incubadora orbital a 30 °C y 210 rpm. Posteriormente, con los valores más adecuados de cada factor para la producción se estudió la velocidad de agitación y la temperatura del proceso en biorreactor.

Con respecto a la aplicación del método Taguchi, la combinación de factores que maximizó las funciones objetivo se consiguió con los siguientes valores: 40 g/L de glicerol inicial, 6,2 g/L de fosfatos, 1 mM de sales de magnesio y una relación de 1 g/g de sodio/potasio. El experimento de confirmación, realizado con esta combinación,

proporcionó una concentración máxima de biomasa de 1,29 g/L y una productividad de 0,29 g/g, la más alta de todo el estudio realizado en botellas anaerobias. En estas condiciones la selectividad hacia el 1,3-propanodiol es de 0,72 g/g.

A partir de estos resultados se estudió la velocidad de agitación en biorreactor, partiendo de un valor constante de 50 rpm, incrementándolo de ensayo a ensayo a 100, 150 y 210 rpm, respectivamente. Los resultados de estos experimentos fueron comparados con los obtenidos en incubadora orbital con botellas anaerobias a 210 rpm. El aumento de la agitación tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento del microorganismo y, por tanto, sobre la concentración final de producto, la productividad y la selectividad. A la luz de estas observaciones se diseñó una estrategia de agitación en rampa, de forma que la velocidad de agitación se mantuviera en 50 rpm durante las cinco primeras horas de cultivo, más tarde fuera incrementada a 75 rpm a lo largo de las tres horas siguientes y, por último, subirla de nuevo a 100 rpm hasta el final de la transformación. Los resultados obtenidos con esta estrategia mejoraron ligeramente los obtenidos en incubadora orbital: la concentración de producto alcanzada superó los 13 g/L, mientras que la productividad pasó de 0,31 a 0,33 g/g, en comparación con el ensayo en incubadora. Por otro lado, la selectividad hacia el 1,3-propanodiol se mantuvo constante.

Por último, y empleando la estrategia de agitación anterior, se estudió la temperatura del proceso entre 30 y 39 °C. La concentración máxima de biomasa, la concentración de producto, la selectividad y la productividad aumentaron al incrementarse la temperatura hasta los 37 °C, descendiendo drásticamente para el valor de 39 °C. Por tanto se concluyó que la temperatura más adecuada para el proceso es de 37 °C.

Publicación 2

Teniendo en cuenta los resultados de la publicación anterior, poco competitivos en términos de rendimiento y consumo de sustrato, y considerando también el peligro potencial que para el ser humano tiene emplear un biocatalizador de riesgo biológico 2, se optó por estudiar el proceso con *Shimwellia blattae* ATCC 33430, catalogado como microorganismo de tipo 1. En este primer estudio se determinaron diversas condiciones de operación (temperatura, pH inicial y estrategia de control del mismo, influencia del empleo de glicerol crudo como sustrato carbonado, velocidad de agitación y aporte de gases), en experimentos realizados en botellas anaerobias y biorreactor con células en crecimiento.

En primer lugar, se determinó que la temperatura más adecuada era de 37 °C, observándose una importante influencia del pH sobre el proceso, ya que cuando éste alcanzaba un valor próximo a 5,0 el proceso se detenía, permaneciendo casi el 50% del glicerol inicial sin consumir. Empezar el ensayo a un pH más alto del neutro mejora el consumo del sustrato carbonado, pero reduce la velocidad de producción de producto, de modo que fue preciso desarrollar una estrategia de control de esta variable en biorreactor.

Si el pH se deja evolucionar libremente desde 6,9 a 6,5 y se mantiene posteriormente constante en este último valor se logra maximizar el consumo de glicerina y la producción de 1,3-propanodiol hasta 12,5 g/L, con un rendimiento superior al 40 % y una productividad de 1,25 g/(L·h). El empleo de glicerol crudo no empeora los resultados anteriores, sino al contrario: su alto contenido en fosfatos permite concentrar más el caldo en el producto de interés y un agotamiento más rápido de la fuente de carbono.

Posteriormente, se estudió la influencia de la agitación y de la alimentación de gases en la productividad y el rendimiento del proceso. Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas en cuanto a la producción de 1,3-propanodiol a partir de 200 rpm, por lo que se seleccionó este valor como el más adecuado para la velocidad del agitador. El empleo de pequeños caudales de aire supone la desviación del flujo de carbono hacia la rama oxidativa de la ruta de los ácidos mixtos, mientras que el burbujeo continuo de nitrógeno no proporciona resultados significativamente mejores a los obtenidos cuando no se alimenta ningún gas en el biorreactor. En consecuencia, se concluyó que la mejor manera de operar en discontinuo en este sistema con células en crecimiento es sin alimentación de gases. El rendimiento obtenido es significativamente mejor que con el biocatalizador anterior (0,44 g/g frente a 0,33 g/g) y la productividad resulta competitiva con los valores reportados para otros microorganismos empleados en bibliografía, normalmente de tipo 2 en cuanto a la seguridad.

Publicación 3

Habiendo establecido las condiciones de operación en biorreactor para el proceso en discontinuo con células en crecimiento en la publicación anterior, en este trabajo se estudió la influencia de la concentración inicial de sustrato sobre el crecimiento y la producción de los diferentes metabolitos. Se probaron seis concentraciones distintas de

glicerol crudo (entre 20 y 65 g/L) y se formuló un modelo cinético capaz de reproducir la evolución de las distintas especies químicas que forman parte de la transformación.

El aumento de concentración inicial de glicerol supuso un descenso en la velocidad de crecimiento de la biomasa y un desplazamiento del flujo de carbono hacia la producción de 1,3-propanodiol y, minoritariamente, hacia la síntesis de ácido acético y ácido succínico. Sin embargo, a partir de 57,8 g/L de sustrato inicial el rendimiento y la selectividad hacia el producto de inicial disminuyen drásticamente, así como el crecimiento microbiano; mientras que el flujo de carbono se desplaza hacia la síntesis de ácido láctico y etanol. En estas condiciones se observa, por tanto, una inhibición del proceso debida a concentraciones altas de glicerol.

Utilizando el programa informático Aspen Custom Modeler se construyó un modelo cinético para describir la evolución de la biomasa, el 1,3-propanodiol, el dióxido de carbono y el resto de subproductos, agrupados mediante una técnica de *lumping* en todas las condiciones estudiadas. Para la velocidad de crecimiento de la biomasa se empleó la ecuación logística de crecimiento, mientras que para el resto de especies se utilizaron ecuaciones diferenciales dependientes de las concentraciones de sustrato y biomasa. Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos reflejan el efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre el comportamiento del sistema y el modelo es capaz de describir fielmente la evolución de las especies químicas anteriormente mencionadas para todas las concentraciones iniciales de glicerol que componen el estudio; es decir, un modelo cinético capaz de describir la evolución del sistema en seis experimentos diferentes, realizados en condiciones diversas, lo que es extraordinario en la literatura sobre modelos cinéticos de bioprocesos microbianos.

La validación del modelo se realizó también a través de diversos parámetros estadísticos como el test F de Fisher, la suma de residuos al cuadrado, el error cuadrático medio y el porcentaje de variación explicado.

Publicación 4

Esta publicación trata del estudio de la influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre la síntesis de 1,3-propanodiol a partir de glicerol empleando *Shimwellia blattae* como biocatalizador. El punto de partida recoge las aportaciones más relevantes de las publicaciones 2 y 3 (condiciones de operación en discontinuo, modelo

cinético del proceso e influencia del sustrato inicial) y, en este caso, la modificación de las condiciones fluido-dinámicas se produce mediante cambios en la velocidad de agitación. En el estudio se probaron ocho agitaciones distintas, entre 100 y 1000 rpm, y se evaluó la respuesta del sistema en tres aspectos fundamentales: la velocidad de crecimiento, la distribución del flujo de carbono y la viabilidad e integridad celular. La descripción de los resultados experimentales se apoyó en la obtención de los parámetros cinéticos del modelo de la publicación 3 para cada agitación, siendo la reproducción de los resultados experimentales excelente de nuevo.

Si la velocidad de agitación se incrementa de 100 a 500 rpm, se observa un aumento de las velocidades de crecimiento y de producción de 1,3-propanodiol, así como un ligero incremento de la concentración de subproductos. Entre 600 y 800 rpm los resultados observados no difieren mucho de los anteriores, mientras que en las condiciones de agitación más agresivas, a 1000 rpm, se observó un descenso del crecimiento de la biomasa debido a estrés hidrodinámico.

Para apoyar las observaciones anteriores, se cuantificó la concentración de biomasa por conteo de viables en placa y se obtuvieron imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), para evaluar la integridad celular. Entre 200 y 500 rpm el número de colonias viables evoluciona prácticamente de forma idéntica, al igual que en los casos de 100, 800 y 1000 rpm, aunque en estos tres últimos casos el aumento es mucho más pequeño. La evolución de las colonias en el experimento realizado con una velocidad de agitación de 600 rpm presenta un comportamiento intermedio entre los dos anteriores. Las imágenes TEM mostraron un cambio morfológico de las células a lo largo del cultivo a partir de 600 rpm, cuando su integridad se ve comprometida por estrés hidrodinámico. Las células sometidas a agitaciones entre 600 y 1000 rpm redujeron su tamaño a lo largo del experimento y crecieron agrupadas entre sí o formando pequeñas cadenas de hasta diez individuos. Estos resultados muestran la presencia de fenómenos de estrés celular por modificaciones en las condiciones fluido-dinámicas y la capacidad del biocatalizador de adaptarse a las mismas a lo largo del tiempo.

3.2. PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL CON *Raoultella terrigena* CECT 4519: EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE LAS VELOCIDADES DE TRANSPORTE Y CONSUMO DE OXÍGENO

El trabajo realizado con este bioproceso parte de la investigación realizada por (Ripoll, 2016) en su Tesis Doctoral con el biocatalizador *Raoultella terrigena* CECT 4519 en biorreactor. En este caso el planteamiento es ligeramente diferente al caso de un sistema anaerobio, ya que la influencia de las la influencia de las velocidades de transporte y consumo de oxígeno (OTR y OUR, respectivamente) deben ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar la respuesta del cultivo a los cambios en las condiciones fluido-dinámicas debidos a la velocidad de agitación. El contenido de este estudio se encuentra en la Publicación 5 del Anexo de la presente Memoria.

Publicación 5

Esta publicación estudia la influencia de las velocidades de transporte y consumo de oxígeno sobre el proceso, modificando las condiciones fluido-dinámicas por efecto de la agitación en experimentos realizados en biorreactor entre 100 y 2000 rpm. En todos ellos se cuantificaron las concentraciones de biomasa y metabolitos de la ruta, así como la evolución del oxígeno disuelto en el caldo y las velocidades de transporte y consumo de oxígeno. Además, se midió la viscosidad de los cultivos para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en cada uno de ellos y evaluar así el efecto del estrés oxidativo sobre el cultivo celular y establecer, por último, la etapa controlante del proceso en función de la velocidad de agitación, la transferencia de oxígeno o el consumo por la red de reacciones bioquímicas.

Los resultados obtenidos muestran que el cultivo evoluciona bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto entre 100 y 400 rpm, incrementándose en estos casos las velocidades de crecimiento y de consumo de sustrato cuando aumenta la velocidad de agitación. Paralelamente, en esta región fluido-dinámica el flujo de carbono se desplazó desde productos relacionados con la fermentación (etanol y lactato, fundamentalmente), hacia la producción de dioles (2,3-butanodiol y acetoína). Si se sigue incrementando la agitación todo el sustrato es dirigido hacia el crecimiento, maximizándose la velocidad de crecimiento y de producción de dióxido de carbono, mientras que la concentración del

resto de metabolitos fue prácticamente indetectable. Entre 700 y 1600 rpm, se obtuvo el valor máximo de OTR del estudio, al tiempo que los perfiles de concentración de biomasa fueron prácticamente coincidentes en este intervalo de velocidades de agitación. Simultáneamente, la viscosidad del caldo aumenta de manera exponencial a lo largo de estos experimentos, influyendo negativamente en el valor del coeficiente de transporte de materia (k_{La}) y, por tanto, en OTR.

Entre 1600 y 2000 rpm, se observó un ligero descenso de la velocidad de crecimiento, así como una importante reducción de la producción de dióxido de carbono. Estos dos fenómenos, unidos a un valor observado de OTR máximo muy inferior al tramo anterior, que no puede ser debido al aumento de la viscosidad ya descrito, sino que tiene que ser interpretados como síntomas de estrés celular, de tipo hidrodinámico (debido a la agitación) y oxidativo (debido a la presencia de especies reactivas del oxígeno). Esta interpretación fue reforzada evaluando la evolución del número de colonias viables del biocatalizador a distintas velocidades de agitación.

Es destacable que en este trabajo se pone claramente de manifiesto la potencialidad del oxígeno (de su velocidad de transporte y, por tanto, de consumo) para cambiar drásticamente la distribución de productos obtenida al cambiar el flujo metabólico.

3.3. CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Pseudomonas putida* EN MEDIO DE CULTIVO PARA BIO-DESULFURACIÓN: RESPUESTA MICROBIANA A LAS VARIACIONES DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE OXÍGENO

Este tercer bioproceso comprende el trabajo realizado con varias cepas de *Pseudomonas putida* en ensayos con células en crecimiento y en estado de *resting cells* para la bio-desulfuración de DBT a 2-HBP. Como estudio previo se analizó el efecto de los cambios en la velocidad de agitación sobre la capacidad desulfurante y el crecimiento de la cepa KTH2 peSOX3, mostrado en la Publicación 6. A la vista de los resultados obtenidos se diseñó un segundo bloque experimental empleando las cepas KTH2, precursora de la KTH2 peSOX3, KT2442 y KT2440, estas dos últimas de tipo *wild-type*, escogidas por ser aquéllas a partir de las cuales se desarrolló la cepa KTH2, modificada genéticamente. Los

resultados comparativos de la influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre el crecimiento de estas cuatro cepas figuran en la Publicación 7.

Publicación 6

Se trata del primer trabajo del bioproceso de bio-desulfuración de DBT a 2-HBP con *Pseudomonas putida*. En este estudio previo se evaluó los efectos de la modificación de las condiciones fluido-dinámicas sobre la velocidad de crecimiento y la capacidad desulfurante de la cepa KTH2 peSOX3 en experimentos realizados en biorreactor. Para ello, se han cuantificado las concentraciones de biomasa, oxígeno disuelto y los dos sustratos carbonados del medio BSM y se midió la actividad enzimática intracelular del microorganismo, así como las concentraciones de DBT y 2-HBP a lo largo del tiempo a diferentes velocidades de agitación. Por otro lado, se estimaron las velocidades de consumo de oxígeno y el coeficiente volumétrico de transferencia de materia para evaluar la etapa controlante del proceso (transporte ó consumo de oxígeno) bajo distintas condiciones fluido-dinámicas.

Con respecto a la velocidad de crecimiento, se observó que se incrementa con la agitación entre 400 y 700 rpm y posteriormente se mantiene prácticamente invariable en todo el estudio hasta 2000 rpm, independientemente de la velocidad de transporte de oxígeno y la tensión tangencial aplicadas. Estos resultados reflejan la robustez del biocatalizador ante condiciones de agitación muy agresivas. Los sustratos carbonados, ácido glutámico y glicerol, se consumen más rápidamente cuando aumenta la agitación, aunque sus perfiles de concentración se superponen a partir de 800 rpm. En cuanto al oxígeno disuelto, el cultivo evoluciona bajo condiciones de limitación de transporte entre 400 y 500 rpm. Si la agitación es mayor, el biocatalizador no es capaz de consumir el oxígeno disponible a la misma velocidad a la que éste es transferido al caldo, y, por lo tanto, la etapa controlante del proceso es la velocidad de consumo de oxígeno, OUR.

El oxígeno disponible juega un papel clave en la actividad enzimática de la ruta 4S: un aumento de la velocidad de agitación entre 100 y 300 rpm mejora la capacidad desulfurante de las células en estado de *resting cells*, mientras que si las condiciones fluido-dinámicas son más severas, la actividad de las monooxigenasas DszA y DszC se reduce drásticamente. En el caso de la enzima DszB, su máxima actividad se alcanzó a 100 rpm, disminuyendo paulatinamente si la velocidad de agitación es superior.

Publicación 7

La última Publicación con *Pseudomonas putida* profundiza los resultados obtenidos en el trabajo previo, comparando el crecimiento de cuatro cepas diferentes, dos de tipo *wild-type* o nativas (KT2440 y KT2442) y dos individuos modificados genéticamente (KTH2 y KTH2 peSOX3), bajo diferentes condiciones de agitación y, por tanto, variando la velocidad de transporte de oxígeno. En este trabajo se cuantifican una serie de variables clave en el crecimiento, tanto las concentraciones de biomasa y oxígeno disuelto, como las velocidades de transporte y consumo de oxígeno. Además, el crecimiento celular se ha evaluado también mediante contaje de viables en placa. Complementariamente, se han realizado fotografías empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa con acetato de uranilo y se han propuesto varios modelos cinéticos para describir la evolución de la concentración de biomasa en todas las condiciones experimentales estudiadas.

Los resultados obtenidos muestran un comportamiento anómalo de las curvas de crecimiento en las cepas modificadas bajo condiciones de bajo aporte de oxígeno (entre 100 y 400 rpm), mientras que las cepas nativas presentan una evolución sigmoideal, típica en la mayor parte de los bioprocesos. Estas observaciones obligan a proponer un modelo de crecimiento para estas condiciones diferente al de la ecuación logística que, por el contrario, si es capaz de describir fielmente el crecimiento en las cepas KT2440 y KT2442 en todo el rango de agitaciones estudiado. Por ello, para las cepas KTH2 y KTH2 peSOX3 se ha propuesto un modelo dependiente de la concentración de oxígeno a baja agitación, cuyo ajuste proporciona una buena reproducción de los perfiles de concentración de biomasa en las condiciones anteriormente mencionadas.

Las observaciones previas han sido corroboradas en el contaje de viables en placa, y las imágenes TEM muestran la presencia de vesículas extracelulares en los cultivos de la cepa KTH2 a baja agitación, como respuesta al estrés oxidativo generado por la acción de la enzima hpaC, que libera peróxido de hidrógeno al medio tras ejercer su acción catalítica. Esta respuesta explica el comportamiento anómalo de las cepas modificadas genéticamente bajo condiciones de bajo aporte de oxígeno y revela la capacidad de ambas de adaptarse a la disponibilidad de este nutriente, desviando el flujo de carbono hacia el crecimiento cuando la agitación es superior a 400 rpm.

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se recogen en las publicaciones presentadas en el Anexo de este documento y permiten extraer una serie de conclusiones para cada uno de los bioprocesos estudiados. En este apartado se recogen las más relevantes.

Producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol

1. Selección del biocatalizador

- a) El empleo de un biocatalizador de tipo 2 como es *Klebisella oxytoca* NRRL-B199 no proporciona resultados competitivos con otros microorganismos utilizados en bibliografía, incluso cuando se trabaja en las mejores condiciones de operación seleccionadas para variables como la temperatura, la concentración inicial de glicerol, la proporción sodio/potasio, la concentración de fosfatos y la estrategia de control de la velocidad de agitación. Con las mejores condiciones alcanzadas se logran reproducir los mejores resultados alcanzados en incubadora orbital, pero se requiere la necesidad de usar otro microorganismo como biocatalizador, especialmente si éste es de tipo 1; es decir, no patógeno para el ser humano.
- b) *Shimwellia blattae* ATCC 33430 es un microorganismo no patógeno, nunca antes probado como biocatalizador en este bioproceso, cuyo uso ha proporcionado resultados muy prometedores en la producción de 1,3-propanodiol, especialmente en términos de productividad y utilización de glicerol crudo como sustrato carbonado. Estas observaciones han resultado determinantes para su selección como microorganismo productor del citado compuesto de interés.

2. Condiciones de operación

- a) El pH es una variable fundamental, incluso la más importante a la hora de alcanzar resultados competitivos en relación con la producción de 1,3-propanodiol en discontinuo con células en crecimiento. El cultivo requiere de una estrategia que, en un primer momento, deje evolucionar libremente esta variable desde un valor de 6,9 hasta otro de 6,5. De esta manera se logra maximizar la velocidad de crecimiento del biocatalizador y, en consecuencia, la de síntesis del producto de interés. Posteriormente, es necesario controlar esta variable en un valor de 6,5 para impedir que la transformación se frene por efecto de un pH ácido.

- b) El biocatalizador seleccionado es capaz de emplear glicerol crudo como sustrato carbonado, incluso con una velocidad de consumo ligeramente superior a cuando se emplea glicerina pura. Este hecho convierte a *Shimwellia blattae* ATCC 33430 en un microorganismo muy interesante desde el punto de vista de las biorrefinerías, ya que en un futuro cambio de escala del proceso podría implantarse un sistema de reutilización de la glicerina cruda procedente del biodiesel que utilizara esta bacteria como microorganismo productor.

3. Influencia de la concentración inicial de sustrato y modelo cinético

- a) El aumento de la concentración inicial de glicerol crudo bajo las condiciones anteriormente mencionadas influye negativamente en la síntesis de 1,3-propanodiol y la velocidad de crecimiento del microorganismo cuando la cantidad inicial de sustrato supera los 40 g/L. Esto hace que la concentración más adecuada para trabajar en discontinuo con células en crecimiento sea en torno a 30 g/L. Cuando se ven afectadas las variables anteriores el flujo de carbono se desplaza hacia la producción de etanol y ácido láctico, reduciendo el rendimiento y la productividad hacia el 1,3-propanodiol.
- b) La estrategia seguida para la formulación del modelo cinético, basada en la agrupación de los sub-productos en una sola especie química mediante “*lumping*” de compuestos y el cierre del balance de materia considerando el dióxido de carbono (CO₂), permite reproducir fielmente los resultados experimentales para las seis concentraciones iniciales de glicerol estudiadas mediante un conjunto de ecuaciones diferenciales que describen la velocidad de producción de 1,3-propanodiol (PDO), sub-productos (BP) y CO₂ y la ecuación logística de crecimiento, empleada para describir la evolución de la concentración de biomasa (X). La velocidad de consumo de glicerol (G) se ha considerado como una combinación lineal de las velocidades de producción anteriores. El modelo cinético propuesto está definido por las siguientes ecuaciones diferenciales. Los valores de los parámetros se recogen en las publicaciones 3 y 4 del Anexo de la presente Tesis Doctoral.

$$r_1 = \frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{max}}\right)$$

$$r_2 = \frac{dC_{PDO}}{dt} = \frac{K_{1,PDO} \cdot C_G \cdot C_X}{1 + K_{2,PDO} \cdot C_G}$$

$$r_3 = \frac{dC_{BP}}{dt} = \frac{K_{1,BP} \cdot C_G \cdot C_X}{1 + K_{2,BP} \cdot C_G}$$

$$r_4 = \frac{dC_{CO_2}}{dt} = K_M \cdot C_G \cdot C_X$$

$$\frac{dC_G}{dt} = -\vartheta_{G/X} \cdot r_1 - \vartheta_{G/PDO} \cdot r_2 - \vartheta_{G/BP} \cdot r_3 - \vartheta_{G/CO_2} \cdot r_4$$

4. Influencia de las condiciones fluido-dinámicas sobre el proceso

- a) El modelo cinético descrito por las ecuaciones diferenciales anteriormente mencionadas es capaz de reproducir el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones fluido-dinámicas (agitaciones entre 100 y 1000 rpm), a través de un conjunto de parámetros cinéticos definidos para cada una de ellas. Sus valores se muestran en la publicación 3 del Anexo de la presente Memoria.
- b) El aumento de la velocidad de agitación del biorreactor desde 100 a 200 rpm influye positivamente en las velocidades de crecimiento y producción de 1,3-propanodiol, tal y como reflejan los parámetros del modelo cinético propuesto, obtenidos bajo dichas condiciones fluido-dinámicas.
- c) El cultivo es capaz de adaptarse a condiciones fluido-dinámicas más severas, entre 300 y 500 rpm, manteniendo prácticamente constantes las velocidades anteriores, así como la de formación de sub-productos. El conteo de viables en placa corrobora estas observaciones y las imágenes del biocatalizador adquiridas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) indican que las células conservan su tamaño en este rango de velocidades de agitación.
- d) Si la velocidad de agitación es superior a 600 rpm, los efectos derivados del estrés hidrodinámico provocan una disminución de la velocidad de crecimiento del microorganismo, medida tanto en peso seco de biomasa como en unidades formadoras de colonias. Por otro lado, bajo estas condiciones, las células ven comprometidas su morfología y su integridad, observándose fragmentos de pared bacteriana en las imágenes TEM y una disminución de casi el 25% del tamaño inicial de las células. El cultivo se adapta a estas condiciones agresivas creciendo de forma agregada y formando cadenas de entre 8 y 10 individuos.

Producción de 2,3 butanodiol a partir de glicerol con *Raoultella terrigena* CECT 4519

5. *Influencia de la disponibilidad de oxígeno sobre el flujo de carbono*

- a) La disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, que depende de las velocidades de transporte (OTR) y consumo de oxígeno (OUR), es la variable más importante de este bioproceso, ya que condiciona tanto el crecimiento como la producción de los diferentes metabolitos de la ruta de los ácidos mixtos.
- b) Bajo condiciones de limitación de transporte de oxígeno (experimentos realizados con agitaciones entre 100 y 400 rpm), el flujo de carbono se dirige hacia la síntesis de productos de fermentación, como el etanol o el ácido láctico. Si en estas condiciones se aumenta OTR hasta un valor correspondiente a una agitación de 400 rpm, el flujo de carbono se desplaza hacia la producción de 2,3-butanodiol y acetoína, junto con un importante aumento de la concentración de biomasa y, por tanto, de la velocidad de crecimiento.
- c) Si la velocidad de agitación es superior a 550 rpm, se alcanza un valor máximo de la velocidad de crecimiento y todo el carbono que se consume a partir del glicerol se dirige hacia el crecimiento microbiano y, en consecuencia, la producción de dióxido de carbono. El resto de metabolitos de la ruta dejan de sintetizarse o no son detectables por el método de análisis empleado.

6. *Influencia de la velocidad de agitación y las condiciones fluido-dinámicas sobre la viabilidad e integridad celular: estrés hidrodinámico y oxidativo*

- a) En los experimentos realizados a una velocidad de agitación entre 700 y 1600 rpm el biocatalizador mantiene sus máximos valores de velocidad de crecimiento y concentración de biomasa en la fase estacionaria. En dicho intervalo se detecta un nivel de exceso de oxígeno disuelto en el medio, siendo la OTR potencial muy superior a OUR durante todos los experimentos. La respuesta microbiana ante este exceso de oxígeno disuelto y al aumento de la agitación es un aumento exponencial de la viscosidad del caldo mediante la secreción de exopolisacáridos que protegen el entorno celular de unas condiciones externas agresivas.
- b) Bajo condiciones fluido-dinámicas extremas, velocidades de agitación superiores a 1600 rpm, se observa un ligero descenso en la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa en la fase estacionaria, unido a una clara disminución del

dióxido de carbono acumulado a lo largo del experimento. El contaje de viables en placa demuestra que, bajo esas condiciones, se compromete la viabilidad celular, sobre todo a partir de las 18 horas de cultivo, donde su concentración desciende pronunciadamente hasta alcanzar valores similares a los obtenidos bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto.

- c) El estrés oxidativo e hidrodinámico se producen simultáneamente en este bioproceso por aumento de la agitación cuando ésta supera las 550 rpm, ya que se han podido observar respuestas asociadas a ambos fenómenos y descritas con anterioridad en otros sistemas, como la secreción de exopolisacáridos como respuesta a un exceso de especies reactivas del oxígeno (vinculadas por tanto a un estrés oxidativo) o la alteración de la viabilidad celular a altas agitaciones debida a la tensión tangencial ejercida por el movimiento del fluido sobre el biocatalizador, característica de un estrés de tipo hidrodinámico.
- d) Las alteraciones de la viscosidad del caldo descritas anteriormente afectan negativamente al valor del coeficiente volumétrico global de transferencia de materia ($k_L a$), de modo que su valor desciende exponencialmente con el tiempo en los experimentos llevados a cabo entre 700 y 2000 rpm. Este hecho supone un valor de OTR menor del esperado teóricamente, de modo que la eficiencia del transporte de materia se ve reducida con el aumento de la viscosidad, lo que no es muy habitual en sistemas de tipo aerobio.

Crecimiento de cepas de *Pseudomonas putida*

7. Efecto de la agitación sobre el crecimiento y la capacidad desulfurante de Pseudomonas putida KTH2 peSOX3 en medio BSM

- a) El crecimiento de este microorganismo modificado genéticamente (GMO) se ve favorecido al aumentar la velocidad de agitación hasta 700 rpm. A partir de este valor, el biocatalizador mantiene su velocidad de crecimiento en su valor máximo, siendo capaz de mantener su capacidad de división celular hasta 2000 rpm, a pesar de la modificación de las condiciones fluido-dinámicas y de disponibilidad de oxígeno.
- b) La capacidad desulfurante del biocatalizador es máxima cuando las células son cultivadas a una agitación de 100 rpm y desciende bruscamente si el cultivo se

realiza a partir de 300 rpm. La actividad máxima de las enzimas de la ruta 4S depende férreamente de la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio: la enzima DszB alcanza su máxima actividad cuando el crecimiento celular se realiza a 100 rpm, mientras que la de las enzimas DszA y DszC se logra cultivando con una velocidad de agitación de 300 rpm.

- c) El crecimiento de la cepa KTH2 peSOX3 cuando la disponibilidad de oxígeno es baja (experimentos realizados empleando entre 100 y 300 rpm como velocidad de agitación) tiene un comportamiento anómalo con respecto a otras condiciones de cultivo y otros casos de crecimiento de microorganismos aerobios.

8. Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de las cepas *Pseudomonas putida* KT2440, KT2442, KTH2 y KTH2 peSOX3 en medio BSM

- a) El comportamiento de la cepa KTH2 bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno es prácticamente idéntico al de la cepa KTH2 peSOX3. Estas observaciones se derivan de la expresión de los genes de la enzima HpaC, que libera peróxido de hidrógeno al medio al ejercer su acción catalítica e induce un estrés oxidativo debido a la presencia de una alta concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS).
- b) Las imágenes TEM de las células de *Pseudomonas putida* KTH2 sometidas a condiciones de baja disponibilidad de oxígeno demuestran la aparición de vesículas extracelulares como respuesta a una condición de estrés oxidativo, debida a la presencia de peróxido de hidrógeno en el caldo de cultivo. Estas estructuras no se observan en los experimentos realizados a velocidades de agitación superiores.
- c) El crecimiento de las cepas KT2440 y KT2442 bajo las condiciones anteriores presenta un comportamiento sigmoideal, como en la mayor parte de los bioprocesos que emplean microorganismos completos. Este hecho se ha comprobado tanto mediante medidas de la densidad óptica como por contaje de viables en placa.
- d) En los experimentos realizados empleando entre 400 y 600 rpm de agitación, las cepas modificadas genéticamente (KTH2 y KTH2 peSOX3) presentan un crecimiento algo más rápido que el de las cepas naturales (*wild type*) en el mismo intervalo de condiciones, aunque el comportamiento es intermedio entre una evolución hiperbólica y sigmoideal.

- e) A partir de una velocidad de agitación de 600 rpm, las cuatro cepas estudiadas crecen de forma sigmoïdal, siendo ligeramente superior la concentración en la fase estacionaria en las cepas GMO: KTH2 y KTH2 peSOX3. Por tanto, las cepas modificadas genéticamente son capaces de sobreponerse al estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno a bajas agitaciones y alcanzar una concentración de biomasa superior a la de los microorganismos no modificados o *wild type*. Este fenómeno ha sido comprobado también por contaje de viables en placa.

9. Efecto de las velocidades de transporte y consumo de oxígeno en el metabolismo de las cepas KT2440, KT2442, KTH2 y KTH2 peSOX3

- a) Bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, los GMO presentan velocidades de transporte y consumo de oxígeno inferiores a las de las cepas no modificadas, KT2440 y KT2442, debido al estrés oxidativo que frena su crecimiento.
- b) A partir de 400 rpm, el transporte y consumo de O₂ en los GMO se dispara en relación con las condiciones fluido-dinámicas anteriores, siendo superior al de las cepas *wild type*. Este fenómeno se debe al incremento de las velocidades de crecimiento en las cepas GMO, mayor que el alcanzado con KT2440 y KT2442, cepas *wild type*.
- c) En los experimentos con las agitaciones más altas, en los que se alcanza las mayores velocidades de transporte y consumo de oxígeno, las diferencias entre las cepas GMO y las *wild-type* son cada vez mayores, especialmente en el caso de la cepa KTH2, que alcanza valores de OUR casi tres veces superiores al del resto de microorganismos empleados en este estudio.

Conclusiones generales

10. Estrés hidrodinámico y estrés oxidativo

En la presente Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que existen, al menos, los dos tipos de estrés citados. Se ha establecido una metodología que permite identificar y analizar ambos fenómenos, estrés hidrodinámico y oxidativo en cultivos aerobios con células en crecimiento. Esta metodología incluye el empleo de diversas técnicas analíticas de medición y seguimiento de las variables relacionadas con el crecimiento, la viabilidad celular y las propiedades físicas del caldo de cultivo, a veces cambiando con el progreso del proceso.

11. El papel del oxígeno

Así mismo, se ha puesto claramente de manifiesto que, en cultivos aerobios, el oxígeno es un nutriente esencial, cuya disponibilidad en el medio de cultivo condiciona no solo la velocidad del proceso, sino también el flujo metabólico del carbono y de otros nutrientes. Es decir, se afecta la velocidad y la distribución de productos, algo similar a la influencia de la temperatura en procesos químicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abrardi, V., Rover, G., Sicardi S., Baldi G. y R., C. (1988). Sparged vessels agitated by multiple turbines. *Proceedings of the European Conference on Mixing* **6**: 329-336.
- Alcón, A., Martín, A. B., Santos, V. E., Gómez, E. y García-Ochoa, F. (2008). Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT 5279. *Biochemical Engineering Journal* **39**(3): 486-495.
- Alcón, A., Santos, V. E., Martín, A. B., Yustos, P. y García-Ochoa, F. (2005). Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochemical Engineering Journal* **26**(2-3): 168-175.
- Anitha, M., Kamarudin, S. K. y Kofli, N. T. (2016). The potential of glycerol as a value-added commodity. *Chemical Engineering Journal* **295**: 119-130.
- Aransiola, E. F. (2013). Lipase catalysed ethanolysis of jatropha oil for biodiesel production. *Energy and Environment Research* **3**: 180-189.
- Ayoub, M. y Abdullah, A. Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**(5): 2671-2686.
- Babich, I. V. y Moulijn, J. A. (2003). Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review☆. *Fuel* **82**(6): 607-631.
- Bandaipheth, C. y Prasertsan, P. (2006). Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers* **66**(2): 216-228.
- Ben Amor, K., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F. M., Akkermans, A. D. L., De Vos, W. M. y Abee, T. (2002). Multiparametric Flow Cytometry and Cell Sorting for the Assessment of Viable, Injured, and Dead Bifidobacterium Cells during Bile Salt Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5209-5216.
- Bernat, K., Kulikowska, D. y Żuchniewski, K. (2015). Glycerine as a carbon source in nitrite removal and sludge production. *Chemical Engineering Journal* **267**: 324-331.
- Bhavaraju, S. M., Russell, T. W. F. y Blanch, H. W. (1978). The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *American Institute of Chemical Engineers Journal* **24**: 454-466.
- Biocomb. (2015) European Biotech Stock Market Monitor. Germany, *BIOCOMB AG*.

Boswell, C. D., Nienow, A. W., Gill, N. K., Kocharunchitt, S. y Hewitt, C. J. (2003). The Impact of Fluid Mechanical Stress on *Saccharomyces Cerevisiae* Cells During Continuous Cultivation in an Agitated, Aerated Bioreactor; its Implication for Mixing in the Brewing Process and Aerobic Fermentations. *Food and Bioproducts Processing* **81**(1): 23-32.

Bournay, L., Casanave, D., Delfort, B., Hillion, G. y Chodorge, J. A. (2005). New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. *Catalysis Today* **106**(1-4): 190-192.

BP. (2014) BP Energy Outlook. London, *British Petroleum Company*.

Brennan, L. y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(2): 557-577.

Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* **7**(2): 91-98.

Burgess, N. R. H., McDermott, S. N. y Whiting, J. (1973). Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach, *Blatta orientalis*. *The Journal of Hygiene* **71**(1): 1-7.

Cabiscol, E., Tamarit, J. y Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* **3**(1): 3-8.

Calderbank, P. H. (1958). The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers* **36**: 443-463.

Çalik, P., Yilgör, P., Ayhan, P. y Deimir, A. S. (2004). Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chemical Engineering Science* **59**: 5075 – 5083.

Calzada, J., Alcón, A., Santos, V. E. y García-Ochoa, F. (2011). Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochemistry* **46**(6): 1323-1328.

Calzada, J., Alcón, A., Santos, V. E. y García-Ochoa, F. (2012). Extended kinetic model for DBT desulfurization using *Pseudomonas Putida* CECT5279 in resting cells. *Biochemical Engineering Journal* **66**: 52-60.

Camacho, F. G. a., Gómez, A. C., Sobczuk, T. M. y Grima, E. M. (2000). Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochemistry* **35**(9): 1045-1050.

Castillo, F. (2005). Biotecnología ambiental, *Tébar*.

- Castillo, T., Galindo, E. y Peña, C. F. (2013). The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **40**(7): 715-723.
- Celinska, E. (2010). Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. *Biotechnology Advances* **28**(4): 519-530.
- Celińska, E. y Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnology Advances* **27**(6): 715-725.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. y Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**(1): 711-745.
- Crawford, D. R. y Davies, K. J. (1994). Adaptive response and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives* **102**(Supl. 10): 25-28.
- Cyplik, P., Juzwa, W., Marecik, R., Powierska-Czarny, J., Piotrowska-Cyplik, A., Czarny, J., Drożdżyńska, A. y Chrzanowski, Ł. (2013). Denitrification of industrial wastewater: Influence of glycerol addition on metabolic activity and community shifts in a microbial consortium. *Chemosphere* **93**(11): 2823-2831.
- Champluvier, B., Decallonne, J. y Rouxhet, P. G. (1989). Influence of sugar source (lactose, glucose, galactose) on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199. *Archives of Microbiology* **152**(5): 411-414.
- Chatzifragkou, A., Aggelis, G., Komaitis, M., Zeng, A.-P. y Papanikolaou, S. (2011). Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. *Bioresource Technology* **102**(22): 10625-10632.
- Chisti, Y. (2001). Hydrodynamic Damage to Animal Cells. *Critical Reviews in Biotechnology* **21**(2): 67-110.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**(3): 294-306.
- Chisti, Y. y Moo-Young, M. (1994). Slurry Bioreactor Design for Shear-Sensitive Mycoprotein Production. *Advances in Bioprocess Engineering*. Galindo, E. and Ramírez, O. T. Dordrecht, *Springer Netherlands*: 25-28.
- del Olmo, C. H., Alcón, A., Santos, V. E. y García-Ochoa, F. (2005a). Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of media composition. *Enzyme and Microbial Technology* **37**(2): 157-166.

del Olmo, C. H., Santos, V. E., Alcón, A. y García-Ochoa, F. (2005b). Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochemical Engineering Journal* **22**(3): 229-237.

Donati, G. y Paludetto, R. (1997). Scale-up of chemical reactors. *Catalysis Today* **34**: 483-533.

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. y Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(3): 925-932.

Duque, J. P. (2010). Biotecnología, *Netbiblo*.

Escobar, S. (2013). Estudio del transporte y consumo de oxígeno en cultivos bacterianos: estrés hidrodinámico. Universidad Complutense de Madrid. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química.

Escobar, S., Rodríguez, A., Gómez, E., Alcón, A., Santos, V. E. y García-Ochoa, F. (2016). Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **39**(4): 545-554.

Fernández, L. E. Í. (2012). Breve historia de la Revolución industrial, *Ediciones Nowtilus*.

Figueiredo, M. M. L. y Calderbank, P. H. (1979). The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chemical Engineering Science* **34**(11): 1333-1338.

Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farrinelli, P., Montevecchi, P. y Vallini, G. (1998). Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology* **44**(3): 289-297.

Galán, B., Díaz, E. y García, J. L. (2000). Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environmental Microbiology* **2**(6): 687-694.

Gallagher, J. R., Olson, E. S. y Stanley, D. C. (1993). Microbial desulfurization of dibenzothiophene: A sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiology Letters* **107**(1): 31-35.

Gambino, M. y Cappitelli, F. (2016). Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* **32**(2): 167-178.

García-Ochoa, F., Escobar, S. y Gómez, E. (2015). Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects. *Chemical Engineering Science* **122**: 491-499.

- García-Ochoa, F. y Gómez, E. (1998). Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochemical Engineering Journal* **1**(1): 1-10.
- García-Ochoa, F. y Gómez, E. (2005). Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **92**(6): 761-772.
- García-Ochoa, F. y Gómez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* **27**(2): 153-176.
- García-Ochoa, F. y Gómez, E. (2010). Oxygen Transfer Rate Determination: Chemical, Physical and Biological Methods. The Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. Flickinger, M. C. USA, Wiley.
- García-Ochoa, F., Gómez, E., Alcón, A. y Santos, V. E. (2013). The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **36**(7): 911-925.
- García-Ochoa, F., Gómez, E., Santos, V. E. y Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal* **49**(3): 289-307.
- García-Ochoa, F. y Romero, A. (1993). Kinetic modeling of reaction networks. *Trends in Chemical Engineering* **1**: 285-305.
- García-Ochoa, F., Romero, A., Santos, V. E. y Rodríguez, C. O. (1993). Studies of the use of the differential method in the determination of kinetic models for complex reactions. *International Chemical Engineering* **33**: 634-638.
- Garg, S. K. y Jain, A. (1995). Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. *Bioresour Technol* **51**.
- Garibay, M. G., Ramírez, R. Q. y Canales, A. L. M. (1993). Biotecnología alimentaria, *Limusa*.
- Gómez, E. (1995). Transferencia de oxígeno en biorreactores tipo tanque agitado: Aplicación a la producción de xantano. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Complutense de Madrid.
- Gómez, E., Alcón, A., Escobar, S., Santos, V. E. y García-Ochoa, F. (2015). Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochemical Engineering Journal* **99**: 138-146.
- Gómez, E., Santos, V. E., Alcón, A. y García-Ochoa, F. (2006a). Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: Effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science* **61**(14): 4595-4604.

- Gómez, E., Santos, V. E., Alcón, A., Martín, A. B. y García-Ochoa, F. (2006b). Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT 5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability. *Energy & Fuels* **20**(4): 1565-1571.
- Gray, K. A., Pogrebinsky, O. S., Mrachko, G. T., Xi, L., Monticello, D. J. y Squires, C. H. (1996). Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnology* **14**(13): 1705-1709.
- Hassan, R., Loubiere, K., Legrand, J. y Delaplace, G. (2012). A consistent dimensional analysis of gas-liquid mass transfer in an aerated stirred tank containing purely viscous fluids with shear-thinning properties. *Chemical Engineering Journal* **184**: 42-56.
- Hassett, D. J., Ma, J.-F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E. H., Huang, C.-T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L. y Iglewski, B. H. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology* **34**(5): 1082-1093.
- Heinrich, D., Andreessen, B., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I. y Steinbuechel, A. (2013). From Waste to Plastic: Synthesis of Poly(3-Hydroxypropionate) in *Shimwellia blattae*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(12): 3582-3589.
- Hewitt, C. J., Boon, L. A., McFarlane, C. M. y Nienow, A. W. (1998). The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* **59**(5): 612-620.
- Hewitt, C. J., Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., McFarlane, C. M. y Nienow, A. W. (2000). Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering* **70**(4): 381-390.
- Higbie, R. (1935). The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Institute of Chemical Engineers* **35**: 36-60.
- Hou, C. T. y Laskin, A. J. (1976). Microbial conversion of dibenzothiophene. *Developments in Industrial Microbiology* **17**: 351-362.
- Huang, C.-J., Wang, Z.-C., Huang, H.-Y., Huang, H.-D. y Peng, H.-L. (2013). YjcC, a c-di-GMP Phosphodiesterase Protein, Regulates the Oxidative Stress Response and Virulence of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *PLOS ONE* **8**(7): e66740.

- Ilie, A., Simoes, M., Baranton, S., Coutanceau, C. y Martemianov, S. (2011). Influence of operational parameters and of catalytic materials on electrical performance of Direct Glycerol Solid Alkaline Membrane Fuel Cells. *Journal of Power Sources* **196**(11): 4965-4971.
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology* **11**(7): 443-454.
- Javadli, R. y de Klerk, A. (2012). Desulfurization of heavy oil. *Applied Petrochemical Research* **1**(1): 3-19.
- Ji, X. J., Huang, H. y Ouyang, P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* **29**.
- Joshi, J. B., Elias, C. B. y Patole, M. S. (1996). Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* **62**(2): 121-141.
- Juan, C. S. (1993). La Revolución industrial, *Ediciones Akal*.
- Junker, B. H. (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **97**(6): 347-364.
- Kao, P.-M., Chen, C.-I., Huang, S.-C., Chang, Y.-C., Tsai, P.-J. y Liu, Y.-C. (2007). Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHEN1. *Biochemical Engineering Journal* **34**(2): 172-178.
- Kapic, A. y Heindel, T. J. (2006). Correlating Gas-Liquid Mass Transfer in a Stirred-Tank Reactor. *Chemical Engineering Research and Design* **84**(3): 239-245.
- Kaur, G., Srivastava, A. K. y Chand, S. (2012). Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochemical Engineering Journal* **64**: 106-118.
- Kawase, Y., Halard, B. y Moo-Young, M. (1992). Liquid-Phase mass transfer coefficients in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **39**(11): 1133-1140.
- Kawase, Y. y Hasinguchi, N. (1996). Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering Science* **42**: 1609-1617.
- Kawase, Y. y Moo-Young, M. (1988). Volumetric mass transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with Newtonian and non-Newtonian media. *Chemical engineering research & design* **66**(3): 284-288.

- Klößner, W. y Büchs, J. (2011). 2.17 - Shake-Flask Bioreactors A2 - Moo-Young, Murray. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington, *Academic Press*: 213-226.
- Kolmogoroff, A. N. (1941). The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers. *Proceedings of the USSR Academy of Sciences* **30**: 299-303.
- Kudrewizki, F. (1982). Zur Berechnung des Gasgehaltes in begasteten Rührkesseln. *Chemical Technology* **34**: 247-249.
- Kudrewizki, F. y Rabe, P. (1986). Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chemical Engineering Science* **41**: 2247-2252.
- Lang, X., Dalai, A. K., Bakhshi, N. N., Reaney, M. J. y Hertz, P. B. (2001). Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology* **80**(1): 53-62.
- Lara, A. V. y Park, E. Y. (2003). Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry* **38**(7): 1077-1082.
- Lee, C. S., Aroua, M. K., Daud, W. M. A. W., Cognet, P., Peres-Lucchese, Y., Fabre, P. L., Reynes, O. y Latapie, L. (2015). A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **42**: 963-972.
- Lee, S. H. D., Applegate, D. V., Ahmed, S., Calderone, S. G. y Harvey, T. L. (2005). Hydrogen from natural gas: part I—autothermal reforming in an integrated fuel processor. *International Journal of Hydrogen Energy* **30**(8): 829-842.
- Lewis, W. K. y Whitman, W. G. (1924). Principles of Gas Absorption. *Industrial & Engineering Chemistry* **16**(12): 1215-1220.
- Li, Y., Huang, Z., Ruan, W., Ren, H. y Miao, H. (2014). Performance and microbial response during the fast reactivation of Anammox system by hydrodynamic stress control. *Journal of Environmental Sciences* **26**(9): 1861-1868.
- Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. y Mongkolsuk, S. (2004). DpsA protects the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* against organic hydroperoxide. *Archives of Microbiology* **182**(1): 96-101.

- Lu, H. y Chandran, K. (2010). Diagnosis and Quantification of Glycerol Assimilating Denitrifying Bacteria in an Integrated Fixed-Film Activated Sludge Reactor via ^{13}C DNA Stable-Isotope Probing. *Environmental Science & Technology* **44**(23): 8943-8949.
- Mac Nelly, A., Kai, M., Svatoš, A., Diekert, G. y Schubert, T. (2014). Functional Heterologous Production of Reductive Dehalogenases from *Desulfitobacterium hafniense* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(14): 4313-4322.
- Maddox, I. S. (2008). Microbial Production of 2,3-Butanediol. Biotechnology, *Wiley-VCH Verlag GmbH*: 269-291.
- Markl, H. y Bronnenmeier, R. (1985). Mechanical stress and microbial production. *Biotechnology*.
- Märkl, H., Bronnenmeier, R. y Wittek, B. (1991). The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. *International Chemical Engineering* **31**(2): 185-196.
- Martindale, J. L. y Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* **192**(1): 1-15.
- Martínez, I. (2013). Biodesulfurización de bibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* KTH2: una aproximación al cambio de escala del proceso. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez, I., Santos, V. E., Alcón, A. y García-Ochoa, F. (2015). Enhancement of the biodesulfurization capacity of *Pseudomonas putida* CECT 5279 by co-substrate addition. *Process Biochemistry* **50**(1): 119-124.
- Martínez, I., Santos, V. E., Gómez, E. y García-Ochoa, F. (2016). Biodesulfurization of dibenzothiophene by resting cells of *Pseudomonas putida* CECT 5279: influence of the oxygen transfer rate in the scale-up from shaken flask to stirred tank reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **91**(1): 184-189.
- McDonald, I. A. y Kuehn, M. J. (2013). Stress-Induced Outer Membrane Vesicle Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **195**(13): 2971-2981.
- Meadows, D. H., Randers, J., Meadows, D. L. y Pawlowsky, S. (2006). Los límites del crecimiento: 30 años después, *Galaxia Gutenberg*.
- Meijer, J. J., ten Hoopen, H. J. G., van Gameren, Y. M., Luyben, K. C. A. M. y Libbenga, K. R. (1994). Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology* **16**(6): 467-477.
- Melo, V., Ruiz, V. M. y Cuamatzi, O. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos, *Reverté*: 147-227.

- Merchuk, J. C. (1991). Shear effects on suspended cells. *Bioreactor Systems and Effects*. Berlin, Heidelberg, *Springer Berlin Heidelberg*: 65-95.
- Michel, B. J. y Miller, S. A. (1962). Power requirements of gas-liquid agitated systems. *American Institute of Chemical Engineers Journal* **8**: 262-267.
- Moazami, N., Ranjbar, R., Ashori, A., Tangestani, M. y Nejad, A. S. (2011). Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass and Bioenergy* **35**(5): 1935-1939.
- Mohebbali, G. y Ball, A. S. (2008). Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology* **154**(8): 2169-2183.
- Monticello, D. J. (2000). Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current Opinion in Biotechnology* **11**(6): 540-546.
- Mora, R. J. F. (2002). Soporte nutricional especial, *Médica Panamericana*: 103.
- Nemoto, S. (2002). Status of fuels and lubricants for diesel engines in Japan. Presentation at Motor Fuels: Energy Efficiency & Emissions in Transportation. *Washington D.C., October*: 9-10.
- Nimje, V. R., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Chen, H.-R., Tseng, M.-J., Jean, J.-S. y Chang, Y.-F. (2011). Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. *Bioresource Technology* **102**(3): 2629-2634.
- Ohshiro, T. y Izumi, Y. (1999). Microbial Desulfurization of Organic Sulfur Compounds in Petroleum. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**(1): 1-9.
- Oldfield, C., Pogrebinsky, O., Simmonds, J., Olson, E. S. y Kulpa, C. F. (1997). Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology* **143**(9): 2961-2973.
- Onodera-Yamada, K., Morimoto, M. y Tani, Y. (2001). Degradation of dibenzothiophene by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of only nitrogen gas. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**(1): 91-93.
- ONU. ONU (1998) Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. Nueva York, *United Nations Press*.
- Papoutsakis, E. T. (1991). Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends in Biotechnology* **9**(1): 427-437.
- Papoutsakis, E. T. y Titchener-Hooker, N. (2016). Editorial overview: Biotechnology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Chemical Engineering* **14**: iv-v.

- Parthasarathy, R., Jameson, G. y Ahmed, N. (1991). Bubble breakup in stirred vessels: Predicting the Sauter mean diameter. *Chemical engineering research & design* **69**(A4): 295-301.
- Perry, R. H., Green, D. W. y Mahoney, J. O. H. (1997). Perry's Chemical Engineers Handbook 7th ed., *McGraw Hill*.
- Polo, A., Diamanti, M. V., Bjarnsholt, T., Høiby, N., Villa, F., Pedefferri, M. P. y Cappitelli, F. (2011). Effects of Photoactivated Titanium Dioxide Nanopowders and Coating on Planktonic and Biofilm Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Photochemistry and Photobiology* **87**(6): 1387-1394.
- Puthli, M. S., Rathod, V. K. y Pandit, A. B. (2005). Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* **23**(1): 25-30.
- Quispe, C. A. G., Coronado, C. J. R. y Carvalho Jr, J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**: 475-493.
- Rao Ginjupalli, S., Mugawar, S., Rajan N, P., Kumar Balla, P. y Chary Komandur, V. R. (2014). Vapour phase dehydration of glycerol to acrolein over tungstated zirconia catalysts. *Applied Surface Science* **309**: 153-159.
- Reiche, A. y Kirkwood, K. M. (2012). Comparison of *Escherichia coli* and anaerobic consortia derived from compost as anodic biocatalysts in a glycerol-oxidizing microbial fuel cell. *Bioresource Technology* **123**: 318-323.
- Renovables, I. (2015). Informe Biodiésel en la UE Abril 2015. *Infinita Renovables: Informe Sectorial*.
- Reyes, J. F. y Sepúlveda, M. A. (2006). PM-10 emissions and power of a Diesel engine fueled with crude and refined Biodiesel from salmon oil. *Fuel* **85**(12-13): 1714-1719.
- Ripoll, V. (2016). Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerina. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Complutense de Madrid.
- Ripoll, V., de Vicente, G., Morán, B., Rojas, A., Segarra, S., Montesinos, A., Tortajada, M., Ramón, D., Ladero, M. y Santos, V. E. (2016). Novel biocatalysts for glycerol conversion into 2,3-butanediol. *Process Biochemistry* **51**(6): 740-748.
- Rodríguez, A., Ripoll, V., Santos, V. E., Gómez, E. y García-Ochoa, F. (2016). Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR:

oxygen transfer and uptake rates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*: n/a-n/a.

Sato, S., Andreeßen, B. y Steinbüchel, A. (2015). Strain and process development for poly(3HB-co-3HP) fermentation by engineered *Shimwellia blattae* from glycerol. *AMB Express* **5**(1): 1-9.

Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S. y Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* **27**(6): 895-913.

Schafer, F. Q. y Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **30**(11): 1191-1212.

Shanks, R. M. Q., Stella, N. A., Kalivoda, E. J., Doe, M. R., O'Dee, D. M., Lathrop, K. L., Guo, F. L. y Nau, G. J. (2007). A *Serratia marcescens* OxyR Homolog Mediates Surface Attachment and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* **189**(20): 7262-7272.

Sieblist, C., Lübbert, A. y Flickinger, M. C. (2009). Gas Holdup in Bioreactors. Encyclopedia of Industrial Biotechnology, *John Wiley & Sons, Inc.*

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* **4**: 180-183.

Simões, M., Simões, L. C. y Vieira, M. J. (2008). Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. *International Journal of Food Microbiology* **128**(2): 309-316.

Singh, S. P. y Singh, D. (2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(1): 200-216.

Soleimani, M., Bassi, A. y Margaritis, A. (2007). Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advances* **25**(6): 570-596.

Stanislaus, A., Marafi, A. y Rana, M. S. (2010). Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catalysis Today* **153**(1-2): 1-68.

Taguchi, G. (2001). Introduction to quality engineering : designing quality into products and processes. Tokyo; White Plains, *Asian Productivity Organization ; Kraus International.*

- Takeda, T., Seki, M. y Furusaki, S. (1994). Hydrodynamic Damage of Cultured Cells of *Carthamus tinctorius* in a Stirred Tank Reactor. *Journal of Japanese Chemical Engineering* **27**(4): 466-471.
- Tan, H. W., Abdul Aziz, A. R. y Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**: 118-127.
- Telen, D., Logist, F., Van Derlinden, E., Tack, I. y Van Impe, J. (2012). Optimal experiment design for dynamic bioprocesses: A multi-objective approach. *Chemical Engineering Science* **78**: 82-97.
- Tobajas, M., García-Calvo, E., Siegel, M. H. y Apitz, S. E. (1999). Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chemical Engineering Science* **54**(21): 5347-5354.
- Toma, M. K., Ruklisha, M. P., Vanags, J. J., Zeltina, M. O., Lelte, M. P., Galinine, N. I., Viesturs, U. E. y Tengerdy, R. P. (1991). Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnology and Bioengineering* **38**(5): 552-556.
- Tomida, H., Yasufuku, T., Fujii, T., Kondo, Y., Kai, T. y Anraku, M. (2010). Polysaccharides as potential antioxidative compounds for extended-release matrix tablets. *Carbohydrate Research* **345**(1): 82-86.
- Trinh, C. T. y Mendoza, B. (2016). Modular cell design for rapid, efficient strain engineering toward industrialization of biology. *Current Opinion in Chemical Engineering* **14**: 18-25.
- Trujillo-Roldán, M. A. y Valdez-Cruz, N. A. (2006). Hydrodynamic stress: death and cellular damage in agitated cultures. *Revista latinoamericana de microbiología* **48**(3-4): 269-280.
- UE (2006). Estrategia de la UE para los Biocarburantes. *UE Comission* **34**: 1-31.
- UE (2009). Directiva 2009/28/CE: Fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. *Diario Oficial de la Unión Europea* **52**: 16-62.
- Urano, N., Fujii, M., Kaino, H., Matsubara, M. y Kataoka, M. (2015). Fermentative production of 1-propanol from sugars using wild-type and recombinant *Shimwellia blattae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**(4): 2001-2008.
- Usta, N. (2005). Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine. *Biomass and Bioenergy* **28**(1): 77-86.

- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**(10): 1161-1208.
- Verma, P. y Sharma, M. P. (2016). Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **62**: 1063-1071.
- Vermes, I., Haanen, C. y Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* **243**(1–2): 167-190.
- Voet, D., Voet, J. G. y Pratt, C. W. (2007). Fundamentos De Bioquímica, *Médica Panamericana*: 396-406.
- Whitman, W. G. (1923). A Preliminary Experimental Confirmation of the Two-Film Theory of Gas Absorption. *Chemical and Metallurgical Engineering* **29**(4): 146-148.
- Wittmann, C., Kim, H. M., John, G. y Heinzle, E. (2003). Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnology Letters* **25**(5): 377-380.
- Wojtusik, M., Rodríguez, A., Ripoll, V., Santos, V. E., García, J. L. y García-Ochoa, F. (2015). 1,3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. *Biotechnology Reports* **6**(0): 100-107.
- Yang, L., Zhu, Z., Wang, W. y Lu, X. (2013). Microbial recycling of glycerol to biodiesel. *Bioresource Technology* **150**: 1-8.
- Yerushalmi, L. y Volesky, B. (1985). Importance of agitation in acetone-butanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **27**(9): 1297-1305.
- Zeng, A. P. y Sabra, W. (2011). Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Current Opinion in Biotechnology* **22**(6): 749-757.
- Ziegelhoffer, E. C. y Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology* **7**(12): 856-863.
- Zou, X., Hang, H.-f., Chu, J., Zhuang, Y.-p. y Zhang, S.-l. (2009). Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m³ scale. *Bioresource Technology* **100**(3): 1406-1412.

6. ANEXO: PUBLICACIONES

Publicación 1

Autores: Mateusz Wojtusik, Alberto Rodríguez, Vanessa Ripoll, José L. García, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa

Título: 1,3-Propanediol production by *Klebisella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions

Revista: Biotechnology Reports 6 (2015), pp. 100-107

Índice de impacto (2016): 1,93

Área: Biotecnología y Microbiología Aplicada.

Resumen

En esta publicación se estudia la producción de 1,3-propanodiol (1,3-PD) a partir de glicerina empleando *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 como biocatalizador. En concreto se realiza un estudio pormenorizado de la composición del medio de cultivo a escala de botella anaerobia, tomando como base la formulación del medio M92x, ampliamente utilizado en bibliografía. Posteriormente, se realizan varios experimentos en biorreactor para determinar la temperatura y la estrategia de agitación más adecuada para este bioproceso.

Se optimiza el proceso aplicando el método Taguchi. Se seleccionaron cuatro factores (las concentraciones iniciales de sustrato carbonado y fosfatos, la concentración de sales de magnesio y la relación sodio/potasio) a distintos niveles tomando como funciones objetivo la concentración final de biomasa, la selectividad y el rendimiento en el producto. En concreto, empleando 40 g/L de glicerol inicial, 6,2 g/L de fosfatos, 1mM de sales de magnesio y una relación sodio/potasio de 1 g/g, se alcanza una selectividad del 72% hacia el producto 1,3-propanodiol, un rendimiento del 31% y una concentración de biomasa en la fase estacionaria de 1,3 g/L.

Una vez fijada la composición del medio de cultivo, se estudia la estrategia de agitación a seguir, tomando como referencia los resultados obtenidos a escala de botella anaerobia en incubadora orbital. Un protocolo en forma de rampa de agitaciones entre 50 y 100 rpm, con una etapa intermedia a 75 rpm resultó ser el más adecuado, ya que se mejoran los resultados anteriores, aunque solo ligeramente. Con esta estrategia se estudió, por último, la temperatura más adecuada para este sistema, probándose un rango de valores entre 30 y 39 °C. Los resultados obtenidos en términos de concentración máxima de 1,3-PD, rendimiento, selectividad y crecimiento de la biomasa determinaron que a 37 °C se alcanza una concentración de 13,5 g/L de producto, con un incremento de la selectividad hasta el 86% respecto al glicerol consumido.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/btre

1,3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions[☆]



Mateusz Wojtusik, Alberto Rodríguez, Vanessa Ripoll, Victoria E. Santos^{*},
José L. García¹, Félix García-Ochoa

Departamento de Ingeniería Química, Universidad Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2014
Received in revised form 27 December 2014
Accepted 29 December 2014
Available online 17 March 2015

Keywords:

1,3-Propanediol production
Klebsiella oxytoca
Medium composition
Operating conditions
Scale-up

ABSTRACT

Production of 1,3-propanediol from glycerol using *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 has been studied. Medium composition has been optimized by means of a statistical design based on the Taguchi method. Strong influences of glycerol and phosphate concentrations have been detected on biomass and product yields. Other factors, such as magnesium concentration and K:Na ratio, have shown a small influence on both responses, biomass and product concentrations. An optimized medium composition has been proposed, leading to a final 1,3-propanediol concentration of 12.4 g/L with a selectivity of 72% with respect to glycerol consumed at shaken bottle-scale. Once the medium composition had been optimized, the scale-up from shaken bottles to STBR was conducted. Several experiments in a 2 L STBR have been conducted in order to determine the best operating conditions concerning temperature and agitation.

Under the best operating conditions, i.e., a programmed variable stirring rate ranging from 50 to 100 rpm and a temperature of 37 °C, a final concentration of 13.5 g/L of 1,3-propanediol with a selectivity of 86% with respect to the glycerol consumed was obtained.

© 2015 The Author. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

1,3-Propanediol (1,3-PD) is one of those compounds nominated as a platform chemical, since it can be used in numerous synthesis reactions (e.g., as a monomer for poly-condensation reactions, as well as to produce polyesters, polyethers and polyurethanes). Furthermore, the development of polypropylene-terephthalate, with unique properties for the fiber industry, demands a drastic increase in the production of 1,3-PD [32,23].

The traditional chemical production of 1,3-PD can be carried out from the conversion of acrolein; this process requires high temperature, high pressure and expensive catalysts. Moreover, toxic by-products are produced in this process, which requires an additional chemical reduction step also under high pressures and temperatures [20,37,23].

The microbial conversion of glycerol to 1,3-PD has recently received increasing attention because it can be carried out at low temperatures and pressures, thus avoiding the generation of toxic by-products [38]. In addition, the microbial process can use glycerol as substrate [28,32], which is a very suitable compound considering the fact that its production has remarkably increased in recent years due to the escalation of biodiesel production, of which glycerol is the main by-product, representing around 10% (w/w) of biodiesel produced [23].

In the biological production of 1,3-PD from glycerol, several by-products are formed (e.g., acetic acid, ethanol, 2,3-butanediol and succinic acid), which contribute to the reduction of the final yield of the process. Taking into account that microbial growth, production rates and product distribution are affected by operational conditions and media composition, these variables must be optimized in order to develop a cost-efficient bioprocess at industrial scale.

Glycerol can be naturally fermented into 1,3-PD under anaerobic or micro-aerobic conditions by different bacteria belonging to several genera, e.g., *Klebsiella*, *Clostridia*, *Citrobacter* and *Enterobacter* [12,13,32,23]. The metabolic pathways and the fermentative capabilities of these bacteria have mainly been analysed for the *Klebsiella* and *Clostridium* genera (see Table 1),

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 913944179.

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

¹ Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain.

Nomenclature

$C_{1,3-PD}$	1,3-PD concentration (g/L)
C_{Gly}	Glycerol concentration (g/L)
C_{Gly}^0	Initial glycerol concentration (g/L)
C_X^{max}	Maximum biomass concentration (g/L)
N	Number of experiments
N_L	Number of levels
\overline{SN}	Average of all the SN values, given by Eq. (5)
SN_i	Signal-to-noise ratio for each experimental data i , Eq. (3)
\overline{SN}_j	Average of the SN values for each level of the factors, Eq. (4)
S_{PG}	Product selectivity with respect to consumed glycerol, Eq. (2) ($g_{1,3-PD}/g_{Gly}$)
t	Time (h)
y_i	Experimental data (different units)
Y_{PG}	Product yield referred to initial glycerol concentration, Eq. (1) ($g_{1,3-PD}/g_{Gly}$)

showing that their selectivity values are very similar to each other (see Table 2).

Bacteria of the genus *Klebsiella* are widely distributed in nature, both in soil and water, though they are also part of the regular flora of the intestinal tract. Although *Klebsiella pneumoniae* is commonly associated with human infections [7], *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199, which is the strain used in this work, is a non-pathogenic strain that can be used safely due to its lack of the polysaccharide capsule [38].

The fermentation of glycerol by *K. oxytoca* involves two parallel and coupled pathways (i.e., oxidative and reductive) as shown in Fig. 1. Through the oxidative pathway, glycerol is dehydrogenated to dihydroxyacetone (DHA) and then to dihydroxy-acetone-phosphate (DHAP), being acetic, succinic and lactic acids, as well as 2,3-butanediol, ethanol, carbon dioxide and hydrogen the final products. Through the reductive pathway, a glycerol-dehydratase enzyme removes a water molecule from glycerol to obtain 3-hydroxy-propionaldehyde (3-HPA). This product is further reduced to 1,3-PD, which cannot be metabolized and is subsequently released to the medium [40]. All the mentioned by-products pertaining to both pathways are potential inhibitors of 1,3-PD production [4].

Although *K. oxytoca* is an excellent 1,3-PD producer, only a few studies have been published on its utilization for such purpose [38]. For this reason, the optimization of the medium composition

maximizing both the growth of the microorganism and the production of 1,3-PD is yet to be studied. Moreover, only studies at shaken bottle-scale have been reported [38].

Therefore, the aim of this work is the optimization of the medium composition to obtain the maximum biomass concentration of *K. oxytoca* and the highest 1,3-PD yield and selectivity using glycerol as substrate. Three variables or responses have been considered for process optimization: maximal concentration of biomass in the stationary phase of growth (C_X^{max}), product yield (Y_{PG}) and product selectivity (S_{PG}). Once the medium composition had been optimized, the scale-up from shaken bottle-scale to stirred tank bioreactor (STBR) was studied. Operating conditions, stirring speed and temperature, have been studied in a 2 L STBR.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The microorganism used in this work, *K. oxytoca* NRRL-B199, was initially grown in minimal M9 × 2 medium [31]. Pre-inocula were prepared in 25 mL anaerobic bottles containing 10 mL of culture medium, which was inoculated with cells from the bacterial stock conserved in 20% glycerol at -20°C . To ensure anaerobic conditions, commercial nitrogen was bubbled into the culture medium-filled bottles before sterilization. The inoculated anaerobic bottle was incubated in a Gallenkamp (model INR-200) orbital shaker under anaerobic conditions at 210 rpm and 30°C for 12 h. Pre-inocula were employed to inoculate 10 mL of culture medium in 25 mL anaerobic bottles at an initial concentration of 0.1 g/L. Samples were withdrawn every hour to measure biomass growth, for which they were subjected to centrifugation at $14,000 \times g$ for 5 min at 12°C . The supernatant obtained after centrifugation was analysed by HPLC to quantify the concentration of different products. In addition, pre-inocula were utilized to inoculate a 2 L stirred tank BIostat B. The initial biomass concentration was fixed at 0.1 g/L. Cell cultivation was carried out under anaerobic conditions, by introducing a 1 L/min nitrogen flow rate through the broth. Again, samples were taken at 1 h intervals and analysed by HPLC.

2.2. Analytical methods

A Shimadzu UV-visible spectrophotometer (model UV-1603) was used to measure biomass concentration by measuring the optical density at 600 nm. Glycerol and the main reaction products, such as 1,3-PD, 2,3-butanediol, lactic acid, acetic acid, succinic acid and ethanol were determined by HPLC (Agilent Technologies, series 1100) using an Aminex HPX-87H Organic Acid Analysis Column (Phenomenex), employing a Waters 2414 Refractive Index Detector. The column temperature was maintained at 65°C and that of the detector was 45°C . A solution of $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ was used as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min.

Table 1
Bacteria with fermentative capacity to transform glycerol into 1,3-PD.

Genus	Species	Reference nos.
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	[27,15,22,25,33,41,2,17,19,35,16,21,29,18,30]
	<i>K. oxytoca</i>	[38,39]
<i>Clostridium</i>	<i>C. butyricum</i>	[5,11,14,24,36]
	<i>C. diolis</i>	[23]
<i>Enterobacter</i>	<i>E. agglomerans</i>	[4,3,26]
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	[6,1,8]
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i>	[9]

Table 2
Selectivity and yield values obtained with *K. pneumoniae*, *C. butyricum* and *C. diolis* using an experimental set up like the one employed in this work.

Microorganism	S_{PG} (g/g)	Y_{PG} (g/g)	Reference
<i>K. pneumoniae</i>	0.41	0.33	[29]
	0.46	0.34	[30]
<i>C. butyricum</i>	0.57	0.34	[10]
<i>C. diolis</i>	0.47	0.32	[23]
<i>K. oxytoca</i>	0.72	0.31	This work

3. Calculation

The Taguchi method was employed for experimental design [34]. Traditional full or fractional factorial design and response surface methods involve a higher amount of experiments than the Taguchi method, especially when the number of factors or the levels at which they are to be applied are greater than two (that is the case in this work). The Taguchi method, on the other hand allows for the detection of the relationship between factors and responses with less experimental work. In this work, this method has been implemented to optimize the culture medium composition. First, it is necessary to establish the nutrients requirements, taking into account both responses, biomass growth and glycerol utilization for 1,3-PD production. All of the variables and parameters presented in this section are appropriately described in the nomenclature section of this work.

The steps for the implementation of the experimental design in this work are as follows: (1) selection of the output variables to be optimized, (2) identification of the factors and choice of the levels to be tested, (3) selection of the adequate orthogonal design, (4) performance of experiments, (5) completion of a statistical analysis of the data and the signal-to-noise ratio and determination of the optimum factor levels and (6) conduction of confirmatory experiments.

To establish which of the selected factors have an effect on the chosen variables or responses, the signal-to-noise ratio (SN) has to be determined. In its simplest form, SN is the ratio of the mean (signal) to the standard deviation (noise), calculated in this work according to:

$$SN_i = -10 \times \frac{\log 1}{y_i^2} \quad (1)$$

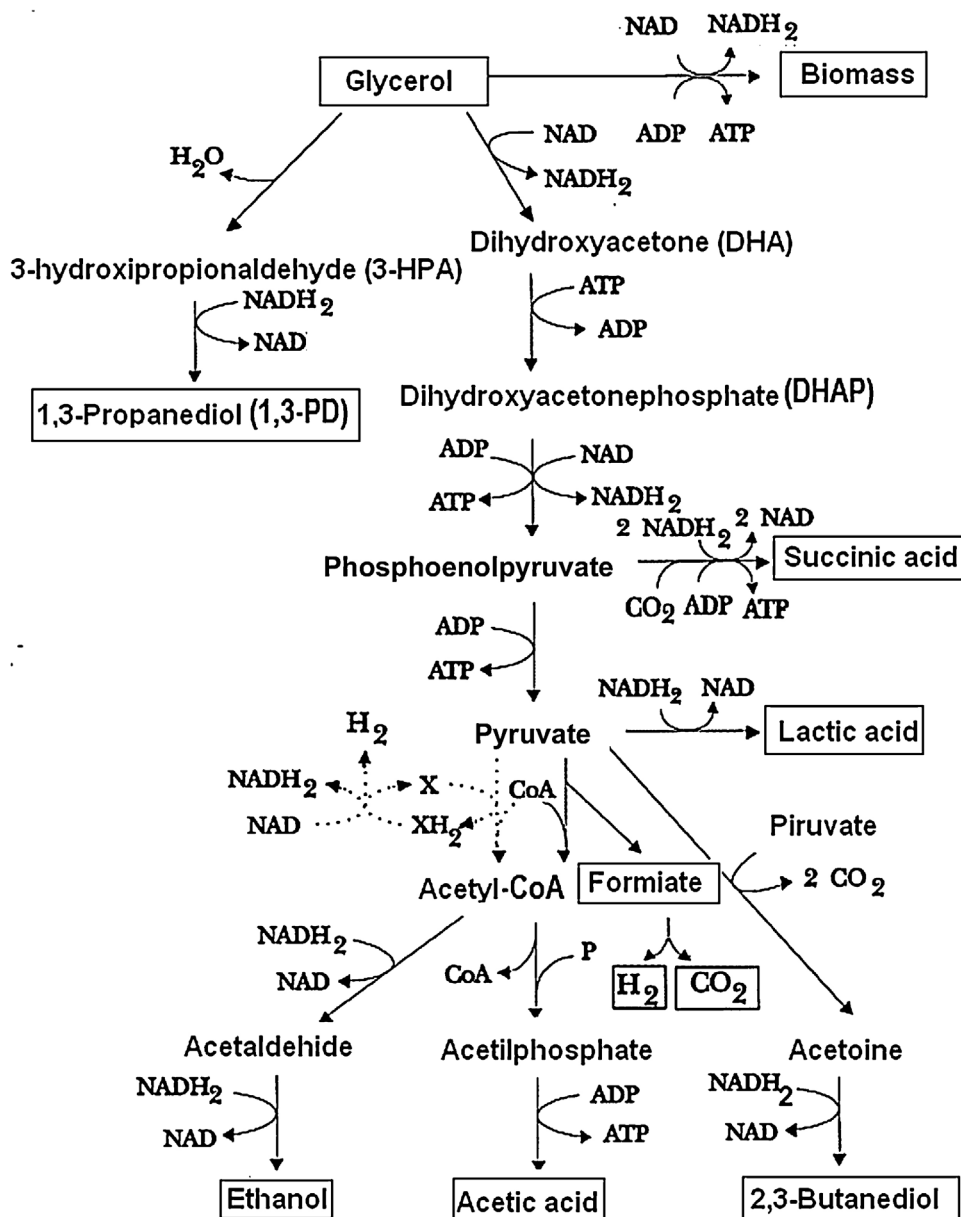


Fig. 1. Pathways for the glycerol metabolism in *Klebsiella* genus.

Once SN_j values have been calculated for each experimental data, the average value for each level ($j = 1, N_L$) is calculated by:

$$\overline{SN}_j = \frac{1}{N_L} \sum_{j=1}^{N_L} SN_j \quad (2)$$

Finally, the average value, \overline{SN} , is calculated for all the values following the next equation:

$$\overline{SN} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N SN_j \quad (3)$$

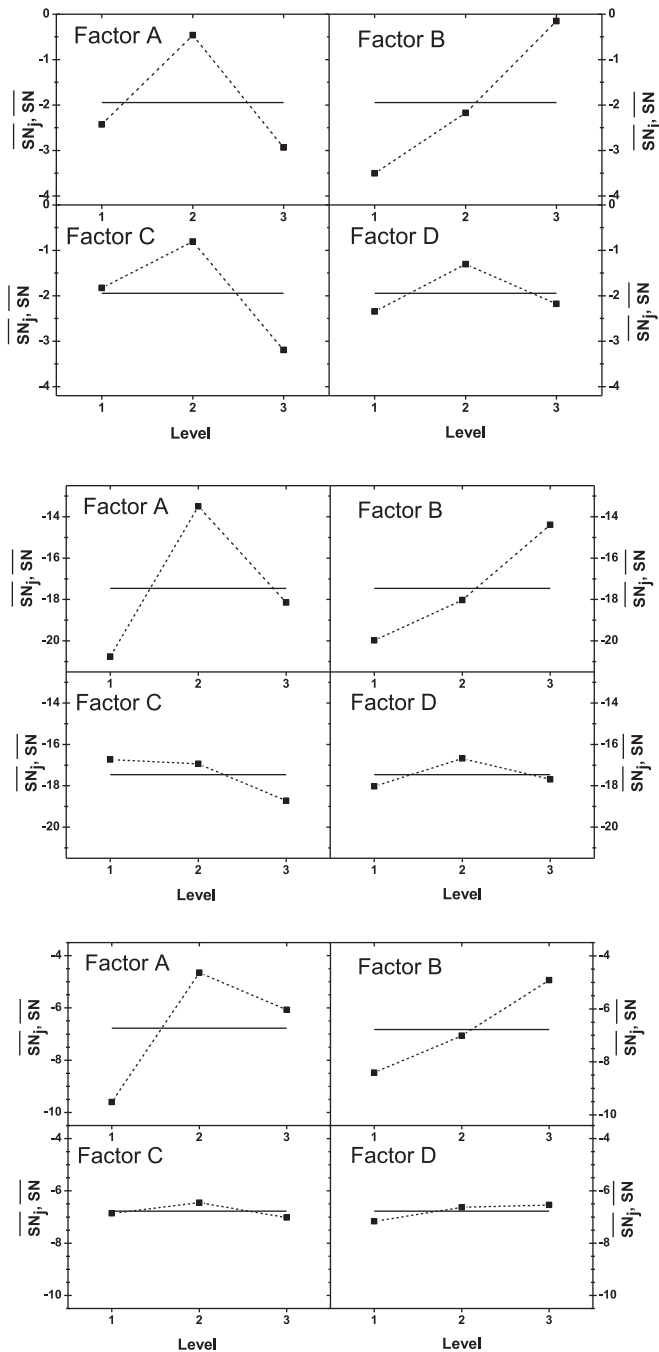


Fig. 2. Application of Taguchi method. Values of \overline{SN}_j and \overline{SN} (A) for C_X^{\max} values, (B) for Y_{PG} values, (C) for S_{PG} values.

Table 3

Factors and levels taken into account for the optimization of the medium composition.

Factor		Level	Value	Units
A	Gly	1	20	g/L
		2	40	
		3	80	
B	PO_4^{3-}	1	1.6	g/L
		2	3.1	
		3	6.2	
C	Mg^{2+}	1	0.5	mM
		2	1	
		3	2	
D	K:Na	1	0.33	g/g
		2	1	
		3	3	

As indicated above, three variables or responses have been considered, which are defined as follows:

C_X^{\max} : maximum concentration of biomass reached at the stationary phase of growth. Y_{PG} : product yield referred to the initial glycerol concentration, given by:

$$Y_{PG} = \frac{C_{1,3-PD}}{C_{Gly_0}} \quad (4)$$

S_{PG} : product selectivity, taking into the account the amount of glycerol converted, defined by:

$$S_{PG} = \frac{C_{1,3-PD}}{C_{Gly_0} - C_{Gly}} \quad (5)$$

These calculations have been repeated for all variables (C_X^{\max} , Y_{PG} and S_{PG}). Fig. 2A–C shows the results obtained in these analyses, where the solid line depicts the value of \overline{SN} , Eq. (3), and the dotted line represents the values of \overline{SN}_j , as defined by Eq. (2).

4. Results and discussion

4.1. Study of the medium composition

To favor the optimal growth of *K. oxytoca* NRRL-B199 and the highest production of 1,3-PD, three variables or responses (C_X^{\max} , Y_{PG} and S_{PG}) have been considered. The experimental conditions (factors) considered in this study are the concentrations of glycerol, phosphate and magnesium, as well as the K:Na ratio. Glycerol is expected to strongly affect both the growth and the production of 1,3-PD because it is the carbon source for bacterial growth and the raw material to produce 1,3-PD. Phosphate concentration is usually

Table 4

Experimental design and results according to the Taguchi method.

Run	Factor/level				Experimental results		
	A	B	C	D	C_X^{\max} (g/L)	Y_{PG} (g/g)	S_{PG} (g/g)
1	1	1	1	1	0.61	0.07	0.26
2	1	2	2	2	0.90	0.10	0.34
3	1	3	3	3	0.78	0.11	0.41
4	2	1	3	2	0.74	0.15	0.48
5	2	2	1	3	0.91	0.21	0.58
6	2	3	2	1	1.27	0.29	0.72
7	3	1	2	3	0.66	0.10	0.44
8	3	2	3	1	0.57	0.09	0.45
9	3	3	1	2	0.96	0.21	0.62

Table 5

Experimental values of the three objective functions (C_X^{max} , Y_{PG} and S_{PG}) in runs carried out to check the wellness of the optimized medium.

Run	Factor/level				C_X^{max} (g/L)	Y_{PG} (g/g)	S_{PG} (g/g)
10	2	3	2	2	1.29	0.31	0.72
6	2	3	2	1	1.27	0.29	0.72
11	3	3	2	2	1.15	0.24	0.69
9	3	3	1	2	0.96	0.21	0.62

a significant factor, being an essential nutrient for all the bio-synthetic and bio-energetic requirements of the cells; additionally, phosphate is also known to be a frequent limiting nutrient. Magnesium concentration was chosen because of its great influence in cell metabolism. The study of the influence of K:Na ratio was considered due to its possible influence on the transport of 1,3-PD through the cell membrane.

Three levels for each control factor were chosen to detect any quadratic or non-linear relation between the factors and the output variables, all of which are shown in Table 3. The selection of these levels was based on previous results [20,12,27,35,29]. Thus, an experimental design consisting of four control factors at three levels containing eight degrees of freedom has been employed; therefore, it can be fitted to the L9 orthogonal array, which provides the greatest amount of information from the minimum number of experiments (Table 4). The nine runs resulting from this design were conducted in triplicate; the factor/level employed and the experimental results of each one of these runs are compiled in Table 4.

The choice of the optimal set of variable levels on the object of the optimization. In order to maximize the values of the variables (C_X^{max} , Y_{PG} and S_{PG}), the optimal level of each factor is that which yields the highest values of the response variables. Fig. 2A shows that the four control factors (i.e., glycerol, phosphate, magnesium concentrations and K:Na ratio) affect the output variable C_X^{max} . The optimal levels of the different factors resulted from the combination 2-3-2-2 for factors A, B, C and D, respectively.

Fig. 2B and C shows that, for the two latter responses (Y_{PG} and S_{PG}), the influence of the four different factors is very similar. Glycerol and phosphate initial concentrations strongly affect the values of both variables, while the other two factors, magnesium initial concentration and the K:Na ratio, hardly affect the product yield and selectivity obtained. With respect to the optimal values of the different factors, the combination 2-3-2-2 can be selected (see Fig. 2B and C).

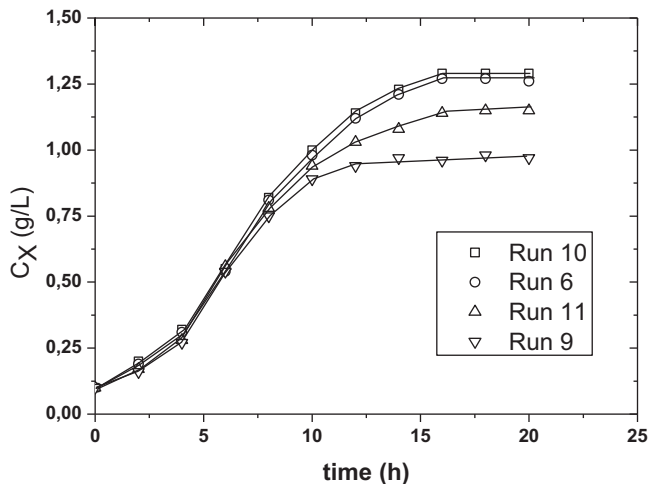


Fig. 3. Variation of biomass concentration throughout the time course in the runs described in Table 5.

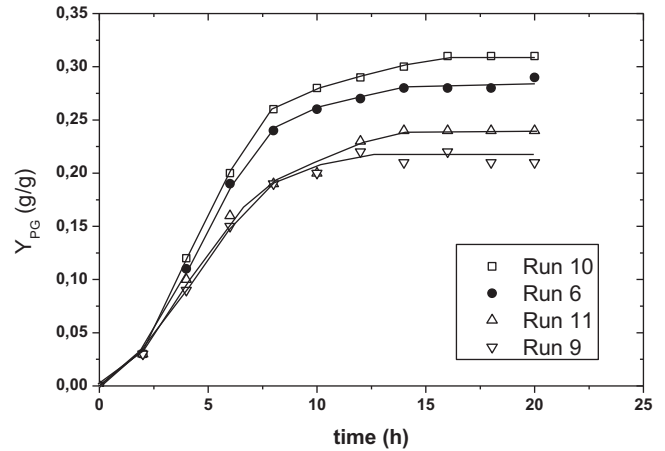


Fig. 4. Y_{PG} values versus time course for runs of Table 5.

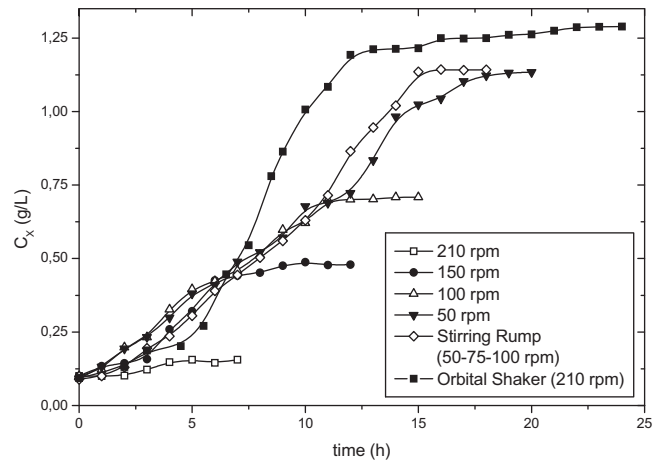


Fig. 5. Variation of biomass concentration with time course in the runs of the stirring study (Table 6).

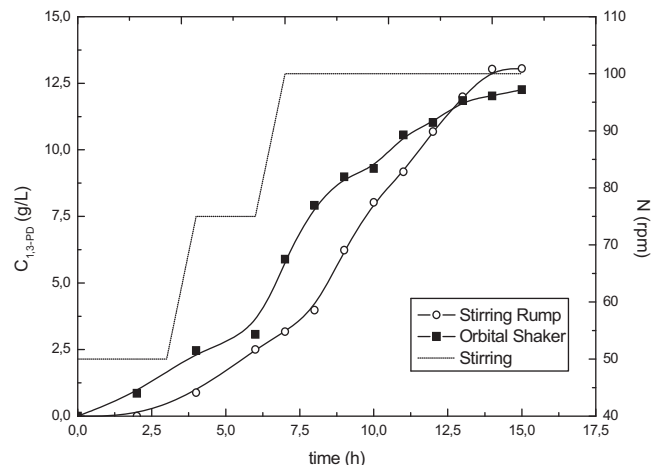


Fig. 6. Variation of 1,3-PD concentration with time course in the runs of the stirring study (Table 6).

Table 6

Experimental results obtained in the stirring study.

Run	Bioreactor: stirrer speed (rpm)	C_X^{\max} (g/L)	$C_{1,3-PD \max}$ (g/L)	Y_{PG} (g/g)	S_{PG} (g/g)
12	STBR: 50	1.12	10.12	0.25	0.77
13	STBR: 100	0.71	6.24	0.16	1.06
14	STBR: 150	0.48	5.11	0.13	1.22
15	STBR: 210	0.16	4.58	0.11	1.17
16	Orbital shaker: 210	1.26	12.26	0.31	0.88
17	STBR: stirring ramp	1.14	13.06	0.33	0.86

Table 7

Experimental results obtained in the temperature study.

Run	Temperature (°C)	C_X^{\max} (g/L)	$C_{1,3-PD \max}$ (g/L)	Y_{PG} (g/g)	S_{PG} (g/g)
18	30	1.14	13.06	0.33	0.86
19	32	1.12	11.24	0.28	0.89
20	34	1.18	12.23	0.31	0.81
21	37	1.26	13.51	0.34	0.86
22	38	1.07	12.9	0.32	0.94
23	39	0.51	3.09	0.08	0.59

According to these results, the optimal combination of the four levels in order to obtain the highest values of C_X^{\max} , Y_{PG} and S_{PG} is that corresponding to the factor levels: 2-3-2-2. To validate this optimization process, two new runs were carried out, which were not conducted initially following the experimental design given in Table 4. Thus, run 10 corresponds to the best conditions deduced from the optimization method, run 11 changes the initial glycerol concentration, and runs 6 and 9 (included in the previously performed statistical design) have been selected due to their good results. As can be seen in Table 5, the results provided by the optimized medium are better than those reached with other media, although the results of runs 6 and 10 are very similar. Figs. 3 and 4 show the evolution of both responses C_X (Fig. 3) and Y_{PG} (Fig. 4) throughout the performance of the runs featured in Table 5. With the optimized medium (run 10), a concentration of 1,3-PD of 12.4 g/L is reached at 16–20 h, showing a yield (Y_{PG}) of 0.31 and a selectivity value (S_{PG}) of 0.72.

4.2. Study of the operating conditions in STBR

Once the culture medium composition was determined by means of the Taguchi method, the operational conditions of the process were studied in a 2L SBTR under anaerobic conditions (1 L/min nitrogen flow rate), taking advantage of the experimental

conditions determined for the operation in shaken bottles. Initially, four experiments employing different stirring speeds were carried out, all of which were performed with an initial glycerol concentration of 40 g/L, with 0.1 g/L of initial biomass concentration and a temperature of 30 °C (see Figs. 5 and 6). Comparing the biomass concentration time course obtained both in shaken bottles and in SBTR experiments, it was surprising that the best results were obtained in the bottles agitated in an orbital shaker. The results of the runs carried out in SBTR show that low stirring improves the production of biomass, yet a lower production of 1,3-PD is achieved, as can be seen in Table 6.

Based on these results, a different experimental approach was performed by changing the stirring speed throughout the time course (run identified as *stirring ramp*). The stirring speed of this run was changed as follows: for the first 5 h, stirring was fixed at 50 rpm, from 5 to 8 h the stirrer speed was increased to 75 rpm, and from that time throughout the remaining of the run, it was escalated to a value of 100 rpm. Employing this program of the stirrer speed, the maximum biomass concentration reached was similar to that obtained in orbital shaker; while the maximum 1,3-PD concentration was increased by 6% (see Table 6). Therefore, the 1,3-PD yield (Y_{PG}) was 0.33 and the selectivity value was 0.86. Figs. 5 and 6 show the results in all the runs carried out in the stirring study. As demonstrated by these figures, the strategy employed in this run named as *stirring ramp* improves the orbital shaker results, hence, this strategy was chosen for further studies.

The next variable analysed was temperature. To determine the optimal value of temperature for this process, six experiments using different values (from 30 to 39 °C) of this variable were performed, as shown in Table 7. These runs were carried out employing the best conditions previously determined: stirring strategy (*stirring ramp*) as described above, using 40 g/L of initial glycerol concentration and 0.1 g/L of initial biomass concentration. The experimental results are given in Figs. 7 and 8. As can be seen, the maximum biomass (Fig. 7) and 1,3-PD concentrations (Fig. 8)

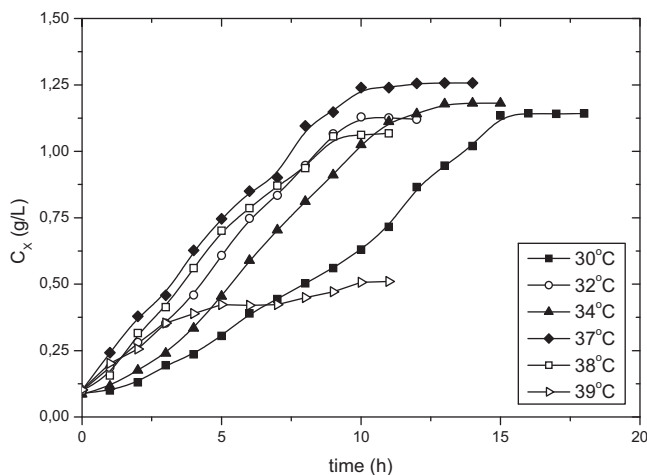


Fig. 7. Variation of biomass concentration with time course in the runs corresponding to the temperature study (Table 7).

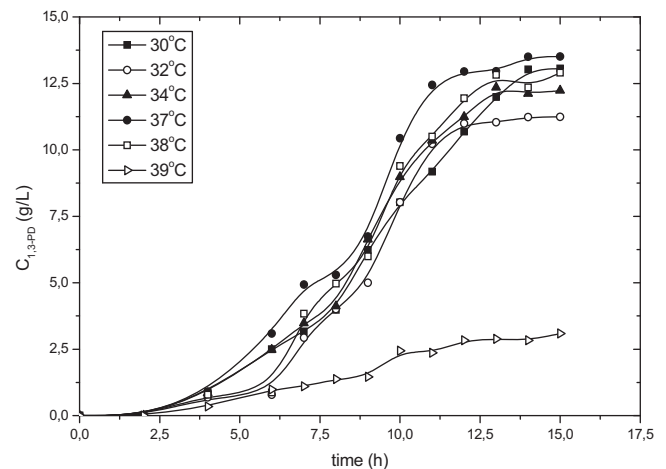


Fig. 8. Variation of 1,3-PD concentration with time course in the runs corresponding to the temperature study (Table 7).

are reached when a temperature of 37 °C is employed. Moreover, the growth and production rates are also maximal for this temperature.

Under these conditions, the highest biomass and 1,3-PD concentrations were 1.26 g/L and 13.5 g/L, respectively; the 1,3-PD yield (Y_{PG}) was 0.34, and the substrate uptake was 39.1%, with a selectivity value of 0.86. All of these values are included in Table 7. Remarkably, it was surprising that the transition from 38 °C to 39 °C caused a dramatic change in the growth and 1,3-PD production rates.

5. Conclusions

A new experimental procedure has been developed to optimize the production of 1,3-PD in *K. oxytoca*. The Taguchi method was applied to optimize medium composition, taking into account the biomass growth and glycerol utilization to yield 1,3-PD as response variables. The results obtained using this method showed a clear influence of two of the selected factors (glycerol and phosphate concentrations) on both responses.

The optimal composition of the culture medium was fixed at the following amounts of components on a per liter basis: 40 g of glycerol, 15.2 g of $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3.1 g of KH_2PO_4 , 0.5 g of KCl, 0.25 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g of CaCl_2 , 2 g of NH_4Cl and 1.5 g of yeast extract.

Employing this culture medium, the highest biomass (1.29 g/L) and 1,3-PD (12.4 g/L) concentrations were reached after 16 h of culture with an additional Also, a high value of 1,3-PD selectivity is obtained (S_{PG} of 0.72). These S_{PG} and 1,3-PD concentration values using the optimized culture medium were higher than those previously reported for other bacteria with this fermentative capability, like *K. pneumoniae* or *C. butyricum* (see Table 2).

When the operational conditions were studied in a SBTR, the results showed that the best operational conditions were obtained using a varying stirring rate (from 50 to 100 rpm) and a temperature of 37 °C. Under these conditions, a concentration of 13.5 g/L of 1,3-PD was obtained, and the values of Y_{PG} and S_{PG} were 0.31 and 0.81, respectively. Although the yield (Y_{PG}) obtained in this work is within the same range as the values obtained in literature, the selectivity (S_{PG}) value is higher than that in other previous works reported in literature, operating in similar STBR batch conditions, where this variable reaches only 0.55–0.57 g/g [11,37,1] (see Table 2).

The results presented above represent a proof of concept to demonstrate that the rational experimental approach developed in this work can contribute with minimum time consumption and cost to further improve the production of important industrial metabolites like 1,3-PD in other still under explored bacterial producers.

Acknowledgements

This work has been supported by MICINN, Plan Nacional de I + D, under contracts CTQ2010-11765-E, CTQ2010-15460 and CTQ2011-12725-E, and by UCM and BSCH, under contract GR35/10-A-910134.

References

- [1] P. Anand, R.K. Saxena, A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*, *New Biotechnol.* 29 (2012) 199–205.
- [2] S. Ashok, S.M. Raj, C. Rathnasingh, S. Park, Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae* delta dhaT strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011) 1253–1265.
- [3] F. Barbirato, A. Bories, Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions, *Res. Microbiol.* 148 (1997) 475–484.
- [4] F. Barbirato, J.P. Grivet, P. Soucaille, A. Bories, 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1448–1451.
- [5] M. Bizukojc, D. Dietz, J. Sun, A.-P. Zeng, Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1,3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archaeon, *Methanosarcina mazei*, under anaerobic conditions, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 33 (2010) 507–523.
- [6] P. Bounoun, N. Laosiripojana, C. Muangnapoh, B. Jongsomjit, J. Panpranot, O. Mekasuwandromong, A. Shotipruk, Application of sulfonated carbon-based catalyst for reactive extraction of 1,3-propanediol from model fermentation mixture, *Ind. Eng. Chem. Res.* 49 (2010) 12352–12357.
- [7] C. Brown, R.J. Seidler, Potential pathogens in environment – *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma, *Appl. Microbiol.* 25 (1973) 900–904.
- [8] S. Casali, M. Gungormusler, L. Bertin, F. Fava, N. Azbar, Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol, *Biochem. Eng. J.* 64 (2012) 84–90.
- [9] O. Claisse, A. Lonvaud-Funel, Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider, *Food Microbiol.* 17 (2000) 513–519.
- [10] A. Chatzifragkou, G. Aggelis, C. Gardeli, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, S. Papanikolaou, Adaptation dynamics of *Clostridium butyricum* in high 1,3-propanediol content media, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 1541–1552.
- [11] A. Chatzifragkou, S. Papanikolaou, D. Dietz, A.I. Douleraki, G.-J.E. Nychas, A.-P. Zeng, Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 101–112.
- [12] X. Chen, Z. Xiu, J. Wang, D. Zhang, P. Xu, Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 386–394.
- [13] X. Chen, D.J. Zhang, W.T. Qi, S.J. Gao, Z.L. Xiu, P. Xu, Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2003) 143–146.
- [14] S. Dabrowski, E. Zaboltna, D. Pietrewicz-Kubicz, A. Dfugolecka, Screening of environmental samples for bacteria producing 1,3-propanediol from glycerol, *Acta Biochim. Pol.* 59 (2012) 353–356.
- [15] X.-Y. Dong, Z.-L. Xiu, S. Li, Y.-M. Hou, D.-J. Zhang, C.-S. Ren, Dielectric barrier discharge plasma as a novel approach for improving 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 1245–1250.
- [16] C. Gonen, M. Gungormusler, N. Azbar, Comparative evaluation of pumice stone as an alternative immobilization material for 1,3-propanediol production from waste glycerol by immobilized *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (2012) 2136–2147.
- [17] M. Gungormusler, C. Gonen, N. Azbar, 1,3-Propanediol production potential by a locally isolated strain of *Klebsiella pneumoniae* in comparison to *Clostridium Beijerinckii* NRRL B593 from waste glycerol, *J. Polym. Environ.* 19 (2011) 812–817.
- [18] L. He, X. Zhao, K. Cheng, Y. Sun, D. Liu, Kinetic modeling of fermentative production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* HR526 with consideration of multiple product inhibitions, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169 (2013) 312–326.
- [19] A. Hiremath, M. Kannabiran, V. Rangaswamy, 1,3-Propanediol production from crude glycerol from jatropa biodiesel process, *New Biotechnol.* 28 (2011) 19–23.
- [20] H. Huang, C.S. Gong, G.T. Tsao, Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98 (2002) 687–698.
- [21] Y. Huang, Z. Li, K. Shimizu, Q. Ye, Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Bioresour. Technol.* 103 (2012) 351–359.
- [22] A. Jun, C. Moon, C.-H. Kang, S.W. Kong, B.-I. Sang, Y. Um, Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161 (2010) 491–501.
- [23] G. Kaur, A.K. Srivastava, S. Chand, Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol, *Biochem. Eng. J.* 64 (2012) 106–118.
- [24] P. Kubiak, K. Leja, K. Myszk, E. Celinska, M. Spychala, D. Szymanowska-Powalowska, K. Czaczek, W. Grajek, Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol, *Proc. Biochem.* 47 (2012) 1308–1319.
- [25] C. Moon, H. Ahn, S.W. Kim, B.-I. Sang, Y. Um, Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161 (2010) 502–510.
- [26] C.E. Nakamura, G.M. Whited, Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 454–459.
- [27] B.-R. Oh, J.-W. Seo, M.H. Choi, C.H. Kim, Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 13 (2008) 666–670.
- [28] S. Papanikolaou, S. Fakas, M. Fick, I. Chevalot, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, I. Marc, G. Aggelis, Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil, *Biomass Bioenergy* 32 (2008) 60–71.
- [29] K. Petrov, A. Stoyanov, Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 35 (2012) 317–321.
- [30] D.M. Rossi, E.A. de Souza, S.H. Flores, M.A. Zachia Ayub, Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Renew. Energy* 55 (2013) 404–409.

- [31] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [32] R.K. Saxena, P. Anand, S. Saran, J. Isar, Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 895–913.
- [33] W. Seo, Y. Seo, B.-R. Oh, Y. Heo, J.-O. Baek, D. Rairakhwada, H. Luo, W.-K. Hong, H. Kim, Identification and utilization of a 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme for production of 1,3-propanediol from glycerol in *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 659–666.
- [34] G. Taguchi, *Introduction To Quality Engineering: Designing Quality Into Products and Processes*, Asian Productivity Organization, 1986.
- [35] Y. Wang, H. Teng, Z. Xiu, Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2011) 705–715.
- [36] E. Wilkens, A.K. Ringel, D. Hortig, T. Willke, K.-D. Vorlop, High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1057–1063.
- [37] Z.-L. Xiu, X. Chen, Y.-Q. Sun, D.-J. Zhang, Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions, *Biochem. Eng. J.* 33 (2007) 42–52.
- [38] G. Yang, J. Tian, J. Li, Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1017–1024.
- [39] Y. Zhang, Z. Huang, C. Du, Y. Li, Z.A. Cao, Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol, *Metab. Eng.* 11 (2009) 101–106.
- [40] M.M. Zhu, P.D. Lawman, D.C. Cameron, Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of *sn*-glycerol-3-phosphate, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 694–699.
- [41] B. Zhuge, C. Zhang, H. Fang, J. Zhuge, K. Permaul, Expression of 1,3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 2177–2184.

Publicación 2

Autores: Alberto Rodríguez, Mateusz Wojtusik, Vanessa Ripoll, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa

Título: 1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations

Revista: Bioresource Technology 200 (2016), pp. 830-837

Índice de impacto (2015): 4,917

Área: Biotecnología y Microbiología Aplicada.

Resumen

Este trabajo pretende probar la potencialidad de un microorganismo de tipo 1, *Shimwellia blattae* ATCC 33430, como biocatalizador en la conversión de glicerol a 1,3-propanodiol (1,3-PD). Incluye estudios de varias condiciones de operación (temperatura, pH inicial, estrategia de control de pH, influencia del empleo de glicerol crudo como sustrato carbonado, velocidad de agitación y aporte de aire), tanto a escala de botella anaerobia como de biorreactor tipo tanque agitado (STBR), utilizando en todos los casos una concentración inicial de glicerol de 30 g/L. El estudio de temperatura en botellas anaerobias concluyó que el valor más adecuado para esta variable, en cuanto a concentración final de 1,3-PD, rendimiento y productividad es 37 °C, aunque la inhibición del proceso por efecto de un pH ácido se reveló como la variable más determinante en estos ensayos. Por ello, se estudió en STBR la influencia del pH inicial del medio de cultivo y se desarrolló una estrategia de control del mismo, que dio como resultado un valor inicial de 6,9, que debe dejarse evolucionar hasta 6,5, momento a partir del cual debe mantenerse constante en este valor mediante la adición controlada de NaOH 1 M. Por otro lado, el biocatalizador es capaz de degradar sin dificultad el glicerol crudo a una velocidad similar a la que metaboliza glicerina pura, de modo que el resto de las variables se estudiaron utilizando glicerol crudo como fuente de carbono. A continuación, se evaluó la influencia de la agitación sobre la síntesis de 1,3-PD, realizando varios experimentos en STBR, empleando velocidades de agitación entre 100 y 400 rpm. Este estudio demuestra que si la velocidad de agitación es superior a 200 rpm no se observan diferencias significativas en el proceso, de modo que se escogió este valor como el más adecuado para la operación en discontinuo con células en crecimiento. Por último, se probó la influencia del aporte de pequeñas cantidades de oxígeno a la fase líquida, así como de una corriente de nitrógeno puro. Los resultados ponen de manifiesto que la alimentación de estos compuestos no supone una mejora de las variables fundamentales en este sistema, de modo que se seleccionó una operación sin caudal de gases durante la transformación, en un STBR en el que, previamente a la adición del biocatalizador, se había eliminado el oxígeno disuelto por desorción con nitrógeno gaseoso.

Los resultados obtenidos en estas condiciones de operación son los siguientes: 13,84 g/L de 1,3-PD, un rendimiento de 0,45 g/g y una productividad de 1,19 g/(L·h) de producto, con una conversión completa del glicerol crudo inicial, competitivos con resultados anteriormente publicados.



1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations



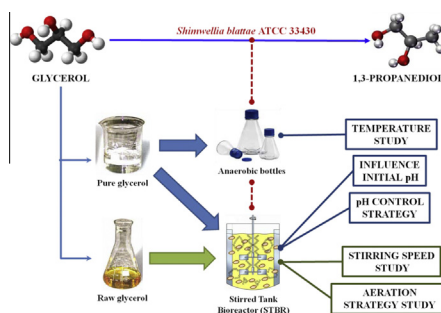
Alberto Rodriguez, Mateusz Wojtusik, Vanessa Ripoll, Victoria E. Santos*, F. Garcia-Ochoa

Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- *Shimwellia blattae*, a wild type risk class 1 bacterium, produces 1,3-propanediol (PDO).
- The influence of temperature, pH and fluid dynamic conditions is determined.
- PDO production is not affected for the use of crude glycerol as raw material.
- Yield and productivity values are in line with published data from risk class 2 strains.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2015

Received in revised form 16 October 2015

Accepted 17 October 2015

Available online 23 October 2015

Keywords:

1,3-Propanediol

Shimwellia blattae CECT 33430

Batch fermentation

Raw glycerol

ABSTRACT

Shimwellia blattae ATCC 33430 as biocatalyst in the conversion of 1,3-propanediol from glycerol is herein evaluated. Several operational conditions in batch cultivations, employing pure and raw glycerol as sole carbon source, were studied. Temperature was studied at shaken bottle scale, while pH control strategy, together with the influence of raw glycerol and its impurities during fermentation were studied employing a 2 L STBR. Thereafter, fluid dynamic conditions were considered by changing the stirring speed and the gas supply (air or nitrogen) in the same scale-up experiments. The best results were obtained at a temperature of 37 °C, an agitation rate of 200 rpm, with free pH evolution from 6.9 and subsequent control at 6.5 and no gas supply during the fermentation, employing an initial concentration of 30 g/L of raw glycerol. Under these conditions, the biocatalyst is competitive, leading to results in line with other previous works in the literature in batch conditions, reaching a final concentration of 1,3-propanediol of 13.84 g/L, with a yield of 0.45 g/g and a productivity of 1.19 g/(L h) from raw glycerol.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The current global industrialization model, sustained by progressive depletion of petroleum stocks has raised the worldwide need for alternative energy sources, such as biofuels, being biodiesel considered among the most important (Luque and Melero,

2012). This compound is the main product of the transesterification of vegetable or animal fatty acids with short chain alcohols, producing a concentrated water-rich glycerol (the so-called raw or crude glycerol) as by-product. The current global increase of biodiesel demand has caused a high accumulation of raw glycerol, currently regarded as waste. Hence, several glycerol conversion processes have been developed in order to valorize this compound into high added value products, where microbial biotechnology plays a key role (Johnson and Taconi, 2007).

* Corresponding author.

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

1,3-Propanediol (PDO) has long been considered a specialty platform chemical, due to its high number of applications in the new polymer industry, cosmetics, personal care and cleaning products (Kaur et al., 2012). PDO is mainly used as a monomer for poly-tri-methyl-terephthalate (PTT) production (representing approximately 90% of its total market share), as well as other polyesters with important uses in the plastic and fiber industries (Witt et al., 1994; Zeng and Sabra, 2011). The chemical production of PDO requires high pressure and temperature conditions as well as expensive catalysts; therefore, the microbial conversion of glycerol to PDO has recently gained a great deal of attention and has been subsequently studied in a large number of papers, where different bacterial species (e.g. *Klebsiella*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Enterobacter*) have been used as biocatalysts under aerobic or micro-aerobic conditions (Kaur et al., 2012). The best results have been attained by genetically engineered strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* (Chatzifragkou et al., 2012; Jin et al., 2011). Glycerol assimilation follows two different coupled pathways. Through the oxidative pathway (a), the substrate is successively transformed into pyruvate through dihydroxyacetone (DHA) and phosphoenolpyruvate (PEP), releasing succinic acid to recover reducing power (NAD) and produce ATP. Then, pyruvate is converted to formic acid, lactic acid, 2,3-butanediol (via acetoin) and acetyl-CoA, that is oxidized into ethanol and acetic acid to generate NAD and ATP (Gungormusler et al., 2010). Through the reductive pathway (b), glycerol is dehydrated to 3-hydroxypropionaldehyde by glycerol dehydratase (GDHt), and subsequently reduced to PDO by 1,3-propanediol dehydrogenase (PDO DH) (Zeng and Biebl, 2002). The catalytic activity of both enzymes depends on the presence of different co-factors: GDHt is coenzyme-B₁₂ dependent, while PDO DH is NADH+H⁺ dependent (Kaur et al., 2012). The enzymes of the reductive pathway are encoded by *dha* operon, where GDHt is considered as a rate-limiting enzyme of the pathway (Seyfried et al., 1996). PDO synthesis is associated to cell growth, since biomass production is the only pathway branch that provides NADH+H⁺ (Andres et al., 2004).

Even though the best PDO production results from glycerol were obtained by *K. pneumoniae*, the use of this bacterium in an industrial process is not desirable, due to its pathogenicity (Pflugl et al., 2012). More recent works have reported strains of *Lactobacillus diolivorans* (Pflugl et al., 2012), *Lactobacillus reuteri* (Vieira et al., 2015), *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* (Drozdzyńska et al., 2014) to be producers of 1,3-propanediol, as well as a novel *Klebsiella oxytoca* strain (Wojtusik et al., 2015) (see Table 1). *Shimwellia*

blattae ATCC 33430 is capable of producing PDO from glycerol by the enzymatic system described below (Andres et al., 2004) and it's also employed to synthesize poly(3-hydroxypropionate), a biopolymer derived from 3-HPA, by engineered strains that may accumulate almost 10% w/w [CDW] of this product inside the cells (Heinrich et al., 2013).

The aim of this work is to study the capability of a novel strain *S. blattae* ATCC 33430 in 1,3-propanediol production from glycerol, and to determine adequate experimental batch conditions such as temperature, pH control strategy, fluid dynamic conditions (stirrer speed and whether sparging or not with air or nitrogen is favorable) and the use of pure and raw glycerol. Moreover, the scale-up from shaken bottle to stirred tank bioreactor (STBR) has been studied.

2. Methods

2.1. Microorganism and medium

S. blattae ATCC 33430 was the biocatalyst used in all the experiments carried out in this study. Cells were stored at –80 °C in 50% w/w glycerol/saline serum medium prior to inoculation. The medium employed was M92x medium (Rhee et al., 1997) for all cultures, the composition of which being as follows (per liter of deionized water): 2 g NH₄Cl, 6 g KH₂PO₄, 12 g Na₂HPO₄, 1 g NaCl, 0.246 g MgSO₄·7H₂O, 0.011 g CaCl₂ and 1.5 g yeast extract. The initial concentration of glycerol (pure or raw) was approximately 30 g/L in every run, due to the drag of metabolites from inoculation stage. In raw glycerol experiments, the substrate was taken from a concentrate coming directly from biodiesel production with the following composition (w/w basis): 65.8% glycerol, 3% water, 4.49% chlorides and 0.48% phosphates.

In order to ensure the same metabolic state of the cells in every experiment, two previous growth steps were made before each run in anaerobic conditions, bubbling commercial nitrogen before sterilization into the bottles containing the culture medium. These two previous growth steps were carried out at a temperature of 37 °C in 100 mL shaken bottles, with 90 mL of culture medium, in an orbital shaker at 210 rpm for 4.5 and 12 h, respectively. The temperature study was carried out at shaken-bottle scale, at 210 rpm with a working volume of 10 mL. The rest of variables were studied in a 2 L STBR BIOSTAT B-Plus. The initial biomass concentration was fixed at 0.1 g/L in both bottle and bioreactor scale. Culture samples were taken during each run to determine biomass concentration

Table 1
1,3-Propanediol production by different bacterial strains cultivated on substrates containing glycerol as sole or co-substrate in batch fermentations.

Glycerol type	Biocatalyst	Strain risk class [*]	Co-substrate	YP/G (g/g)	PP/G [g/L h]	References	
Pure	<i>K. pneumoniae</i>	2	–	0.75	1.53	Zhang et al. (2007)	
				0.23	0.77	Zheng et al. (2008)	
				0.51	1.70	da Silva et al. (2015)	
				0.35	1.30	Durgapal et al. (2014)	
	<i>K. oxytoca</i>	2	–	Glucose (3% w/v)	0.34	0.90	Wojtusik et al. (2015)
					0.36	0.18	Yen et al. (2014)
					0.76	0.30	Pflugl et al. (2012)
					0.66	1.42	Vieira et al. (2015)
					0.61	0.97	Drozdzyńska et al. (2014)
					0.45	0.28	Drozdzyńska et al. (2014)
					0.49	1.25	This work
Raw	<i>K. pneumoniae</i>	2	–	0.51	1.27	Jalasutram et al. (2011)	
				0.37	1.00	Rossi et al. (2013)	
				0.47	0.28	Metsoviti et al. (2012)	
	<i>K. oxytoca</i>	2	–	–	0.58	N/A	Dabrowski et al. (2012)
					0.56	0.76	Chatzifragkou et al. (2012)
	<i>C. butyricum</i>	2	–	–	0.54	1.55	Szymanowska-Powalowska (2014)
					0.45	1.19	This work

^{*} According to Integrated Taxonomy Information System (ITIS).

by optical density at 600 nm and to quantify the concentration of different metabolites by HPLC, previously removing the biomass by centrifugation (14,000×g during 10 min).

2.2. Batch STBR cultures

All variables, except temperature (see Table 2), were studied in a 2 L STBR BIOSTAT® B-Plus (Sartorius AG, Germany), with a working volume of 2000 mL and 15% (v/v) inoculum from an exponentially growing pre-culture, as indicated before. The bioreactor consisted of a non-baffled cylindrical vessel of inner diameter 13.7 cm and height 20 cm, with agitation by means of a dual six-blade Rushton turbine system (5.3 cm diameter) coupled to an electrical motor (Kollmorgen 3ΦPM, Danaher Motion, Czech Republic). The reactor was previously sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. Runs were carried out at 37 °C of temperature and the pH control strategy was monitored with a sensor (EasyFerm Plus K8 200, HAMILTON, Switzerland) coupled to the bioreactor system, pH being controlled by 2 M NaOH and 2 M HCl solutions. Cultures were carried out in micro-aerobic or anaerobic conditions, sparging air (0.04 or 0.08 vvm), nitrogen (1 vvm) or without gas supply (see Table 3). The stirring speed was fixed at 200 rpm in all runs, except in the study of this variable, in which it was changed from 100 to 400 rpm.

2.3. Analytical procedures

Biomass concentration was determined by the measurement of optical density at 600 nm (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1603) with prior calibration, where the cell dry mass (105 °C until constant weight) (CDM) and the optical density (OD₆₀₀) are related according to:

$$\text{CDM} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 0.403 \times \text{OD}_{600} \quad (1)$$

Glycerol and the main metabolic pathway products, such as 1,3-propanediol, lactic acid, succinic acid, acetic acid, formic acid and ethanol were determined by HPLC (Agilent technologies, 1100 Series), with a Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) column (300 × 7.8 mm, Phenomenex), coupled to a Waters 2414 Refractive Index Detector. The mobile phase employed was H₂SO₄ 0.005 M at a flow rate of 0.6 mL/min (Esteban et al., 2015a,b). Column temperature was controlled at 65 °C, while refractive index detector operated at 55 °C. The sample volume was 5 μL.

2.4. Calculations

All bioconversion results were referred to PDO yield (Y_{PG}) and productivity (P_{PG}), given by Eqs. (2) and (3), respectively:

Table 3

Overview of residual substrate, C_{PDO} , Y_{PG} and P_{PG} for the batch cultivations of *S. blattae* using crude glycerol.

N (rpm)	Gas supply/ Q_{Gas} (vvm)	Residual glycerol [% (w/w)]	C_{PDO} (g/L)	Y_{PG} (g/g)	P_{PG} [g/(L h)]
100	–	13.6	11.16	0.45	0.86
150	–	8.54	12.55	0.48	1.11
200	–	–	13.84	0.44	1.15
300	–	–	13.08	0.45	1.19
400	–	–	9.98	0.34	0.88
200	Air/0.04	13.4	11.52	0.39	0.96
200	Air/0.08	32.6	8.13	0.37	0.68
200	Nitrogen/1	14.5	13.33	0.48	1.11

$$Y_{PG} = \frac{C_{PDO}}{C_{G_0} - C_G} \quad (2)$$

$$P_{PG} = \frac{C_{PDO}}{t} \quad (3)$$

where C_{PDO} [g/L] is the PDO concentration at different times, C_{G_0} [g/L] is the initial glycerol concentration, C_G [g/L] is the glycerol concentration and t [h] is the fermentation time.

3. Results and discussion

3.1. Selection of the optimum process temperature

The first step of this work was the study of the temperature during the batch fermentation process, at shaken-bottle scale. Pure glycerol was used as the sole carbon source and temperature was modified from 33 to 39 °C. As can be observed in Table 2, the best results were obtained at 37 °C, where the maximum 1,3-propanediol concentration was reached. Though this value was very similar to that achieved at 39 °C, the productivity was lower at the latter temperature. During this study, the fermentation stopped in every run after 11 h, remaining 40% (w/w) of initial substrate. Since final pH values (pH_F) were virtually identical at any temperature, this study shows the possible inhibition of the process by low pH values, due to the synthesis of organic acids according to the metabolic pathway. This effect has also been reported by other authors in the literature (Azbar et al., 2010; Jolly et al., 2014; Vieira et al., 2015), indicating the importance of developing an appropriate pH control strategy in order to enhance the PDO production.

3.2. Influence of initial pH value

The fermentation was scaled-up to a STBR, varying the initial pH from 6.9 (M92x value) to 8.1, whose results are shown in Table 2 and Fig. 1. When the starting pH value was more basic, biomass growth and substrate uptake were enhanced. Higher pH_F

Table 2

Overview of C_{PDO} , Y_{PG} , residual substrate and P_{PG} for the batch cultivations of *S. blattae* using pure glycerol.

Run setup	T (°C)	pH control strategy	pH_0	pH_F	Residual glycerol [% (w/w)]	C_{PDO} (g/L)	Y_{PG} (g/g)	P_{PG} [g/(L h)]
Anaerobic bottle (10 mL)	33	Free	6.9	5.08	46.8	6.75	0.47	0.61
Anaerobic bottle (10 mL)	35	Free	6.9	5.04	38.4	8.75	0.46	0.76
Anaerobic bottle (10 mL)	37	Free	6.9	4.95	41.9	9.78	0.62	0.89
Anaerobic bottle (10 mL)	39	Free	6.9	4.94	40.6	9.52	0.62	0.86
Bioreactor (2 L)	37	Free	6.9	5.5	27.2	9.58	0.49	0.96
Bioreactor (2 L)	37	Free	7.3	5.5	28.8	9.41	0.46	0.88
Bioreactor (2 L)	37	Free	7.6	5.83	16.5	11.26	0.5	0.94
Bioreactor (2 L)	37	Free	8.1	5.67	6.68	10.21	0.41	0.64
Bioreactor (2 L)	37	Pulses	6.9	6.5	9.27	11.43	0.45	1.14
Bioreactor (2 L)	37	Controlled	6.9	6	28.9	9.04	0.51	0.9
Bioreactor (2 L)	37	Controlled	6.9	6.5	3.98	12.51	0.49	1.25

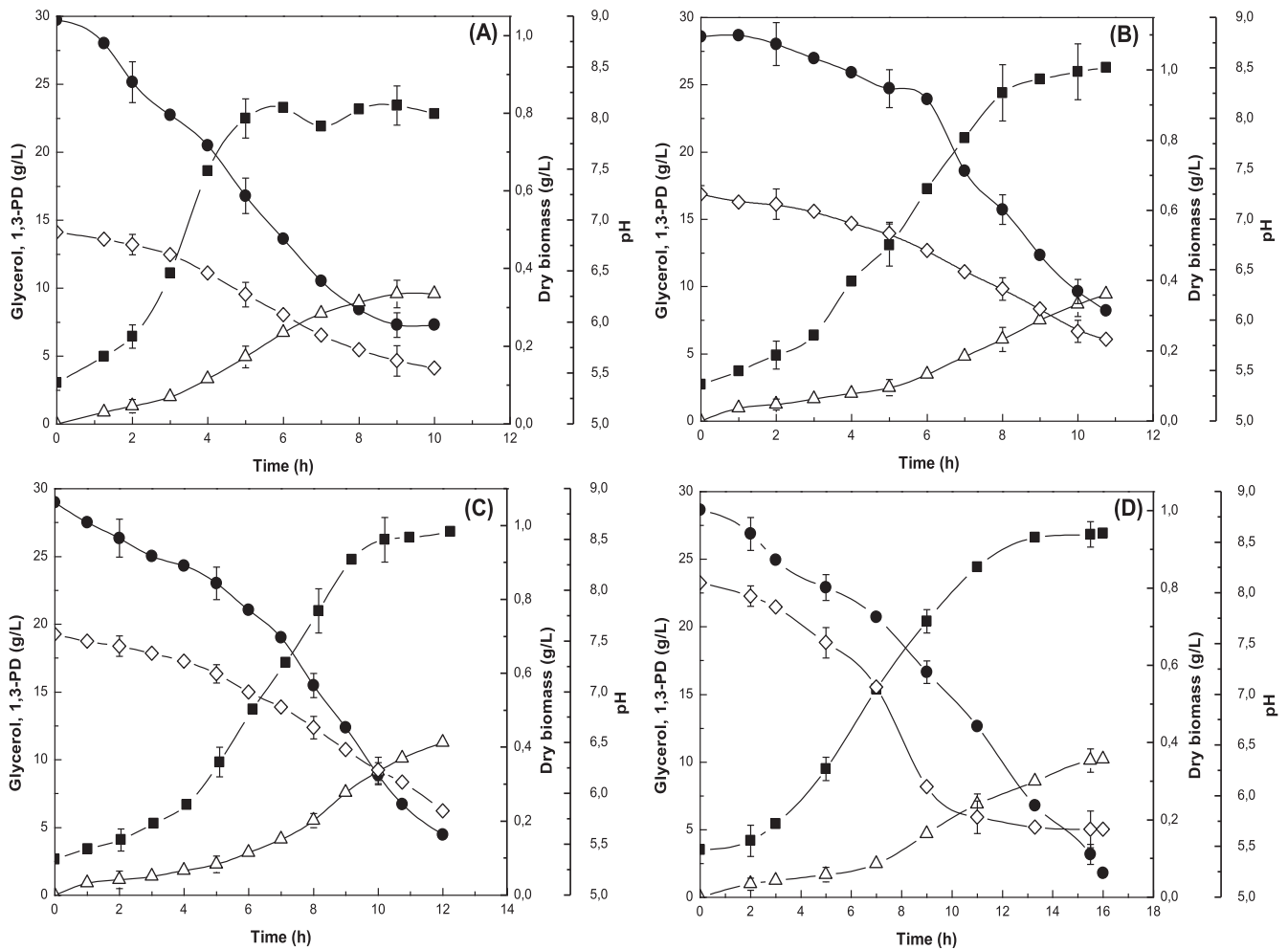


Fig. 1. Influence of initial pH in STBR batch cultivations: time of course of the concentrations of glycerol (closed circles), 1,3-propanediol (open triangles), dry biomass (closed squares) and pH (open diamonds); (A) $pH_0 = 6.9$; (B) $pH_0 = 7.3$; (C) $pH_0 = 7.6$; (D) $pH_0 = 8.1$.

values allowed for the completion of the fermentation in 16 h, reaching 11.26 g/L of PDO. However, working at a higher initial pH had a negative effect on the production rate of PDO by way of increasing the batch time necessary to reach production results comparable to those given in the literature (Wojtusik et al., 2015; Zhang et al., 2007). The highest PDO production rate was reached at pH values ranging from 6.7 to 6.0 (see Fig. 1A), which leads to conclude that this variable must be controlled within this interval to increase PDO yield and productivity.

3.3. Development of pH control strategy

The advantage of controlling the pH evolution during the 1,3-propanediol production bioprocess from glycerol has been described by several authors in the literature. Petrov and Stoyanov (2012) have developed a specific strategy called “forced pH fluctuations”, based on the introduction of consecutive pulses of base buffer with definite Δ pH amplitude during the fermentation process. This technique increases by 10% the maximal amount of PDO attained, as well as additional 22% higher productivity and 35% higher yield values (Petrov and Stoyanov, 2012). A suitable pH control (maintained at a value of 7.0) improves PDO production by *K. oxytoca* FMCC-197 from the same initial amount of raw glycerol in batch cultivations doubling the final mass to volume concentration of PDO, also obtaining 29% higher yield and reducing fermentation time from 96 to 32 h (Metsoviti et al., 2012). This strategy

was successfully tested in batch experiments with other biocatalysts, such as *K. pneumoniae* (Vieira et al., 2015), *C. freundii* (Drozdzyńska et al., 2014) and *L. diolivorans* (Pflugl et al., 2012) (see Table 1).

Due to the fact that experimental results using higher initial pH values from 6.9 led to a remarkable decrease in the PDO production rate, it was decided to start with this value, allowing for the free evolution of this variable during the first hours of the process. Thereafter, pH was controlled within the optimal range shown in the previous section (6.7–6.0), using pH forced fluctuations or maintaining it constant to 6.5 or 6.0 values (see Table 2). The best results were obtained by controlling pH at 6.5 after free evolution from 6.9. Under these conditions, PDO synthesis, substrate uptake rate and biomass growth were improved, compared with experiments without pH control (see Fig. 2A). Runs featuring pH control from 6.5 to 6.9 were very similar to each other, yet the values of yield and productivity were slightly higher when the pH forced fluctuations method was not used: 0.49 vs 0.45 g/g and 1.25 vs 1.14 g/(L h), respectively. Moreover, residual glycerol was clearly reduced when pH was controlled within 6.9–6.5, using the forced fluctuations method or keeping it constant to 6.5. These results resemble those obtained by other authors in the literature (see Table 1).

pH control allowed for better growth conditions, reaching 1.3 g/L of dry biomass by the end of the fermentation process. This improvement leads in turn to more biocatalyst production,

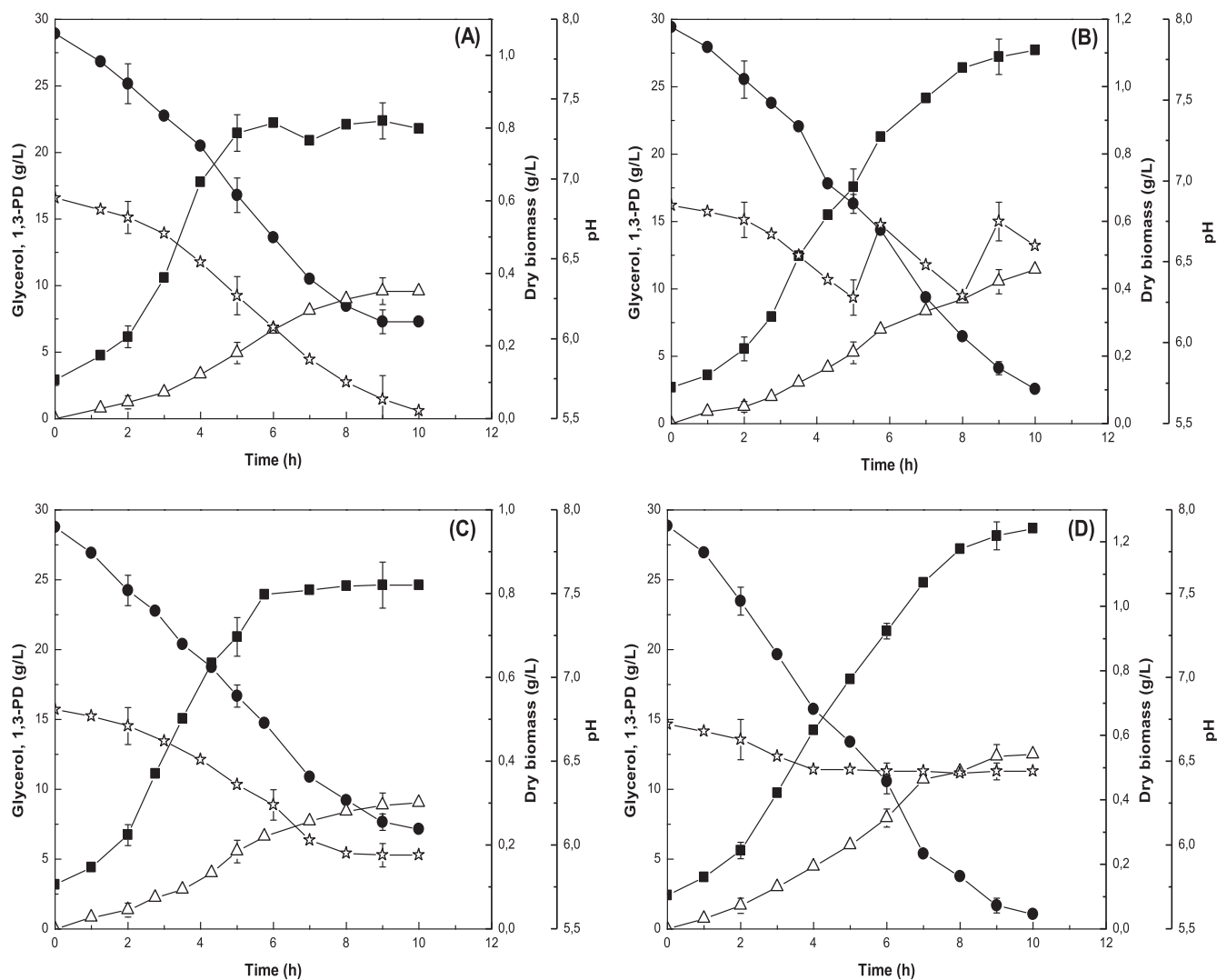


Fig. 2. Study of pH control strategy in STBR batch cultivations from pure glycerol: time of course of the concentrations of glycerol (closed circles), 1,3-propanediol (open triangles), dry biomass (closed squares) and pH (open stars); (A) uncontrolled; (B) controlled by pulses from 6.5 to 6.9; (C) controlled from 6.9 to 6; and (D) controlled from 6.9 to 6.5.

increasing substrate uptake rate and product formation and reducing the inhibitory effect of acid conditions, due to the synthesis of by-products.

3.4. Influence of the use of raw glycerol

In order to evaluate the industrial application of this bioprocess, the use of raw glycerol as substrate has been considered under the same experimental conditions as those employed in the previously described assays utilizing pure glycerol in 2 L STBR, namely: 37 °C of temperature, 200 rpm of stirrer speed, 30 g/L of initial substrate concentration and the aforementioned pH control strategy (free evolution to 6.9–6.5 and subsequent control at 6.5). The results are shown in Table 3, where it can be seen that the final concentration of 1,3-propanediol was higher than that obtained with pure glycerol, while yield and productivity were slightly lower (see Tables 2 and 3). No residual glycerol was observed after 12 h and the biomass growth was higher with raw glycerol (1.5 g/L, see Figs. 2D and 3C). This phenomenon could be ascribed to the presence of phosphates and salts in raw glycerol, which can help to buffer pH medium in the early stages of the fermentation, improving growth, uptake substrate and PDO production rates

(Chatzifragkou et al., 2012; Jalasutram et al., 2011; Metsoviti et al., 2012). Considering these results, raw glycerol has been employed to determine the optimal stirring speed and the effect of sparging gas (air or nitrogen) during fermentation.

3.5. Study of the stirring speed

The influence of the stirring speed employing raw glycerol has been evaluated in STBR under the previously described batch conditions. Five different stirring conditions were tested from 100 to 400 rpm (see Table 3). The consumption of initial substrate increased as stirring speed escalated, improving C_{PDO} yield and productivity values. From 200 to 400 rpm of stirrer speed, no residual glycerol was detected in HPLC analysis after at 12 h. Biomass growth was affected from 300 rpm, a fact more clearly observed at 400 rpm (see Fig. 3E), where microbial growth rate was lower and the total dry biomass measured was reduced by 12%. This decline involved a decrease in PDO production, in terms of final concentration, yield and productivity. This stirring speed study reflected that 1,3-propanediol is a product partially associated to growth, which leads to conclude that microbial growth and product synthesis were closely coupled and interdependent. PDO

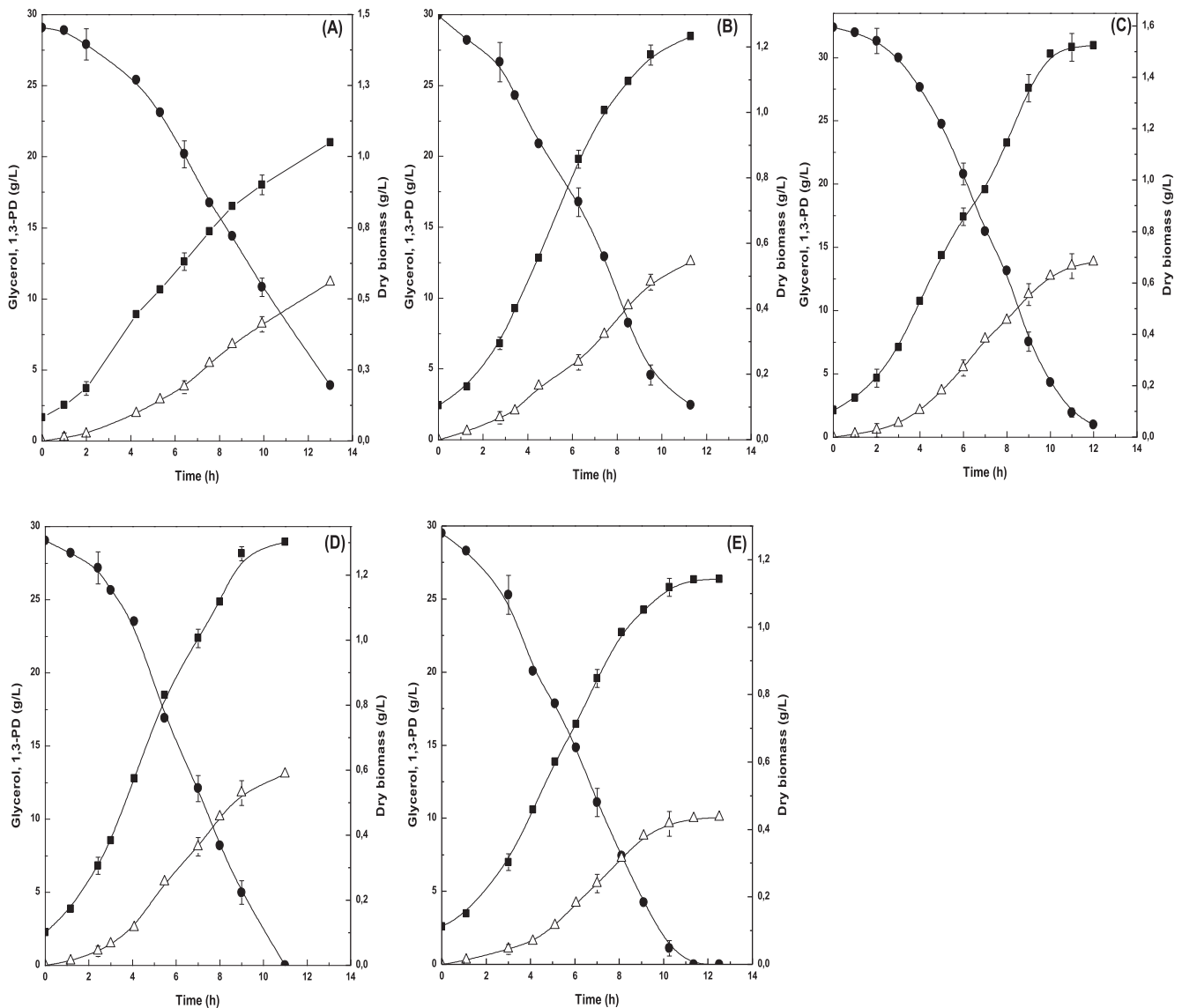


Fig. 3. Results of the runs carried out at different stirring speed in STBR batch cultures using raw glycerol. Time of course of glycerol (closed circles), 1,3-propanediol (open triangles) and dry biomass (closed squares); (A) $N = 100$ rpm; (B) $N = 150$ rpm; (C) $N = 200$ rpm; (D) $N = 300$ rpm; and (E) $N = 400$ rpm.

production results were very similar when the stirring speed employed was 200 and 300 (see Fig. 3). Due to the need of reducing operational process costs, 200 rpm was selected as the optimal stirring speed value in bioreactor batch cultures.

3.6. Study of aeration strategy

S. blattae is an anaerobic facultative bacterial strain. Recent works employing microorganisms with similar metabolic pathways highlight the importance of studying the influence of aeration strategies in the bioprocess development (Wang et al., 2011). Small airflow supplied as sparged bubbles from the bottom of the reactor can increase the specific activity of glycerol dehydratase improving PDO production and yield under high glycerol concentrations (Wang et al., 2011; Zheng et al., 2008). Based on airflow values employed in the literature, an experimental plan was designed, testing three aeration conditions of air (0.04 and 0.08 vvm) and nitrogen (1 vvm). The results are presented in Fig. 4, comparing the profile concentrations of biomass, glycerol, PDO and organic acids in different runs without gas supply

(Fig. 4A). For this system, the air supply failed to bring any improvement in the conversion of the bioprocess, compared to runs in the absence of gas (see Table 3). Total PDO concentration was sharply reduced when airflow was increased and high quantities of residual glycerol (13.4% at 0.04 vvm and 32.6% at 0.08 vvm) were detected. Moreover, biomass growth rate was clearly negatively affected by oxygen supply, especially at longer times, in the latter part of the batch experiment (see Fig. 4B and C).

Supplying high nitrogen gas flow to create a completely anaerobic environment did not provide any better results than batches in the absence of gas. Substrate uptake rate was lower when nitrogen was present during fermentation, remaining 14.5% of residual glycerol at 12 h. Yield and productivity values were slightly higher than those obtained in the run carried out without gas supply, and the total concentration of PDO obtained were very similar to each other. The synthesis of organic acids (lactic, succinic, acetic, formic) was not affected by air or nitrogen supply, since these concentration profiles were very similar in the different conditions employed, except in the run with the highest airflow (Fig. 4C), where the final concentration of by-products was lower, because

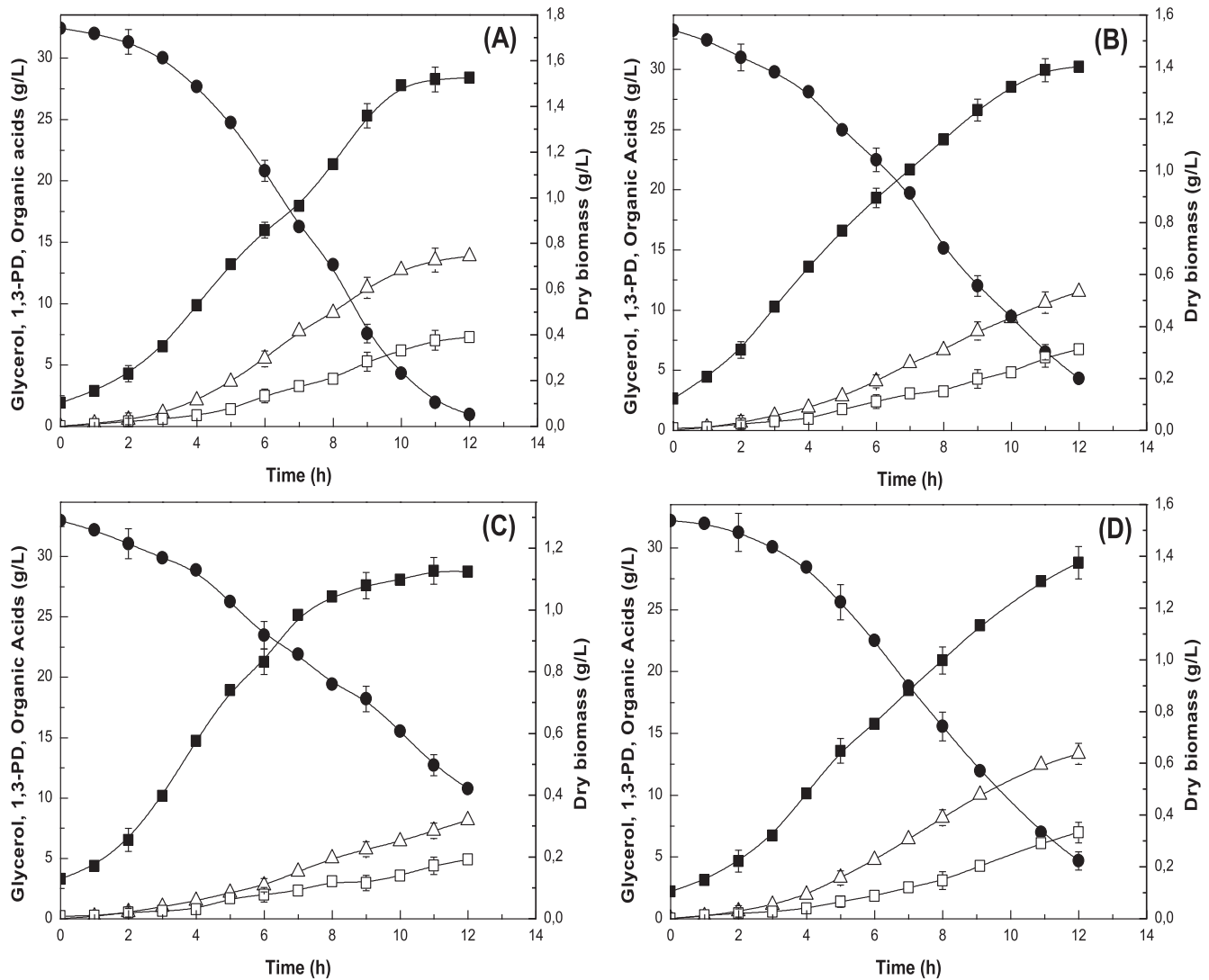


Fig. 4. Influence of gas supply during STBR batch cultivations from raw glycerol: time of course of the concentrations of glycerol (closed circles), 1,3-propanediol (open triangles), organic acids (open squares) and dry biomass (closed squares); (A) gasless batch; (B) air, 0.04 vvm; (C) air, 0.08 vvm; and (D) nitrogen, 1 vvm.

the glycerol conversion was much slower compared to the rest of the runs.

3.7. Kinetics of 1,3-propanediol production bioprocess

The evolutions throughout time of the concentrations of biomass, glycerol and PDO in all the runs conducted under different operational conditions are given in Figs. 1–4. Moreover, in Figs. 1 and 2, the evolution of pH is shown, and in Fig. 4, the concentrations of the main by-products are added.

Fig. 1 depicts the influence of the initial pH values in the different runs in which this variable is not controlled, i.e., it was allowed to vary freely. As can be seen, when the initial pH is increased, all the rates decrease; thus, glycerol uptake, PDO production and growth rates are smaller when the initial pH is increased from 6.9 to 8.1. Nevertheless, the maximum biomass and 1,3-propanediol concentrations are very similar from one run to another, around 0.9–1 g/L and 10 g/L, respectively, although the time needed increases at higher initial pH.

The effect of pH control is shown in Fig. 2. As can be observed, when the pH value is not allowed to reach a value under 6.5, the substrate uptake rate and the PDO production rates are much

higher than those attained when the pH takes lower values. Also, in the case of control of pH at 6.5, the maximum biomass concentration is higher, although the growth rates are similar in all cases. As previously indicated, the maximum PDO concentration is reached when the pH is controlled from 6.9 to 6.5.

The effect of stirring speed is given in Fig. 3. In this figure it is evident that the rates of glycerol uptake, growth and PDO production, increase as the stirring speed intensifies from 100 to 200 rpm. For stirrer speed higher than 200 rpm, the results are similar, although this may not be evident for growth rate. The latter effect must be due to the fact that the concentration of the carbon source, glycerol, decreases to zero. The maximum PDO production rate is observed at 200 and 300 rpm of stirring speed, then falling when 400 rpm is used.

Finally, Fig. 4 shows the influence of gas supply (air, nitrogen or no gas supply). As can be seen, when air is bubbled, all the rates decline the rates of glycerol uptake, growth, PDO production and even that of the by-product production. This means that the bacterial metabolism is negatively affected by the presence of oxygen. The best results, as previously indicated, are reached in the run conducted without any gas supply under strict anaerobic conditions. PDO production by *S. blattae* ATCC 33430 using raw glycerol

as sole carbon substrate was very similar to other previous works that employed risk class 2 strains (see Table 1). Recently published studies carried out by other class 1 strains have reached promising amount of PDO (yielding 0.66 g/g and productivities of 1.42 g/(L h)), although its viability has not been tested using raw glycerol yet (Vieira et al., 2015).

4. Conclusions

S. blattae ATCC 33430 is presented as a class 1 suitable biocatalyst for the conversion of glycerol into 1,3-propanediol, studying several process variables at shaken bottle and STBR batch cultivations. The optimal culture was carried out employing 30 g/L of substrate, a temperature of 37 °C, controlling pH at 6.5 after free evolution from 6.9, with a stirring speed of 200 rpm and without any gas supply. Further conversion was also tested using raw glycerol, reaching similar results to those obtained with pure glycerol: 13.84 g/L of 1,3-PDO, with a yield of 0.44 g/g and a productivity of 1.15 g/(L h).

Acknowledgements

This work has been supported under contracts: CTQ2013-45970-C2-1-R (BLICEL); PCIN-2013-021-C02-01 (POAP) and CTQ2010-15460 (VALOGLI).

References

- Andres, S., Wiezer, A., Bendfeldt, H., Waschkowitz, T., Toeche-Mittler, C., Daniel, R., 2004. Insights into the genome of the enteric bacterium *Escherichia blattae*: cobalamin (B12) biosynthesis, B12-dependent reactions, and inactivation of the gene region encoding B12-dependent glycerol dehydratase by a new mu-like prophage. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8 (3), 150–168.
- Azbar, N., Gungormusler, M., Gonen, C., 2010. Effect of feed concentration on microbial 1,3 propanediol production via *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biotechnol.* 150, S36–S37.
- Chatzifragkou, A., Aggelis, G., Gardeli, C., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Papanikolaou, S., 2012. Adaptation dynamics of *Clostridium butyricum* in high 1,3-propanediol content media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (6), 1541–1552.
- da Silva, G.P., de Lima, C.J.B., Contiero, J., 2015. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catal. Today* 257, 259–266.
- Dabrowski, S., Zablotna, E., Pietrewicz-Kubicz, D., Dfugolecka, A., 2012. Screening of environmental samples for bacteria producing 1,3-propanediol from glycerol. *Acta Biochim. Pol.* 59 (3), 353–356.
- Drozdzyńska, A., Pawlicka, J., Kubiak, P., Kosmider, A., Pranke, D., Olejnik-Schmidt, A., Czaczyk, K., 2014. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – newly isolated strains from the Enterobacteriaceae. *New Biotechnol.* 31 (5), 402–410.
- Durgapal, M., Kumar, V., Yang, T.H., Lee, H.J., Seung, D., Park, S., 2014. Production of 1,3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. *Bioresour. Technol.* 159, 223–231.
- Esteban, J., Fuente, E., Blanco, A., Ladero, M., García-Ochoa, F., 2015a. Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements. *Chem. Eng. J.* 260, 434–443.
- Esteban, J., Ladero, M., García-Ochoa, F., 2015b. Liquid–liquid equilibria for the systems ethylene carbonate + ethylene glycol + glycerol; ethylene carbonate + glycerol carbonate + glycerol and ethylene carbonate + ethylene glycol + glycerol carbonate + glycerol at catalytic reacting temperatures. *Chem. Eng. Res. Design* 94, 440–448.
- Gungormusler, M., Gonen, C., Ozdemir, G., Azbar, N., 2010. 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. *New Biotechnol.* 27 (6), 782–788.
- Heinrich, D., Andreessen, B., Madkour, M.H., Al-Ghamdi, M.A., Shabbaj, I.I., Steinbuechel, A., 2013. From waste to plastic: synthesis of poly(3-hydroxypropionate) in *Shimwellia blattae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (12), 3582–3589.
- Jalasutram, V., Jetty, A., Anupaju, G.R., 2011. Fermentative conversion of raw glycerol into 1,3-propanediol by isolated *Klebsiella pneumoniae* 141B stain: optimization of culture variables. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (80), 18493–18502.
- Jin, P., Li, S., Lu, S.G., Zhu, J.G., Huang, H., 2011. Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation. *Bioresour. Technol.* 102 (2), 1815–1821.
- Johnson, D.T., Taconi, K.A., 2007. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ. Prog.* 26 (4), 338–348.
- Jolly, J., Hitzmann, B., Ramalingam, S., Ramachandran, K.B., 2014. Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: effect of operating variables. *J. Biosci. Bioeng.* 118 (2), 188–194.
- Kaur, G., Srivastava, A.K., Chand, S., 2012. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem. Eng. J.* 64, 106–118.
- Luque, R., Melero, J.A., 2012. 1 – Introduction to advanced biodiesel production. In: Luque, R., Melero, J.A. (Eds.), *Advances in Biodiesel Production*. Woodhead Publishing, pp. 1–9.
- Metsoviti, M., Paraskevaidi, K., Koutinas, A., Zeng, A.P., Papanikolaou, S., 2012. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochem.* 47 (12), 1872–1882.
- Petrov, K., Stoyanov, A., 2012. Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35 (3), 317–321.
- Pflugl, S., Marx, H., Mattanovich, D., Sauer, M., 2012. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*. *Bioresour. Technol.* 119, 133–140.
- Rhee, J.I., Bode, J., DiazRicci, J.C., Poock, D., Weigel, B., Kretzmer, G., Schugerl, K., 1997. Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM109 and on the production of the fusion protein EcoRI::SPA. *J. Biotechnol.* 55 (2), 69–83.
- Rossi, D.M., de Souza, E.A., Flores, S.H., Ayub, M.A.Z., 2013. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Renewable Energy* 55, 404–409.
- Seyfried, M., Daniel, R., Gottschalk, G., 1996. Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *J. Bacteriol.* 178 (19), 5793–5796.
- Szymanowska-Powalowska, D., 2014. 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. *Electron. J. Biotechnol.* 17 (6), 322–328.
- Vieira, P.B., Kilikian, B.V., Bastos, R.V., Perpetuo, E.A., Nascimento, C.A.O., 2015. Process strategies for enhanced production of 1,3-propanediol by *Lactobacillus reuteri* using glycerol as a co-substrate. *Biochem. Eng. J.* 94, 30–38.
- Wang, Y., Teng, H., Xiu, Z., 2011. Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (6), 705–715.
- Witt, U., Muller, R.J., Augusta, J., Widdecke, H., Deckwer, W.D., 1994. Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. *Macromol. Chem. Phys.* 195 (2), 793–802.
- Wojtusik, M., Rodríguez, A., Ripoll, V., Santos, V.E., García, J.L., García-Ochoa, F., 2015. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. *Biotechnol. Rep.* 6, 100–107.
- Yen, H.-W., Li, F.-T., Chang, J.-S., 2014. The influences of pH control strategies on the distribution of 1,3-propanediols and 2,3-butanediols production by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-W55. *Bioresour. Technol.* 159, 292–296.
- Zeng, A.-P., Biebl, H., 2002. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 74, 239–259.
- Zeng, A.P., Sabra, W., 2011. Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (6), 749–757.
- Zhang, G.L., Ma, B.B., Xu, X.L., Li, C., Wang, L.W., 2007. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Eng. J.* 37 (3), 256–260.
- Zheng, Z.-M., Cheng, K.-K., Hu, Q.-L., Liu, H.-J., Guo, N.-N., Liu, D.-H., 2008. Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Eng. J.* 39 (2), 305–310.

Publicación 3

Autores: Alberto Rodríguez, Mateusz Wojtusik, Florina Masca, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa

Título: Kinetic modeling of 1,3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: Influence of the initial substrate concentration

Revista: Biochemical Engineering Journal 117 (2017), pp. 57-65

Índice de impacto (2015): 2,463

Área: Ingeniería Química.

Resumen

Esta publicación supone una continuación del estudio anterior. En este trabajo, se estudia la influencia de la concentración inicial de glicerol crudo en STBR operando en discontinuo y con células en crecimiento. En concreto, se probaron concentraciones de sustrato entre 20 y 65 g/L, evaluando la producción de los distintos metabolitos de la ruta de los ácidos mixtos, el crecimiento de la biomasa y el consumo del sustrato carbonado. Además de evaluar la distribución del flujo de carbono en función de la cantidad inicial de glicerol, se ha propuesto un modelo cinético para describir los resultados experimentales obtenidos.

El aumento de la concentración inicial de glicerina influye negativamente en la velocidad de crecimiento de la biomasa, siendo este efecto mucho más acusado cuando la concentración inicial de glicerol crudo supera los 40 g/L. Los mejores resultados, en cuanto a producción de 1,3-PD, se alcanzan a partir de 30 g/L de sustrato. Si esta concentración es superior descienden el rendimiento y la productividad alcanzados, especialmente cuando el glicerol inhibe el crecimiento de la biomasa. Con respecto a la distribución del flujo de carbono, se encuentra fuertemente influida por la cantidad de sustrato inicial: si se parte de entre 20 y 40 g/L de glicerol, el flujo metabólico se dirige hacia la producción de 1,3-PD y ácido acético, mientras que si la concentración inicial se encuentra entre 47 y 65 g/L, el metabolismo se desplaza hacia la síntesis de etanol y ácido láctico.

El modelo cinético propuesto está formado por un conjunto de ecuaciones diferenciales dependientes de las concentraciones de glicerina y biomasa para describir la evolución del 1,3-PD, los sub-productos (agrupados mediante *lumping*) y el glicerol, mientras que la biomasa se ha modelizado a través de la ecuación logística de crecimiento. El balance de carbono se ha cerrado considerando que la cantidad no cuantificada de este elemento por las diversas técnicas de análisis, descritas en la publicación, se ha dirigido a la síntesis de dióxido de carbono, compuesto también considerado en la formulación del modelo.

La evolución cuantitativa de los parámetros cinéticos demuestra la influencia de la concentración del sustrato inicial sobre el proceso. El modelo propuesto es capaz de

describir los resultados experimentales obtenidos en todos los experimentos, cumpliendo con una serie de criterios estadísticos, lo que da idea de la validez del modelo.

Es de destacar que el modelo es capaz de ajustarse bien a los resultados de seis experimentos realizados en distintas condiciones iniciales.



Regular article

Kinetic modeling of 1,3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: Influence of the initial substrate concentration



Alberto Rodriguez, Mateusz Wojtusik, Florina Masca, Victoria E. Santos*, Felix Garcia-Ochoa

Chemical Engineering Department, Faculty of Chemistry, University Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2016
 Received in revised form
 23 September 2016
 Accepted 26 September 2016
 Available online 28 September 2016

Keywords:

1,3-propanediol
 Glycerol valorization
Shimwellia blattae
 Kinetic model

ABSTRACT

1,3-propanediol (PDO) production from raw glycerol using *Shimwellia blattae* ATCC 33430 has been studied. Batch cultures of *S. blattae* under anaerobic conditions have been carried out changing the initial substrate concentration. A kinetic model is proposed to describe the evolution of experimental glycerol, biomass, PDO and by-products concentrations, achieved at different times. The model is able to simulate adequately the experimental data of runs conducted at six different initial raw glycerol concentrations and the parameter values describe the influence of initial substrate concentration on the metabolism of the bacteria. The process was clearly inhibited by initial glycerol concentration from 57.8 g/L, affecting the biomass growth, the PDO production and the by-products metabolic flux, that wended up to lactic acid and ethanol synthesis. The best PDO production results were obtained when using around 30 g/L of initial glycerol concentration, reaching 13.6 g PDO/L, with a yield of 0.49 g/g and a productivity of 1.36 g/(L h).

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of renewable energy sources has become a major priority to the worldwide in recent years in order to satisfy the global energy demand and to stop the effects of fossil fuels exploitation [1]. Biodiesel (FAME), the result of the transesterification of triglycerides with alcohols (usually methanol, but also ethanol), is one of the most important alternatives in this area and its production has to be increased to the point of replacing 20% in the European Union of all on-road diesel by the year 2020 with the pursuit of second generation fuels [2]. However, the biodiesel production involves the generation of raw glycerol, so called because its higher content of impurities, as a waste product in amounts of 10% (w/w) referred to biodiesel produced [3]. The valorization of this by-product is fundamental in order to ensure the economic viability of the process and its integration in a biorefinery concept by its conversion into high added value feed-stocks [4].

1,3-propanediol (PDO) is a promising chemical platform for many synthetic reactions, especially in polymer industry as a monomer of poly-trimethylene-terephthalate (PTT), a bioplastic

with excellent properties in fiber area [5]. Also, PDO is employed for other uses, such as the production of adhesives, solvents, detergents, cosmetics and resins [6]. The bio-conversion of crude glycerol into PDO represents a cheaper, more selective and easier downstream treatment process to increase the value of residual glycerol [6,7]. This bioprocess is carried out through the mixed acid route, where glycerol is degraded through two main routes: an oxidative pathway, releasing a mixture of short chain organic acids (succinic, acetic, lactic) and alcohols (2,3-butanediol, acetoin, ethanol), and a reductive pathway producing 1,3-propanediol (PDO) via 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA). The activity of the enzymes glycerol dehydratase (GDHt), which catalyzes the conversion of glycerol to 3-HPA, and PDO dehydrogenase (PDODH), which transforms the 3-HPA into PDO is regulated by their cofactors (coenzyme B₁₂ and NADH, respectively) [7–9].

Bioprocess production of PDO from glycerol can be made by several bacterial strains, most of them belonging to the genera *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter* and *Lactobacillus* [6,10]. The best results have been reported using fed-batch fermentations with engineered strains of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic or micro-aerobic conditions. In the literature, the effects of several variables on the process have been studied, such as pH and substrate feeding control [11–13], considering the influence of employing raw glycerol as sole carbon substrate [14] or the use of hemicellulosic hydrolysates as co-substrate to improve

* Corresponding author.

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

Nomenclature

<i>b</i>	Molar yield ratio between ammonia and glycerol in Eq. (12) (mol NH ₃ /mol G)
<i>C</i>	Referred to concentrations of biomass, glycerol, PDO, by-products and CO ₂ (g/L)
<i>c</i>	Molar yield ratio between biomass and glycerol in Eq. (12) (mol X/mol G)
<i>d</i>	Molar yield ratio between CO ₂ and glycerol in Eq. (12) (mol CO ₂ /mol G)
<i>e</i>	Molar yield ratio between water and glycerol in Eq. (12) (mol H ₂ O/mol G)
<i>F</i>	Statistical term of F-test
<i>HPLC</i>	High-performance liquid chromatography
<i>K</i>	Kinetic constants (units depend on the equations)
<i>M</i>	Number of parameters of a proposed model
<i>N</i>	Total number of experimental data
<i>OD</i>	Optical density measured with spectrophotometry in Eq. (1)
<i>P</i>	Referred to PDO productivity [g/(Lh)]
<i>r</i>	Reaction rate [g/(Lh)]
<i>R</i>	Production rate [g/(Lh)]
<i>RMSE</i>	Residual mean squared error
<i>SSQ_i</i>	Sum of squared residues respect to the calculated value of “i” variable
<i>SSQ_{mea}</i>	Squared sum of deviations between the experimental and the mean score respect to the calculated values of the variable
<i>SSR</i>	Sum of squared residues
<i>STBR</i>	Stirred tank bioreactor
<i>t</i>	Referred to time (h)
<i>VE</i>	Variation explained of a nonlinear regression fitting
<i>Y</i>	Referred to mass yield values of PDO and BP (g/g)
<i>y_i</i>	Experimental or calculated values of “i” variable

Chemical compounds

<i>3-HPA</i>	3-hydroxypropionaldehyde
<i>BP</i>	Referred to the sum of the by-products from the oxidative route in the liquid phase
<i>CO₂</i>	Carbon dioxide
<i>FAME</i>	Fatty acid methyl-esters
<i>G</i>	Glycerol
<i>GDHt</i>	Glycerol dehydrogenase
<i>NADH</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<i>PDO</i>	1,3-propanediol
<i>PDODH</i>	1,3-propanediol dehydrogenase
<i>PTT</i>	Polymethyleneterephthalate

Greek letters

γ_I	Heteroscedasticity parameter of Aspen Custom Modeler in Eqs. (5)–(7)
μ	Maximum biomass growth rate (h ⁻¹)
$\nu_{G/j}$	Coefficients representing the relationship between glycerol consumption and “j” production (g/g)
η_{PBP}	Reductive pathway efficiency (g PDO/g BP)

Subscripts

<i>0</i>	Initial concentrations of glycerol or biomass in a single run (g/L)
<i>600</i>	Referred to wave length employed in optical density measurements (nm)
<i>1, 2</i>	Referred to kinetic constants in Eqs. (16) and (17)
<i>1, 2, 3, 4</i>	Referred to reactions 1, 2, 3 and 4 in Fig. 2
<i>BP</i>	Referred to the sum of by-products in the liquid phase

<i>BPG</i>	Referred to BP yield (g/g)
<i>cal</i>	Referred to a calculated value of a variable
<i>CO₂</i>	Referred to carbon dioxide
<i>exp</i>	Referred to the experimental value of a variable
<i>G</i>	Referred to glycerol
<i>M</i>	Referred to microbial maintenance in Eq. (18) [L/(g h)]
<i>PDO</i>	Referred to 1,3-propanediol
<i>PG</i>	Referred to PDO yield (g/g) or productivity [g/(Lh)]
<i>tab</i>	Referred to F value given by F-test tables
<i>X</i>	Referred to biomass
<i>X</i>	Average carbon content in by-products molecular formula in Eq. (12)
<i>Y</i>	Average hydrogen content in by-products molecular formula in Eq. (12)
<i>Z</i>	Average oxygen content in by-products molecular formula in Eq. (12)

Superscripts

<i>max</i>	Maximum value of the following process variables: biomass, PDO and BP concentrations (g/L) and batch fermentation time (h).
<i>min</i>	Minimum value of glycerol concentration in a single batch (g/L)
<i>waste</i>	Referred to not consumed glycerol in a single batch [% (w/w)]

PDO production [15]. The yield and productivity reported values are 0.62–0.70 g/g and 1.2–2.3 g/(Lh), respectively (see Table 1).

Focusing on the batch cultivation results, there are some interesting works with other bacterial strains such as *Lactobacillus reuteri*, where pH, micro-aerobic and anaerobic conditions were studied [16]; *Citrobacter freundii*, evaluating temperature and pH operating values [17]; and *Klebsiella oxytoca*, determining medium composition by experimental design and developing a programmed stirring rate strategy at bioreactor scale [18] (see Table 1). The employment of *Shimwellia blattae* as biocatalyst have reached competitive production results from raw glycerol in batch cultures [19]. This strain is also employed in several bioprocesses: the synthesis of 3-HPA derived biopolymer, poly(3-hydroxy-propionate) in engineered strains [20–22], the production of the reductive dehalogenases involved in the dehalogenation of organohalides [23], and the fermentative production of 1-propanol from sugars [24].

The kinetics of PDO from glycerol bioprocess have been previously described in some works, depicting a chemical reactions network together with a series of kinetic expressions for biomass, substrate and PDO production rates [25]. The most recent work employs a similar equation as Monod's to reproduce biomass growth, taking into account substrate or by-product inhibition in *C. diolis* and *K. pneumoniae* fed-batch cultivations [7,26,27]. These kinetic models proposed in the literature are usually able to describe the results of a single experiment, that is, with all the initial conditions fixed. Usually, in all the cases, for model parameter calculation a convergence criterion to optimize a multivariable function is employed, being the most common that one defined as the minimal sum of squared weighted residues of all variables described in each experiment [7].

In the present work the influence of initial raw glycerol concentration on carbon metabolic fluxes in PDO production employing *S. blattae* ATCC 33430 as biocatalyst at bioreactor scale is studied

(using the batch conditions previously proposed by Rodriguez et al. [19]). The aim of this work is the proposal of a kinetic model able to describe biomass, substrate, PDO and by-products concentration evolutions for experiments conducted at different initial substrate concentrations, through a set of kinetic parameters obtained by minimizing the difference between the model simulation and the experimental kinetics data.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and medium employed

S. blattae ATCC 33430 was the biocatalyst used in this study. It was maintained at -80°C in 50% w/w glycerol/saline serum medium before inoculum built up. M92x medium was employed in all cultures, with the following composition (per liter deionized water): 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 and 1.5 g of yeast extract [28]. The inoculum built up is carried up in two stages in 100 mL bottles containing 90 mL of culture medium with 30 g/L of pure glycerol in order to ensure the same metabolic state of cells. The inoculated bottles were cultured at 37°C and agitated at 210 rpm in an orbital shaker for 4.5 and 12 h, respectively. Nitrogen was bubbled into the culture medium to reach anaerobic conditions before sterilization. The initial biomass concentration was fixed at 0.1 g/L in both the stirred tank bioreactor (STBR) and at the shaken bottle scale. Six raw glycerol samples coming directly from a biodiesel production plant, were employed in this work. The raw glycerol samples had different composition, being subjected to a simple purification method with different steps, such as sweeping along by airflow to remove methanol and decanting to eliminate FAMES, soaps and glycerides. After this purification or stabilization step, the composition of the glycerol used in the different runs was only glycerol, water, chlorides and phosphates, but in a very different percentage (w/w basis): 57.9–83.2% glycerol, 9.4–28.5% water, 2.64–4.27% chlorides and 0.37–5.16% phosphates.

Six experiments were performed three times in STBR batch cultivations, changing the initial glycerol concentration from 20 to 70 g/L by introducing the needed volume from the pretreated sample of raw glycerol employed in each run/replicate. During each run, liquid samples were withdrawn from the vessel in order to determine the biomass concentration and the broth composition.

2.2. Batch STBR cultures procedure

The experiments with different initial substrate concentrations were carried out in a 3 L STBR BIOSTAT B-Plus (Sartorius AG, Germany), with a working volume of 2000 mL and it was inoculated using an inoculum -15% (v/v)- from an exponential growing pre-culture phase, as indicated above. The bioreactor is formed by a non-buffed cylindrical vessel (13.7 cm inner diameter, 20 cm height), stirred by a dual six-blade Rushton turbine system (5.3 inner diameter) coupled to an electrical motor (Kollmorgen 3ΦPM, Danaher Motion, Czech Republic). The bioreactor was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min before inoculation. Experiments were carried out under the operational conditions determined in a previous work [19]: 37°C of temperature, 200 rpm of stirring speed, without gas supply during the fermentation, and bubbling nitrogen before inoculation in order to ensure anaerobic conditions. pH was maintained at 6.5 before free evolution from 6.9 by the addition of 2 M NaOH and 2 M HCl solutions. Initial raw glycerol concentration was changed from 20 to 70 g/L. The real values of these initial concentrations are shown in Tables 2–4.

2.3. Analytical methods

The concentration of biomass (C_X) was measured by means of the determination of the optical density of the culture at 600 nm (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1603, Japan), relating the sample absorbance (OD_{600}) with the cell dry biomass (g L^{-1}) according to the Eq. (1):

$$C_X (\text{g/L}) = 0.403 \times OD_{600} \quad (1)$$

The concentrations of glycerol, PDO and the main by-products of metabolic pathway such as succinic, lactic, acetic acids and ethanol were determined by a HPLC (Agilent Technologies 1100 Series, USA), using a Rezex ROA-Organic Acid H^+ (8%) column (300×7.8 mm, Phenomenex, USA), coupled to a Waters 2414 Refractive Index Detector, working at 55°C . The mobile phase employed was H_2SO_4 0.005 M at a flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was controlled at 80°C and the sample volume was 5 μL [18].

2.4. Mathematical methods

The data obtained from the batch fermentations carried out were used for the kinetic modeling of the process. The model was fitted to experimental data using Aspen Custom Modeler® (Aspen-Tech, USA), taking into account five different responses: biomass, substrate, PDO, CO_2 and by-products (lumped as a single chemical compound as shown in previous works [29,30]) concentrations. The set of differential equations forming the kinetic model were integrated using an implicit Euler method, as previously described [29,31,32]. The model parameters were estimated by minimizing the difference between experimental observations and model simulation according to “least squares method” [33] by an adaptive non-linear least-squares algorithm (NL2SOL).

The validation of the fittings was performed on the basis of physicochemical and statistical criteria, including F-Fisher's value (F), the sum of squared residuals (SSR), the residual mean squared error ($RMSE$) and the variation explained (VE) [34,35].

F test is based on the null hypothesis and backs the validation of the model to the observed data of the experimental variables. It is defined according the following equation:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N \left(\frac{y_{i,calc}}{M} \right)^2}{\sum_{i=1}^N \frac{SSR}{N-M}} \quad (2)$$

where N is the total number of experimental data, M is the number of parameters in the model; $y_{i,calc}$ and $y_{i,exp}$ are the experimental and calculated values of the variable, respectively, and SSR is the squared sum of residues, $(y_{i,exp} - y_{i,calc})^2$. If F calculated (F_{calc}) by the Eq. (2) is higher than its tabulated value for the same degrees of freedom ($F_{M,N-M}$ or F_{tab}) for a determined confidence interval value (95% by default in Aspen Custom Modeler®) [35].

The parameter $RMSE$ represents a measure of the global difference between the predicted and experimental values, because it includes the total amount of available data and the number of parameters of the model, through the Eq. (3) [34]:

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{N-M}} \quad (3)$$

VE is given by Aspen Custom Modeler® as a percentage, given by:

$$VE (\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^L SSQ_l}{\sum_{l=1}^L SSQ_{meanl}} \right) \quad (4)$$

where SSQ_l and SSQ_{meanl} are the sum of the quadratic residues and the squared sum of deviations between the experimental and the

Table 1
1,3-propanediol production by several bacterial strains operating in fed-batch or batch conditions.

Microorganism	Risk group (*)	Glycerol type	Operation mode	C_{PDO}^{max} (g/L)	Y_{PG} (g/g)	P_{PG} [g/(L·h)]	Reference
<i>C. butyricum</i>	2	Pure	Fed-batch	65	0.69	1.21	[40]
<i>C. butyricum</i>	2	Raw		76.2	0.62	2.3	[12]
<i>K. pneumoniae</i>	2	Pure		70	0.7	0.97	[11]
<i>K. pneumoniae</i>	2	Pure		71.6	0.65	1.93	[15]
<i>K. pneumoniae</i>	2	Pure	Batch	12.2	0.75	1.53	[41]
<i>K. oxytoca</i>	2	Pure		13.6	0.34	0.9	[18]
<i>L. reuteri</i>	1	Pure		10.6	1.42	0.66	[16]
<i>C. freundii</i>	2	Pure		23	0.61	0.97	[17]
<i>S. blattae</i>	1	Raw		13.8	0.44	1.15	[19]

(*) Classification according to German Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA).

Table 2
Experimental results of PDO production carried out at different initial substrate concentrations: initial glycerol (C_{G0}), maximum PDO concentration (C_{PDO}^{max}), maximum by-products concentration (C_{BP}^{max}), residual glycerol (C_G^{waste}), PDO yield (Y_{PG}), productivity (P_{PG}), BP yield (Y_{BPG}) and reductive pathway efficiency (η_{PBP}).

C_{G0} (g/L)	C_{PDO}^{max} (g/L)	C_{BP}^{max} (g/L)	C_G^{waste} [% (w/w)]	Y_{PG} (g/g)	P_{PG} [g/(L·h)]	Y_{BPG} (g/g)	η_{PBP} (g PDO/g BP)
20.5	9.16	5.78	3.71	0.46	0.91	0.29	1.58
29.5	13.57	7.44	6.05	0.49	1.36	0.27	1.82
39.1	15.97	9.46	8.89	0.45	1.03	0.27	1.69
47.4	18.95	12.04	3.86	0.42	0.95	0.26	1.57
57.8	17.85	17.50	9.77	0.34	0.56	0.34	1.02
65.9	12.53	14.91	32.93	0.29	0.39	0.35	0.84

Table 3
Statistical parameters of the kinetic model proposed for the production of PDO from raw glycerol at different initial substrate concentrations.

C_{G0} (g/L)	F_{calc}	F_{tab}	RMSE	SSR	VE (%)
20.5	265	2.073	0.92	15.9	98.3
29.5	749	2.124	0.84	14.5	99.3
39.1	1077	2.040	0.93	16.2	99.6
47.4	471	2.073	1.45	23.6	99.4
57.8	210	1.999	3.53	28.2	99.6
65.9	705	1.999	2.37	71.3	98.6

Table 4
Kinetic model parameter values calculated for the different experiments.

C_{G0} (g/L)	μ (h^{-1})	C_X^{max} (g X/L)	K_{1PDO} [L·g PDO/(g G·g X·h)]	K_{2PDO} (L/g G)	K_{1BP} [L·g BP/(g G·g X·h)]	K_{2BP} (L/g G)	K_M [L·g CO ₂ /(g G·g X·h)]	$v_{G/X}$ (g G/g X)	$v_{G/P}$ (g G/g PDO)	$v_{G/BP}$ (g G/g BP)	v_{G/CO_2} (g G/g CO ₂)
20.5	0.60	1.32	0.44	0.13	0.25	0.10	–	1.86	1.10	1.16	–
29.5	0.57	1.41	0.30	0.09	0.12	0.04	–	1.57	1.18	1.25	–
39.1	0.43	1.45	0.13	0.03	0.05	0.005	0.03	0.88	1.05	1.05	1.06
47.4	0.40	1.59	0.09	0.02	0.03	–	0.03	0.63	1.02	1.01	1.01
57.8	0.34	1.25	0.03	–	0.02	–	0.02	1.11	1.01	1.01	1.01
65.9	0.32	1.04	0.01	–	0.01	–	0.01	1.33	1.02	1.02	1.02

mean score respect to the calculated values, respectively, given by the Eqs. (5) and (6):

$$SSQ_I = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,exp} - y_{i,calc})^2}{y_{i,calc}^{\gamma_i}} \quad (5)$$

$$SSQ_{mean_I} = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,exp} - \bar{y}_{i,exp})^2}{y_{i,calc}^{\gamma_i}} \quad (6)$$

being

$$\bar{y}_{i,exp} = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{y_{i,exp}}{y_{i,calc}^{\gamma_i/2}}}{\sum_{i=1}^N \frac{1}{y_{i,calc}^{\gamma_i/2}}} \quad (7)$$

The term “ γ_j ” is the heteroscedasticity parameter, which is related with the different dispersion in the error between the measured

and the estimated variable. By default, Aspen Custom Modeler® fixes its value at 1.

3. Results and discussion

Six experiments repeated three times were performed under the conditions cited above changing the initial raw glycerol concentration between 20 and 70 g/L, according to the following real experimental values: 20.5, 29.5, 39.1, 47.4, 57.8 and 65.9 g/L. The experimental results regarding biomass, glycerol, PDO, succinic, lactic and acetic acids and ethanol concentrations are shown as points in Figs. 1 and 2.

In order to determine the influence of the initial raw glycerol concentration on the process, the experimental results were initially referred to several empirical parameters: maximum PDO yield (Y_{PG}), productivity at the time of maximum PDO concentration (P_{PG}) and maximum by-products (BP) yield (Y_{BPG}) they are given by Eqs. (8)–(10), respectively. The BP concentration is the

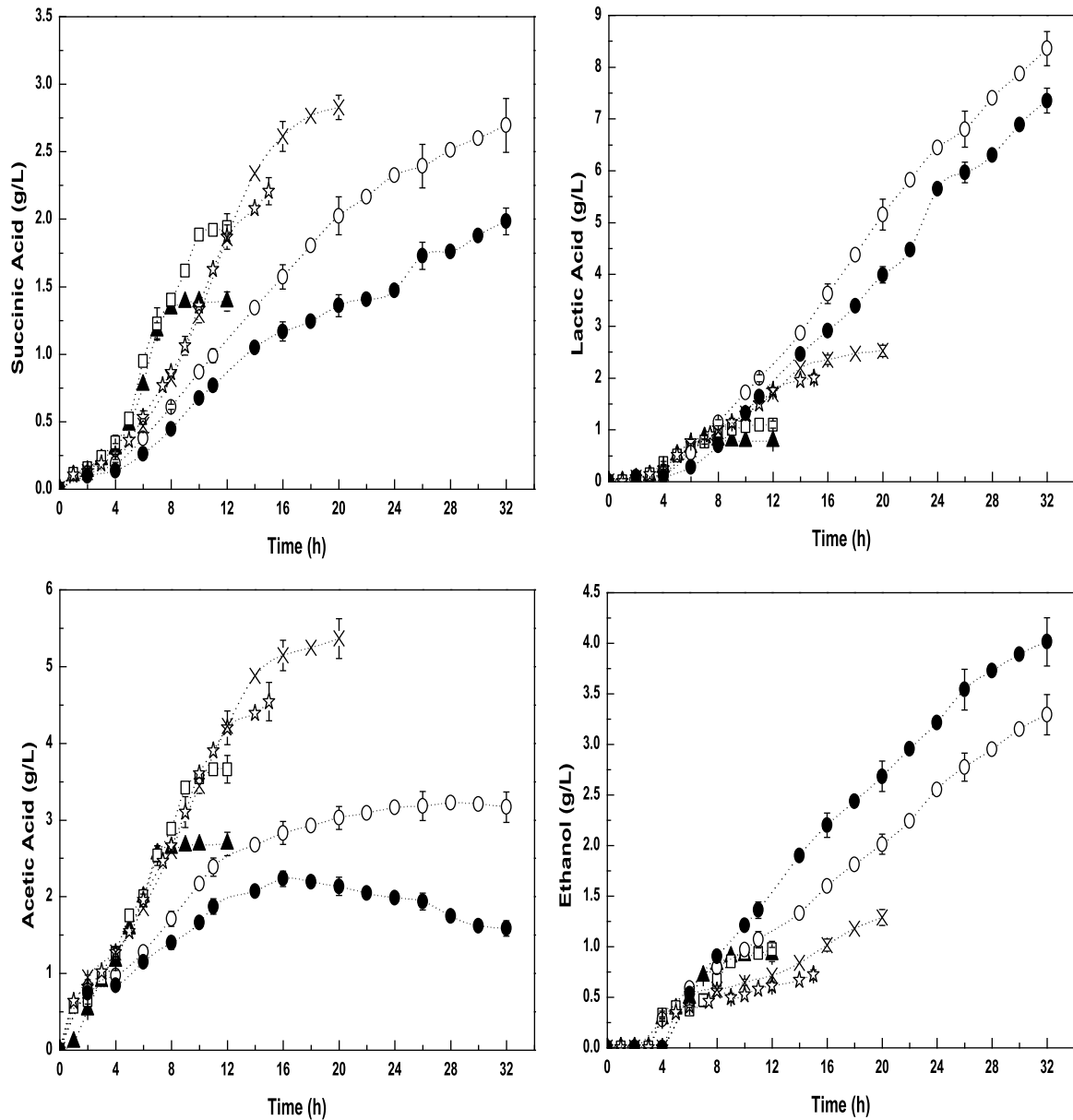


Fig. 1. Time of course of by-products concentrations in experiments with different initial glycerol concentrations (C_{G0}): 20.5 g/L (▲), 29.5 g/L (□), 39.1 g/L (☆), 47.4 g/L (X), 57.8 g/L (○) and 65.9 g/L (●).

result of the sum of the sum of the concentrations of all the compounds obtained from the oxidative route (these compounds are shown in Fig. 1 and their sum is shown in Fig. 2):

$$Y_{PG} = \frac{C_{PDO}^{max}}{C_{G0} - C_G^{min}} \quad (8)$$

$$P_{PG} = \frac{C_{PDO}^{max}}{t^{max}} \quad (9)$$

$$Y_{BPG} = \frac{C_{BP}^{max}}{C_{G0} - C_G^{min}} \quad (10)$$

where C_{PDO}^{max} (g/L) is the maximum PDO concentration reached in a single run, C_{G0} (g/L) is the initial glycerol concentration, C_G^{min} (g/L) is the glycerol concentration when C_{PDO}^{max} is reached, C_{BP}^{max} is the concentration of the sum of by-products in the liquid phase when C_G^{min} is achieved, and t^{max} (h) is the fermentation time when C_{PDO}^{max} and C_{BP}^{max} are reached.

In order to express the carbon flux distribution through the two main pathways of mixed acid route in each experiment (reductive and oxidative), a parameter called “reductive pathway efficiency” (η_{PBP}) has been defined as the ratio of the final concentrations of PDO (C_{PDO}^{max}) and BP (C_{BP}^{max}), according to the following equation:

$$\eta_{PBP} = \frac{C_{PDO}^{max}}{C_{BP}^{max}} \quad (11)$$

As it was indicated previously, one of the goals of the present work is to study the influence of the initial substrate concentration in the fermentation of raw glycerol to obtain PDO in batch cultures. Table 2 shows the experimental results using the above defined magnitudes. The maximum PDO concentration increases with initial glycerol concentration until 47.4 g/L; from that value, C_{PDO}^{max} decreases together with the yield and the productivity. The best results of these latter two parameters (0.49 g/g and 1.36 g/(Lh), respectively) are reached when 29.5 g/L of initial substrate concentration is used. Under these conditions, the amount of residual

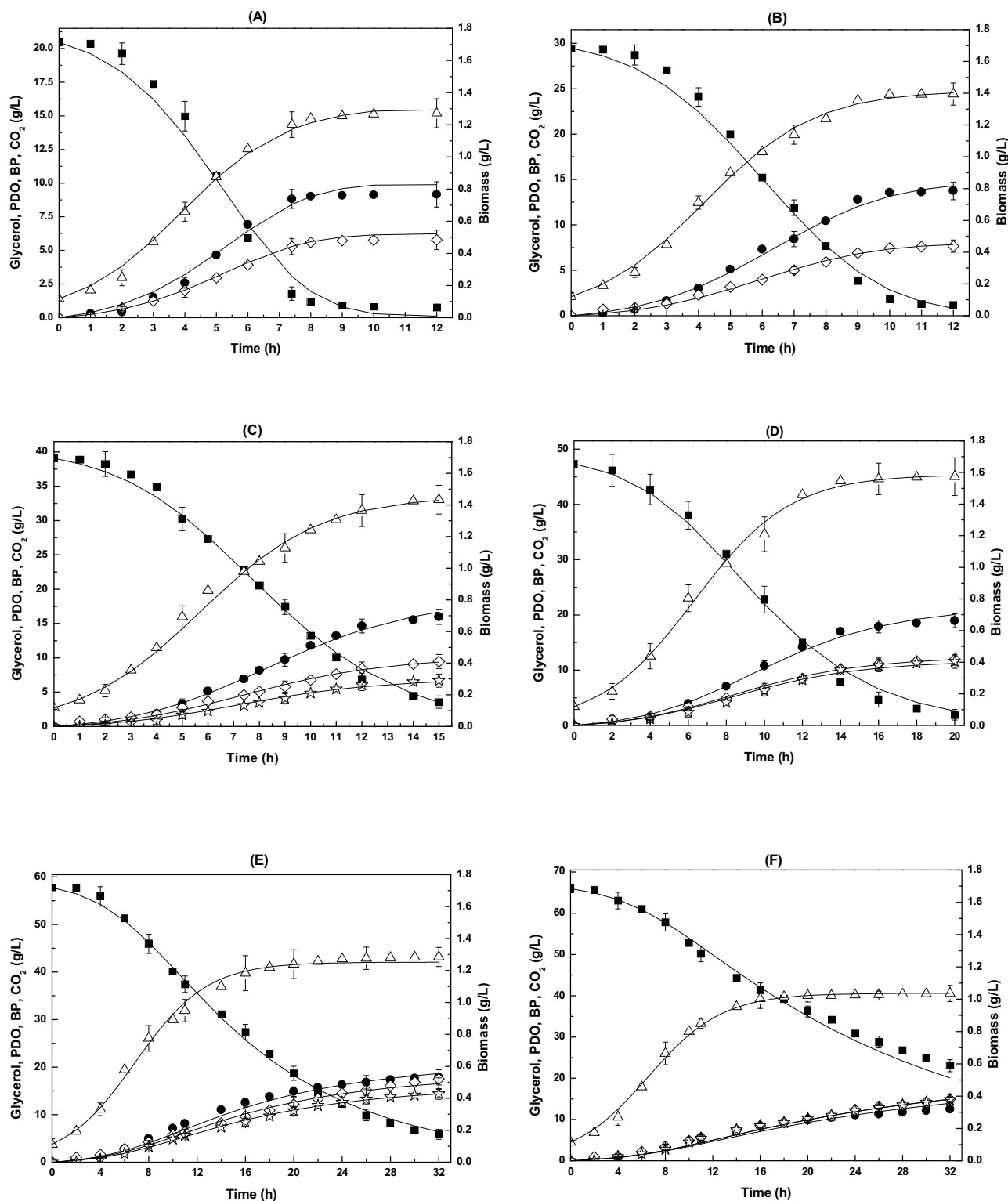


Fig. 2. Experimental data (points) and kinetic model predictions (curves) for the PDO production process by *S. blattae* using different initial substrate concentrations (C_{00}): 20.5 g/L (A), 29.5 g/L (B), 39.1 g/L (C), 47.4 g/L (D), 57.8 g/L (E) and 65.9 g/L (F). Data points: glycerol (■), biomass (△), PDO (●), CO₂ (☆) and by-products (◇).

glycerol and the by-products yield were maintained at low values (the BP yield between 0.29 and 0.26 g/g).

The by-product synthesis is also influenced by the initial substrate concentration as it can be observed in Fig. 1 and Table 2. From 29.5 to 47.4 g/L of initial raw glycerol concentration, the substrate selectivity to ethanol and organic acids is very similar (0.29–0.26 g/g), but for an initial glycerol concentration of 57.8 g/L

the value of this parameter increases to 0.34 g/g (see Table 2). If initial raw glycerol concentration is lower than 57.8 g/L, acetic acid is the main by-product, followed by succinic acid, lactic acid and ethanol. When the initial substrate concentration is 47.4 g/L, acetic acid concentration reached its highest value, around 5.5 g/L (see Fig. 1).

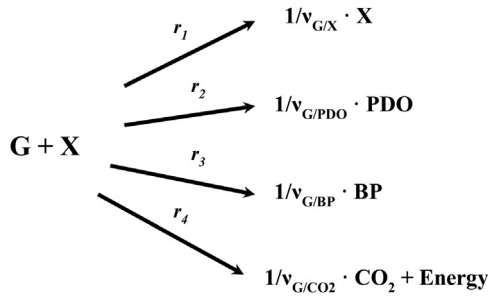


Fig. 3. Simplified reaction scheme proposed.

The metabolism is clearly inhibited when initial glycerol concentration employed was 65.9 g/L (see Fig. 2); thereby the yields shown in Table 2 for the different chemical species were significantly reduced and the residual glycerol concentration was very high (33%, w/w). It can be also observed that in the experiment performed with an initial raw glycerol concentration of 57.8 g/L, the inhibitory effect of the substrate concentration can be also clearly observed in the distribution of by-products metabolic flux, which moves mainly to lactic acid and ethanol synthesis (see Fig. 1). This behavior is powered by the changes in carbon metabolic flux, which is directed to the oxidative pathway, as described above. When initial substrate concentration is increased from 47.4 to 57.8 g/L, lactic acid and ethanol final concentrations increase from 2.5 to 8.5 g/L and 1.25 to 3.25 g/L, respectively. The concentration of the rest of by-products was clearly reduced in these runs using 47.4 and 57.8 g/L of glycerol, especially the acetic acid that falls down from 5.5 to 2.3 g/L. This change in the metabolic flux was more clearly observed in the run carried out with the highest initial glycerol content (see Fig. 1).

These previous results show how the carbon metabolic flux is influenced by the initial amount of substrate, represented by the parameter η_{BP} (see Table 2), which indicates how the glycerol consumed is employed during its bioconversion. At low initial concentrations of raw glycerol, carbon metabolic flux is focused on the reductive pathway, reaching its highest value when the run is conducted from 29.5 g/L of substrate (1.82 g PDO/g BP). When initial glycerol is increased from that value, the reductive pathway efficiency decreases slightly in favor of the oxidative way until the metabolism is inhibited by substrate concentration (see Table 2). In that cases, runs performed from 57.8 and 65.9 g/L of glycerol, the BP concentration is closer to PDO concentration as the initial raw glycerol concentration is increased, which means that the carbon metabolic flux has been moved into the oxidative pathway of mixed acid route (see also Fig. 3).

4. Kinetic modeling

The other goal of this work is related to the obtaining of a kinetic model able to describe the process of PDO production using *S. blattae* for technical purposes.

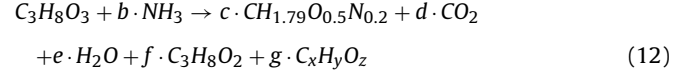
4.1. Simplified reaction network

The first step in building a kinetic model is the approach of a reaction scheme for describing the reactions that occur during the fermentation. In this case, the substrate is degraded by cells by oxidative and reductive metabolic routes. The oxidative route converts glycerol (G) into a mixture of organic acids and ethanol via pyruvate and phosphoenolpyruvate. The reductive route produces 1,3-propanediol (PDO) by the hydration of 3-hydroxypropionaldehyde, which comes from the dehydration of glycerol by GDHt [8]. In order to simplify this metabolic route, all the

by-products present in the liquid phase (that came from the oxidative pathway) were lumped in a single chemical species, called BP [29], as it has been used above.

The simplified reaction network considered for the kinetic modeling is shown in Fig. 3 in which four main reactions are considered: growth (r_1), PDO production –reductive route– (r_2), by-products production –oxidative route– (r_3) and carbon dioxide production –related to maintenance energy– (r_4).

Carbon dioxide profiles were determined by a means of a carbon mass balance [36] according to the Eq. (12):



where c , d , f and g are the molar yields at each experimental time of biomass, CO_2 , PDO and BP referred to consumed glycerol, respectively; and x , y and z are the average content of carbon, hydrogen and oxygen in the lumped compound “BP”, respectively, that have been obtained from the ratio of the by-products for each experiment. Due to the distribution of the by-products obtained is different at each raw glycerol concentration employed; this “molecular formula of by-products” changes from run to run.

4.2. Kinetic equations of the different reactions

Once the reaction scheme is established (presented in Fig. 3), the kinetic model can be written as follows:

$$\frac{dC_X}{dt} = r_1 \quad (13)$$

$$\frac{dC_{PDO}}{dt} = r_2 \quad (14)$$

$$\frac{dC_{BP}}{dt} = r_3 \quad (15)$$

$$\frac{dC_{CO_2}}{dt} = r_4 \quad (16)$$

$$\frac{dC_G}{dt} = -v_{G/X} \cdot r_1 - v_{G/PDO} \cdot r_2 - v_{G/BP} \cdot r_3 - v_{G/CO_2} \cdot r_4 \quad (17)$$

where $v_{G/X}$, $v_{G/PDO}$, $v_{G/BP}$ and v_{G/CO_2} are the coefficients that represent how the substrate consumption rate relates in a complex reaction network with biomass, PDO, BP and CO_2 production, respectively.

To formulate the kinetic model, given by the Eqs. (12)–(17), the kinetic equations describing the rate of each lumped assumed reaction have to be determined. The microbial growth rate has been modeled according to an unstructured–unsegregated kinetic model, widely used in the literature [36,37], given by:

$$r_1 = \frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{max}}\right) \quad (18)$$

where μ is the growth rate (h^{-1}) and C_X^{max} (g/L) the biomass concentration in the steady microbial growth stage. Applying the boundary condition ($t=0$; $C_X=C_{X0}$), the integration of Eq. (18) leads to the logistic growth equation [31]:

$$C_X(t) = \frac{C_{X0} \cdot \exp(\mu \cdot t)}{1 - \frac{C_{X0}}{C_X^{max}} \cdot [1 - \exp(\mu \cdot t)]} \quad (19)$$

The kinetic equations for r_1 and r_2 , that represent the PDO and by-products production rates (see Fig. 2), have been described by means of empirical hyperbolic type expressions, depending on

the concentrations of both glycerol (C_G) and biomass (C_X) [38,39], according to:

$$r_2 = \frac{dC_{PDO}}{dt} = \frac{K_{PDO}C_G C_X}{K'_{PDO} + C_G} \quad (20)$$

$$r_3 = \frac{dC_{BP}}{dt} = \frac{K_{BP}C_G C_X}{K'_{BP} + C_G} \quad (21)$$

To facilitate the convergence of the algorithm, Eqs. (20) and (21) have been rewritten in Aspen Custom Modeler® as follows:

$$r_2 = \frac{K_{1PDO}C_G C_X}{1 + K_{2PDO}C_G} \quad (22)$$

$$r_3 = \frac{K_{1BP}C_G C_X}{1 + K_{2BP}C_G} \quad (23)$$

where $K_{1PDO} = K_{PDO}/K'_{PDO}$ [L·g PDO/(g G·g X·h)], $K_{2PDO} = 1/K'_{PDO}$ (L/g G), $K_{1BP} = K_{BP}/K'_{BP}$ [L·g BP/(g G·g X·h)] and $K_{2BP} = 1/K'_{BP}$ (L/g G).

The production of carbon dioxide is related in the literature with the energy consumed by cells for its metabolism maintenance [36]. Thus, the kinetic equation proposed for “ r_4 ” represents the microbial maintenance, shown in this study to be glycerol concentration dependent, as follows:

$$r_4 = \frac{dC_{CO_2}}{dt} = K_M \cdot C_G \cdot C_X \quad (24)$$

where K_M is related to the microbial maintenance constant (L·g CO₂/g G·g X·h).

4.3. Parameter values calculation by fitting to experimental results

The procedure followed for calculating the kinetic parameters, the coefficients and to validate the kinetic model was carried out in two stages:

- The first stage was the application of a simple response fitting strategy to obtain good initial parameters and coefficients of Eqs. (19)–(24), as follows:
- The parameter values of Eq. (19) were obtained by single response fitting technique, run by run.
- The calculation of kinetic parameter values of Eqs. (22)–(24) were carried out by simple response fitting method, run by run, considering C_G and C_X as independent variables.
- The coefficients of the Eq. (17) were calculated introducing the values of the production rates of PDO, BP, CO₂ and biomass obtained in the previous steps and fitting the substrate concentration profiles by single response strategy.
- The second stage was the optimization of the above results and it was carried out by means of a multiple response fit of all the data of each run to the Eqs. (19)–(24) at the same time using the parameters obtained in the first stage as initial values. Statistical model parameters described by Eqs. (2)–(4) were calculated for each run in order to evaluate the model robustness.

The model parameter values obtained after fitting for all the runs conducted with different initial raw glycerol concentrations are shown in Table 3 (statistical parameters) and Table 4 (kinetic parameters and coefficients). As it can be seen in Table 3, all the fits carried out are statistically significant, while the model parameter values obtained depend on initial raw glycerol concentration, (see Table 4).

The kinetic model has to satisfy some statistical criteria, that represents its grade of reliability [31,32]. Firstly, following F-test criterion, all the fittings pass the null hypothesis and show F-Fisher calculated values (F_{cal}) much higher than the tabulated (F_{tab}) for a

95% of confidence interval (see Table 3). RMSE values were acceptable in all fittings, considering that the high number of available experimental data. For moderate initial glycerol content RMSE was very small, and its increase is mainly due to the differences between experimental and predicted substrate concentrations data, C_G , which are more significant in the runs conducted at 20.5 g/L and 65.9 g/L (see Fig. 2). These differences are also observed in the SSR values, but it must be taking account that this value is referred to the global sum of squared residuals; that is, it includes the errors of the five chemical species considered in the current model. The values of VE are all closed to 100%, which indicates the goodness of the fittings and further reinforced the validity of the proposed kinetic model.

The kinetic parameters and the model coefficients are presented in Table 4. In this table it can be observed that the growth rate (μ) decreases as initial substrate concentration increases and the biomass concentration at the steady growth stage (C_X^{max}) reaches a maximum value when 47.4 g/L of initial raw glycerol concentration is employed. This behavior is due to the biomass growth inhibition, caused by the substrate initial concentration.

The parameters related to PDO production, given by Eq. (22), present the same behavior as μ when initial substrate concentration is increased (see Table 4). This trend matches with PDO yield and productivity results, commented on before in this work. When initial raw glycerol concentration was higher than 47.4 g/L the kinetic equation for reaction 2 can be simplified to a potential one, because the inhibitory effect of the initial substrate concentration provokes a change on the carbon metabolic flux, which moves to the reactions of the oxidative pathway (see also Table 1 and Fig. 3e and f).

The evolution of the kinetic parameters related to the by-products production is similar to those ones related to PDO production, although in this case the change in the carbon metabolic flux described above is clearly evidenced even in the BP kinetic equation rate, because from 39.1 g/L of initial glycerol concentration, it is transformed into a similar expression of carbon dioxide production rate equation (see Table 3).

The values of the maintenance kinetic parameter (K_M), defined to describe carbon dioxide profiles given by Eq. (12), are useful to complete the description of metabolism of carbon when initial substrate is increased showing three different stages: from 20.5 to 29.5 g/L, the carbon flux is mainly driven to the reductive pathway and no production of CO₂ during the fermentation is observed. If initial glycerol content is higher (39.1 and 47.4 g/L), the K_M values are maintained at a constant value (0.03 L·g CO₂/(g G·g X·h)); but when substrate inhibition is important (57.9 and 65.9 g/L) this parameters decreases (see Table 4).

As shown in Table 4, the biomass growth is the slowest step of this process and, for this reason “ $v_{G/X}$ ” is always higher than the rest of “ $v_{G/j}$ ”, except when C_X^{max} reaches its highest values (when C_{G0} is 39.1 g/L or 47.4 g/L). The production of CO₂ from the run conducted at 39.1 g/L of initial substrate means sharing the carbon contained in the substrate between another chemical compounds, so that the values of $v_{G/P}$ and $v_{G/BP}$ are slightly reduced (see Table 4).

The different carbon flux distribution is also reflected in the different values of the coefficients related to the distribution of the carbon source to produce biomass ($v_{G/X}$), PDO ($v_{G/P}$), BP ($v_{G/BP}$) and CO₂ (v_{G/CO_2}) obtained at each value of initial glycerol concentration). But it can be pointed out that when substrate inhibition is observed, $v_{G/P}$, $v_{G/BP}$ and v_{G/CO_2} take practically the same values, resulting in that PDO, CO₂ and BP are produced at similar ratios as can be also seen in Fig. 2(E) and (F).

The experimental data (as points) and the kinetic model predictions (as lines) are presented in Fig. 3. In this figure the good fitting of the model is clearly reflected, because it is able to reproduce the

batch fermentation results under all proposed initial conditions in a very good way.

5. Conclusions

The influence of the initial raw glycerol concentration in PDO production by *S. blattae* has been studied in a 2 L bioreactor. The best production results were found for 29.5 g/L of raw glycerol, featuring a PDO concentration of 13.6 g/L, a yield of 0.49 g/g and a productivity of 1.36 g/(L.h). The metabolic carbon flux shifted clearly to the oxidative pathway (to lactic acid and ethanol synthesis, mainly) when the initial concentration of glycerol is higher than 47.4 g/L. An unstructured-unsegregated kinetic model to describe the process has been proposed and it has been shown that it is able to simulate in a very good way the experimental data obtained at the six different initial raw glycerol concentrations (from 20.5 to 65.9 g/L).

Acknowledgement

This work has been supported under contracts: CTQ2013-45970-C2-1-R and PCIN-2013-021-C02-01.

References

- [1] S. Sangeeta, M. Moka, M. Pande, R. Rani, M. Gakhar, J. Sharma, A.N. Rani, Bhaskarwar, Alternative fuels: an overview of current trends and scope for future, *Renew. Sust. Energy Rev.* 32 (2014) 697–712.
- [2] P. Katiyar, S. Srivastava, V. Tyagi, A current scenario and novel approaches to degrade the lignocellulosic biomass for the production of biodiesel, *J. Fundam. Renew. Energy Appl.* 5 (2015) 2.
- [3] V.K. Garlapati, U. Shankar, A. Budhiraja, Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products, *Biotechnol. Rep* 9 (2016) 9–14.
- [4] B.M. Jenkins, Global agriculture industrial feedstocks for energy and materials, in: N.K.V. Alfen (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, Academic Press Oxford, 2014, pp. 461–498.
- [5] A.P. Zeng, W. Sabra, Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 749–757.
- [6] C.S. Lee, M.K. Aroua, W.M.A.W. Daud, P. Cognet, Y. Peres-Lucchese, P.L. Fabre, O. Reynes, L. Latapie, A review: conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method, *Renew. Sust. Energy Rev.* 42 (2015) 963–972.
- [7] G. Kaur, A.K. Srivastava, S. Chand, Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol, *Biochem. Eng. J.* 64 (2012) 106–118.
- [8] S. Andres, A. Wiezer, H. Bendfeldt, T. Waschkowitz, C. Toeche-Mittler, R. Daniel, Insights into the genome of the enteric bacterium *Escherichia blattae*: cobalamin (B12) biosynthesis, B12-dependent reactions, and inactivation of the gene region encoding B12-dependent glycerol dehydratase by a new mu-like prophage, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8 (2004) 150–168.
- [9] A. Kivisto, V. Santala, M. Karp, 1,3-Propanediol production and tolerance of a halophilic fermentative bacterium, *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*, *J. Biotechnol.* 158 (2012) 242–247.
- [10] E. Celinska, Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 519–530.
- [11] X.-J. Ji, H. Huang, J.-G. Zhu, N. Hu, S. Li, Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *klebsiella pneumoniae*: the role of pH fluctuation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159 (2009) 605–613.
- [12] E. Wilkens, A.K. Ringel, D. Hortic, T. Willke, K.D. Vorlop, High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1057–1063.
- [13] K. Petrov, A. Stoyanov, Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35 (2012) 317–321.
- [14] S. Hirschmann, K. Baganz, I. Koschik, K.D. Vorlop, Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters, *Landbauforschung Volkenrode* 55 (2005) 261–267.
- [15] P. Jin, S. Li, S.G. Lu, J.G. Zhu, H. Huang, Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 1815–1821.
- [16] P.B. Vieira, B.V. Kilikian, R.V. Bastos, E.A. Perpetuo, C.A.O. Nascimento, Process strategies for enhanced production of 1,3-propanediol by *Lactobacillus reuteri* using glycerol as a co-substrate, *Biochem. Eng. J.* 94 (2015) 30–38.
- [17] A. Drozdzyńska, J. Pawlicka, P. Kubiak, A. Kosmider, D. Pranke, A. Olejnik-Schmidt, K. Czaczyk, Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – newly isolated strains from the Enterobacteriaceae, *New Biotechnol.* 31 (2014) 402–410.
- [18] M. Wojtusik, A. Rodríguez, V. Ripoll, V.E. Santos, J.L. García, F. García-Ochoa, 3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions, *Biotechnol. Rep.* 6 (2015) 100–107.
- [19] A. Rodríguez, M. Wojtusik, V. Ripoll, V.E. Santos, F. García-Ochoa, 1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: operational conditions and kinetics in batch cultivations, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 830–837.
- [20] D. Heinrich, B. Andreessen, M.H. Madkour, M.A. Al-Ghamdi, I.I. Shabbaj, A. Steinbuechel, From waste to plastic: synthesis of poly(3-Hydroxypropionate) in *Shimwellia blattae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 3582–3589.
- [21] S. Sato, B. Andreeßen, A. Steinbüchel, Strain and process development for poly(3HB-co-3HP) fermentation by engineered *Shimwellia blattae* from glycerol, *AMB Express* 5 (2015) 1–9.
- [22] B. Andreeßen, B. Johanningmeier, J. Burbank, A. Steinbüchel, Influence of the operon structure on poly(3-hydroxypropionate) synthesis in *Shimwellia blattae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 7409–7422.
- [23] A. Mac Nelly, M. Kai, A. Svatoš, G. Diekert, T. Schubert, Functional heterologous production of reductive dehalogenases from *desulfotobacterium hafniense* strains, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 4313–4322.
- [24] N. Urano, M. Fujii, H. Kaino, M. Matsubara, M. Kataoka, Fermentative production of 1-propanol from sugars using wild-type and recombinant *Shimwellia blattae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2001–2008.
- [25] J. Almqvist, M. Cvijovic, V. Hatzimanikatis, J. Nielsen, M. Jirstrand, Kinetic models in industrial biotechnology – improving cell factory performance, *Metab. Eng.* 24 (2014) 38–60.
- [26] J. Ye, E. Feng, H. Yin, Z. Xiu, Modelling and well-posedness of a nonlinear hybrid system in fed-batch production of 1,3-propanediol with open loop glycerol input and pH logic control, *Nonlinear Anal.-Real World Appl.* 12 (2011) 364–376.
- [27] C. Liu, Z. Gong, E. Feng, Modeling and optimal control of a nonlinear dynamical system in microbial fed-batch fermentation, *Math. Comput. Modell.* 53 (2011) 168–178.
- [28] J.I. Rhee, J. Bode, J.C. DiazRicci, D. Poock, B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schugerl, Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM109 and on the production of the fusion protein EcoRI:SPA, *J. Biotechnol.* 55 (1997) 69–83.
- [29] F. García-Ochoa, A. Romero, J. Querol, Modeling of the thermal n-octane oxidation in the liquid phase, *Ind. Eng. Chem. Res.* 28 (1989) 43–48.
- [30] F. García-Ochoa, V.E. Santos, A. Alcón, Xanthan gum production: an unstructured kinetic model, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 206–217.
- [31] F. García-Ochoa, V.E. Santos, A. Alcon, Metabolic structured kinetic model for xanthan production, *Enzyme Microb. Technol.* 23 (1998) 75–82.
- [32] M. Ladero, M. de Gracia, F. Trujillo, F. Garcia-Ochoa, Phenomenological kinetic modelling of the esterification of rosin and polyols, *Chem. Eng. J.* 197 (2012) 387–397.
- [33] J.Y. Yuan, Numerical methods for generalized least squares problems, *J. Comput. Appl. Math.* 66 (1996) 571–584.
- [34] J. Esteban, E. Fuente, A. Blanco, M. Ladero, F. Garcia-Ochoa, Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements, *Chem. Eng. J.* 260 (2015) 434–443.
- [35] M. Ladero, M. de Gracia, J.J. Tamayo, I.L.D. Ahumada, F. Trujillo, F. Garcia-Ochoa, Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: application to industrial operation, *Chem. Eng. J.* 169 (2011) 319–328.
- [36] P.M. Doran, Chapter 4 – Material Balances, *Bioprocess Engineering Principles*, Second ed., Academic Press London, 2013, pp. 87–137.
- [37] A. Mulchandani, J.H.T. Luong, Microbial inhibition-kinetics revisited, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 66–73.
- [38] C. Zhu, B. Fang, S. Wang, Effects of culture conditions on the kinetic behavior of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium butyricum* with a kinetic model, *Bioresour. Technol.* 212 (2016) 130–137.
- [39] G. Kaur, A.K. Srivastava, S. Chand, Mathematical modelling approach for concentration and productivity enhancement of 1,3-propanediol using *Clostridium diolis*, *Biochem. Eng. J.* 68 (2012) 34–41.
- [40] S. Saintamans, P. Perlot, G. Goma, P. Soucaille, High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI-3266 in a simply controlled fed-batch system, *Biotechnol. Lett.* 16 (1994) 831–836.
- [41] G.L. Zhang, B.B. Ma, X.L. Xu, C. Li, L.W. Wang, Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Biochem. Eng. J.* 37 (2007) 256–260.

Publicación 4

Autores: Alberto Rodríguez, Victoria E. Santos. Emilio Gómez y Félix García-Ochoa

Título: Influence of fluid dynamic conditions on 1,3-propanediol production from glycerol by *Shimwellia blattae*: Carbon flux and cell response

Revista: Journal of Chemical Technology and Biotechnology (2017), DOI: 10.1002/jctb.5200

Índice de impacto (2015): 2,738

Área: Ingeniería Química

Resumen

El estudio de las condiciones fluido-dinámicas es esencial para el cambio de escala de los bioprocesos y la optimización del rendimiento y el comportamiento del biocatalizador en este tipo de sistemas. Este trabajo pretende determinar la influencia de dichas condiciones mediante cambios en la velocidad de agitación en STBR, con células en crecimiento operando en discontinuo. En concreto, se probó un intervalo de agitaciones entre 100 y 1000 rpm. Los resultados experimentales se describieron utilizando el modelo cinético propuesto en la publicación 3, y otras técnicas analíticas, como el conteo de viables en placa y la microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El aumento de la velocidad de agitación, entre 100 y 500 rpm, incrementa también las velocidades de crecimiento de la biomasa y producción de 1,3-propanodiol (1,3-PD) y los sub-productos de la ruta ácido mixta, tal y como reflejan los valores de los parámetros cinéticos del modelo propuesto. Sin embargo, a partir de 600 rpm comienzan a detectarse los efectos derivados de un estrés de tipo hidrodinámico, con un descenso de la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa en la fase estacionaria, especialmente cuando los experimentos se llevan a cabo con velocidades de agitación entre 800 y 1000 rpm. Estas observaciones se demuestran también en el conteo de viables en placa. En este rango de velocidades de agitación, las concentraciones de 1,3-PD y de la suma de sub-productos se reducen muy ligeramente con respecto al tramo anterior.

El análisis de las imágenes obtenidas por TEM demuestra que la integridad y la morfología de las células de *S. blattae* se ven comprometidas a partir de 600 rpm. En el intervalo entre 600 y 1000 rpm se observa un descenso del tamaño celular a lo largo del experimento, así como un crecimiento del biocatalizador de forma agregada o en pequeñas cadenas de hasta diez individuos.

De nuevo, es de destacar que el modelo cinético antes propuesto es capaz de ajustarse bien a los resultados de experimentos realizados en distintas condiciones fluido-dinámicas.

Influence of fluid dynamic conditions on 1,3-propanediol production from glycerol by *Shimwellia blattae*: carbon flux and cell response

Alberto Rodriguez, Victoria E Santos, Emilio Gomez and Felix Garcia-Ochoa*

ABSTRACT

BACKGROUND: The study of fluid dynamic conditions is essential in the development and the scaling-up of bioprocesses. If the working volume is large, different turbulence regimes could appear during the fermentation, affecting the metabolic state of the overall culture. In anaerobic systems, increasing the stirrer speed can induce hydrodynamic stress, increasing shear stress, and its consequences can negatively affect the cell viability, reducing the yield or the productivity of the process.

RESULTS: A kinetic model was employed for describing the time course of biomass growth rate and the different metabolite production rates. An increase in agitation from 100 to 500 rpm enhanced 1,3-propanediol (PDO) production and biomass growth rate. However, when stirrer speed was increased from 600 to 1000 rpm, the shear stress had a negative effect, decreasing the maximum PDO concentration reached and the glycerol uptake rate. Cellular response to shear stress conditions was also observed by the time course viable cells and cell images.

CONCLUSIONS: The production of PDO from raw glycerol by *S. blattae* is favored by increasing the stirrer speed to 500 rpm. Cell viability and integrity are compromised by hydrodynamic stress under aggressive agitation conditions (>600 rpm).

© 2017 Society of Chemical Industry

Keywords: hydrodynamic stress; stirred tank bioreactor; 1,3-propanediol; raw glycerol; *Shimwellia blattae*; anaerobic bioprocess

NOMENCLATURE

3-HPA	3-hydroxypropionaldehyde
C_j	Concentration of compound j (g L^{-1})
CMD	Cell dry mass (g L^{-1})
F	F-Fisher
K	Kinetic constants (units depend on the equations)
N	Stirrer speed (rpm)
NADH	Nicotinamide dinucleotide
OD_{600}	Optical density at 600 nm
PDO	1,3-propanediol
R	Production rate [$\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$]
RMSE	Residual mean squared error
SSR	Sum of squared residues
t:	Time (h)
TEM:	Transmission Electronic Microscopy
U:	Bacterial colony forming units
V:	Volume of the liquid in the vessel (L)
VE	Variation explained of a nonlinear regression fitting
y_i	Experimental or calculated values of "i" variable

$v_{G/j}$	Relationship between glycerol consumption and 'j' production (g G/g j)
Δ	Confidence interval in average cell size (μm)

Subscripts

AAC	Referred to acetate
BP	Referred to total by-products in the liquid phase
c	Referred to concentration of bacterial colony forming units (CFU/mL)
cal	Relative to calculated value
ET	Referred to ethanol
exp	Referred to the experimental value of a variable
G	Referred to glycerol
LAC	Referred to lactate
max	Referred to maximum value
PDO	Referred to 1,3-propanediol
SUC	Referred to succinate

Greek Letters

γ	Heteroscedasticity parameter
λ	Average cell size (μm)
μ_{max}	Maximum biomass growth rate (h^{-1})

* Correspondence to: F Garcia-Ochoa, Department of Chemical Engineering, Facultad CC. Quimicas. Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense. 28040-Madrid. Spain. Email: fgochoa@ucm.es

Department of Chemical Engineering, Facultad CC. Quimicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

tab	Relative to F value given by F-test tables
X	Referred to biomass
0	Relative to initial value

Superindexes

max	Referred to maximum value
residual	Referred to glycerol concentration at the end of the fermentation

INTRODUCTION

The more usual bioreactor type employed to carry out a microbial bioprocess at industrial scale is the stirred and sparged tank bioreactor (STBR). This type of equipment is able to provide enough power input by means of mechanical agitation to improve mass transfer, ensure good culture mixing and maintain the cells in homogeneous suspension.

The stirrer speed in an STBR is a critical variable to scale-up for the operation of microbial bioprocesses because mass transfer and mixing rate are directly related to power input agitation. Nevertheless, hydrodynamic stress can also appear depending on the fluid dynamic conditions inside the vessel, but at different levels depending on the microorganism type, and even the strain utilized. The shear stress derived from turbulent flow can induce hydrodynamic stress and cell damage as described in many works.^{1–5} In fact, mass transfer rate, mixing level and hydrodynamic stress are phenomena to be taken into account as the most important problems in bioprocess scale-up, because the stress can have a big influence on the yield and productivity of the bioprocess.^{6,7}

Microbial stress caused by agitation has been widely studied in cell cultures, with important differences between aerobic and anaerobic processes.⁸ In aerobic bioprocesses, optimization of the impeller speed is a key variable for microbial process improvement, because agitation is the most influencing variable on oxygen transfer rate (OTR) between gas and liquid phases.⁹ On the other hand, high stirrer speeds in aerobic bioprocesses can induce oxidative stress in cells, caused by the disequilibrium between the synthesis of oxygen reactive species and the biological ability of cells to rapidly detoxify these intermediate compounds or repair the resultant damage to the cells.^{10,11} Recent works have studied the influence of the agitation level in different bioprocesses, such as waste water treatments¹² and biofilm formation.^{13,14} Moreover, enzyme activity studies have been carried out, such as chitinase in the hydrolysis of chitin¹⁵ and Dsz (A,B,C,D) involved in the biodesulfurization 4S pathway.^{4,16}

In anaerobic microbial cultures, an appropriate agitation is critical to ensure homogeneous mixing and to improve substrate transport rate from broth to cells⁷ and also the transport rate from liquid to gas of some fermentation product (methane, carbon dioxide, etc.), for which evacuation is necessary. Under high agitation level, the small size and relative rigidity of the bacterial cell wall allow a certain resistance to shear stress conditions. Nevertheless, a change in cellular volume has been observed when agitation is increased in *Escherichia*, *Bacillus* and *Staphylococcus* cultures.⁷ Furthermore, in several cases, such as *Escherichia coli* cultures, aggressive agitation conditions can provoke cell disintegration by osmotic pressure, due to K⁺ and Na⁺ ion accumulation inside the cells.¹⁷ These cellular changes can be positive for the bioprocess, because cell metabolism can be accelerated improving product yield, as long as the agitation is maintained within a range of moderate values.^{18,19}

If the stirrer speed is increased, shear stress can appear; lag growth phase can be longer and some chemical changes can be produced, changing the membrane permeability and releasing chemical compounds that could vary broth properties, such as viscosity or surface tension.^{18,20} The viability of the affected cells by hydrodynamic stress has been clearly shown in previous works, usually determined by flow cytometry²¹ and several techniques of microscopy, including contrast phase,¹⁵ scanning electron¹² and transmission electron microscopy.^{14,22}

1,3-propanediol (PDO) is a platform chemical for many synthesis reactions, especially as a monomer of poly-trimethylene-terephthalate, and as a bioplastic with excellent properties in the fiber industry.²³ PDO also has other applications, such as the production of adhesives, solvents, detergents, cosmetics and resins.²⁴ The synthesis of this diol from glycerol allows the revalorization of the main co-product (considered as a waste) in the biodiesel production that is obtained in amounts of 10% (w/w) of biodiesel produced.^{25,26} Several bacterial strains of genera *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter* or *Lactobacillus* are widely used as biocatalysts in the bioconversion of glycerol into PDO, under anaerobic or micro-aerobic conditions.^{24,27} During the fermentation process, glycerol is degraded through a mixed acid route, which consists in two coupled pathways as follows: by the oxidative pathway, a mixture of short chain organic acids (succinic, acetic and lactic, mainly) and alcohols (2,3-butanediol, acetoin and ethanol) is released; by the reductive pathway, PDO is produced via 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA). The key enzymes of this pathway are glycerol dehydratase which catalyzes the conversion of glycerol to 3-HPA, and PDO dehydrogenase, which transforms the 3-HPA into PDO. The activity of both enzymes is regulated by cofactors (coenzyme B₁₂ and NADH, respectively).^{28–30}

Previous studies employing *Shimwellia blattae* ATCC 33430 as biocatalyst have been reported, with promising results in batch cultures under anaerobic conditions.³¹ This bacteria is also employed in the production of a 3-HPA derived biopolymer, poly(3-hydroxy-propionate), in engineered strains that may accumulate almost 10% (w/w) cell dry weight of this polymer inside the cells.³² For PDO production from glycerol using *Shimwellia blattae* ATCC 33430 cultures, adequate operating conditions have previously been determined.³¹ Moreover, a kinetic model able to describe biomass growth, substrate consumption, PDO production and by-products synthesis rates has been proposed. The influence of initial glycerol concentration over the bioprocess rate is well described by the kinetic model.³³

The aim of this work is to study the effects of the fluid dynamic conditions on PDO production from glycerol using *S. blattae* ATCC 33430 as biocatalyst in STBR batch cultures by changing the stirrer speed. Substrate uptake rate, biomass growth rate, PDO production rate and by-products distribution are analyzed. Moreover, shear effects on microbial population have been evaluated by measuring viable colonies and average cell size throughout the fermentation time course.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and medium

Shimwellia blattae ATCC 33430 was the biocatalyst employed in every run of this study. Before inoculation, microbial cells were stored at –80 °C in 50% (w/w) glycerol/saline serum solution. M9 92× medium was used for all cultures, with an initial concentration of raw glycerol of 30 g L⁻¹, according to the operational conditions established in a previous work.³¹ Medium composition was

Table 1. Products distribution: experimental concentration values at 12 h of *S. blattae* batch cultures in runs carried out at different stirrer speeds. Residual glycerol ($G^{residual}$), 1,3-propanediol (PDO), succinate (SUC), acetate (AAC), lactate (LAC), ethanol (ET) and total by-products (BP).

N(rpm)	$C_G^{residual}$ (% w/w)	C_{PDO} (g L ⁻¹)	C_{SUC} (g L ⁻¹)	C_{LAC} (g L ⁻¹)	C_{AAC} (g L ⁻¹)	C_{ET} (g L ⁻¹)	C_{BP} (g L ⁻¹)
100	9.6 ± 1.2	11.8 ± 1.5	1.6 ± 0.06	1.6 ± 0.12	3.5 ± 0.51	1.0 ± 0.13	7.7 ± 0.83
200	5.3 ± 0.9	12.6 ± 1.2	1.5 ± 0.08	1.6 ± 0.09	3.8 ± 0.42	1.1 ± 0.14	8.0 ± 0.73
300	4.7 ± 0.9	12.7 ± 0.9	1.7 ± 0.12	1.7 ± 0.11	3.7 ± 0.33	1.2 ± 0.06	8.3 ± 0.64
400	5.8 ± 0.5	12.9 ± 1.6	1.8 ± 0.15	1.8 ± 0.06	3.7 ± 0.45	1.3 ± 0.11	8.7 ± 0.77
500	4.4 ± 0.6	13.7 ± 0.8	1.9 ± 0.11	1.5 ± 0.04	3.9 ± 0.26	1.3 ± 0.10	8.6 ± 0.51
600	4.9 ± 0.7	13.4 ± 1.1	1.9 ± 0.08	1.5 ± 0.08	3.9 ± 0.45	1.0 ± 0.07	8.3 ± 0.68
800	4.9 ± 0.6	13.1 ± 1.6	1.7 ± 0.06	1.3 ± 0.13	4.0 ± 0.54	0.9 ± 0.03	8.0 ± 0.76
1000	5.3 ± 0.8	13.0 ± 1.4	1.8 ± 0.12	1.3 ± 0.07	4.1 ± 0.58	0.8 ± 0.02	7.9 ± 0.81

at follows (per L of deionized water): 2 g NH₄Cl, 6 g KH₂PO₄, 12 g Na₂HPO₄, 1 g NaCl, 0.246 g MgSO₄ · 7H₂O, 1.5 g yeast extract and 0.011 g CaCl₂.³⁴ Raw glycerol utilized as sole carbon source was taken from a concentrate coming directly from biodiesel production after a purification method with the following composition (w/w basis): 65% glycerol, 30% water, 4.5% chlorides and 0.5% phosphates, as described in detail elsewhere.^{31,33}

Batch culture procedure

Experiments were carried out in a 3 L BIOSTAT® B-Plus (Sartorius AG Germany), with a working volume of 2000 mL. The bioreactor consisted of an un-baffled cylindrical vessel of inner diameter 13.5 cm and height 20 cm, with agitation by means of a dual six blade Rushton turbine system (5.3 cm diameter) coupled to an electrical motor (Kollmorgen 3ΦPM, Danaher Motion, Czech Republic). The equipment was previously sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min.

The inoculum (15% v/v) was built-up by two previous growth steps in order to ensure the same metabolic state of the cells and, accordingly, the reproducibility of the results. These cultures were performed in anaerobic conditions (bubbling commercial nitrogen into the bottles containing the culture medium before autoclaving), in an orbital shaker at 37 °C and 210 rpm of agitation, using 100 mL shaken bottles with 90 mL of culture medium for 4.5 and 12 h, in the two cited steps, respectively.

Batch experiments were conducted under the operational conditions previously determined.³¹ The pH was monitored at 6.5 with a sensor (EasyFerm Plus K8 200, HAMILTON, Switzerland) by NaOH 2 mol L⁻¹ and HCl 2 mol L⁻¹ solutions, after free evolution from 6.9, and temperature was controlled at 37 °C. The anaerobic conditions were reached before inoculation by bubbling nitrogen through the medium until no dissolved oxygen was detected by a pO₂ electrode (OxyFerm FDA 225, HAMILTON, Switzerland). Stirrer speed was changed in different runs from 100 to 1000 rpm.

Every run was carried out three times and the confidence intervals have been calculated by t-student test at 95% of confidence level. Culture samples were taken at different times during every run to measure biomass concentration and broth composition after removing the biomass by centrifugation (14 000 × g for 10 min).

Analytical methods

Biomass concentration was determined by optical density at 600 nm (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1603, Japan). The cell dry mass (CDM), 105 °C until constant weight, is related to the optical density (OD₆₀₀) according to the following

equation:

$$CDM \text{ (g/L)} = 0.403 \times OD_{600} \quad (1)$$

The influence of shear stress over biomass growth was also determined by colony viable counting in LB medium Petri dishes. Culture samples were taken from the bioreactor during every batch and seeded in LB medium Petri dishes after serial dilutions in saline serum solution. The dishes were cultivated at 37 °C for 24 h in an incubator (Function Line B6, Heraeus, Germany).

Cells from anaerobic shear stress cultures were prepared for transmission electron microscopy (TEM) as previously described.³⁵ Micrographs of *S. blattae* were taken at different cultivation times in order to determine the cellular integrity at several stirrer speeds throughout the fermentation time. The average cell size was determined by measuring the length of fifty different cells per sample and the confidence interval was calculated by t-student test at 95% of confidence level.

Glycerol and the other mixed acid route metabolites, such as PDO, acetic acid, lactic acid, succinic acid and ethanol, were quantified by HPLC (Agilent Technologies, 1100 Series, USA), using a Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) column (300 × 7.8 mm, Phenomenex, USA), coupled to a Waters 2414 Refractive Index Detector. The mobile phase employed was H₂SO₄ 0.005 mol L⁻¹ and the flow rate was 0.6 mL min⁻¹. Column temperature was controlled at 65 °C, while the refractive index detector operated at 55 °C. The sample volume was 5 μL.

Mathematical methods

A kinetic model previously proposed³³ was fitted to the experimental data of biomass (X), glycerol (G), 1,3-propanediol (PDO), and by-products (BP) concentrations with time. The model is formed by the following equations:

$$R_X = \frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{max}}\right) \quad (2)$$

$$R_{PDO} = \frac{dC_{PDO}}{dt} = \frac{K_{1,PDO} \cdot C_G \cdot C_X}{1 + K_{2,PDO} \cdot C_G} \quad (3)$$

$$R_{BP} = \frac{dC_{BP}}{dt} = \frac{K_{1,BP} \cdot C_G \cdot C_X}{1 + K_{2,BP} \cdot C_G} \quad (4)$$

$$R_G = -v_{G/X} \cdot R_X - v_{G/PDO} \cdot R_{PDO} - v_{G/BP} \cdot R_{BP} \quad (5)$$

where R_X , R_{PDO} , R_{BP} and R_G are the production rates of biomass, PDO, BP and glycerol, and $v_{G/X}$, $v_{G/PDO}$ and $v_{G/BP}$ are the coefficients

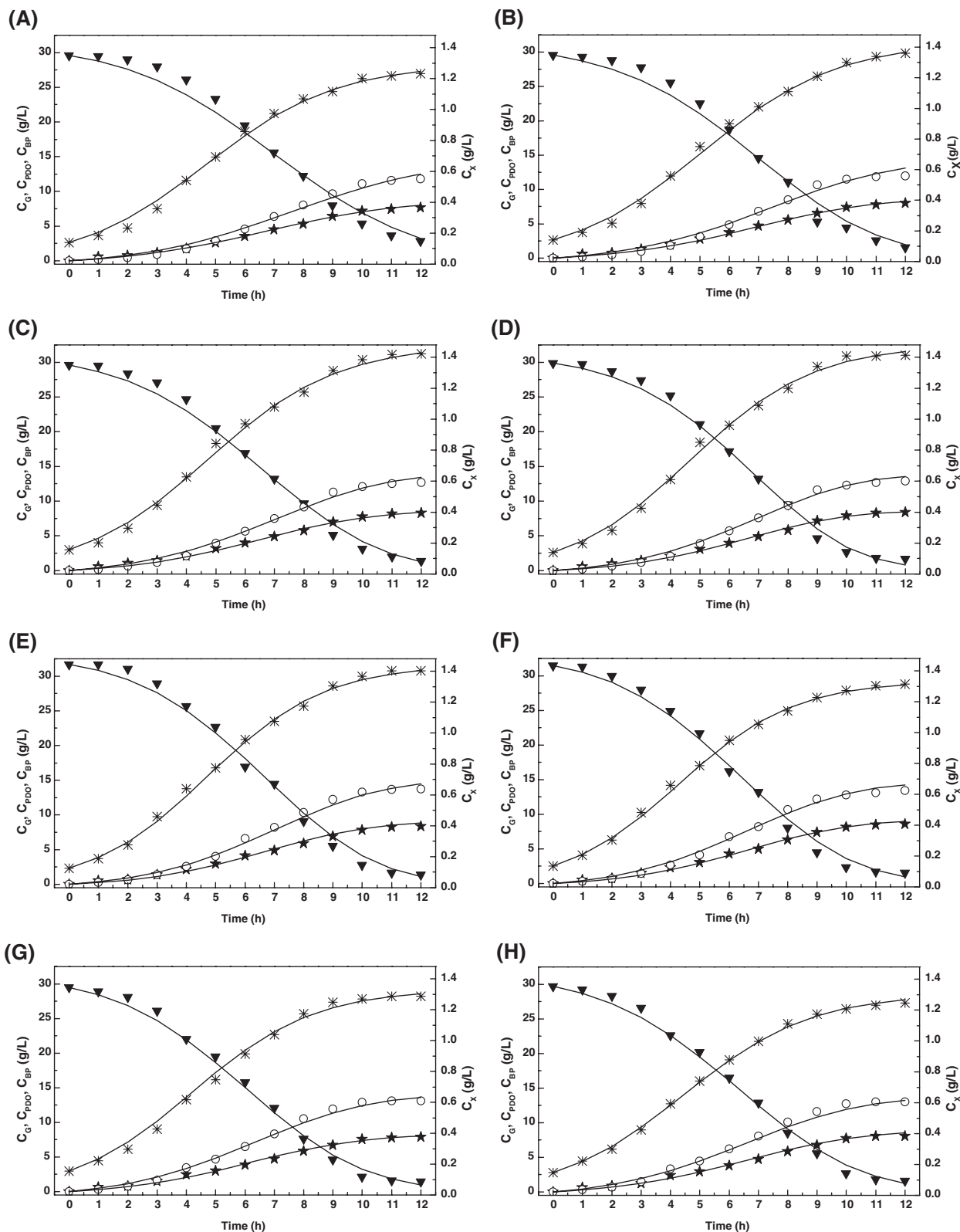


Figure 1. Experimental biomass (✱), glycerol (▼), 1,3-propanediol (○) and by-products (○) concentrations with time and kinetic model predictions (★) for *S. blattae* batch cultures in experiments carried out at different stirrer speeds: 100 rpm (A), 200 rpm (B), 300 rpm (C), 400 rpm (D), 500 rpm (E), 600 rpm (F), 800 rpm (G) and 1000 rpm (H).

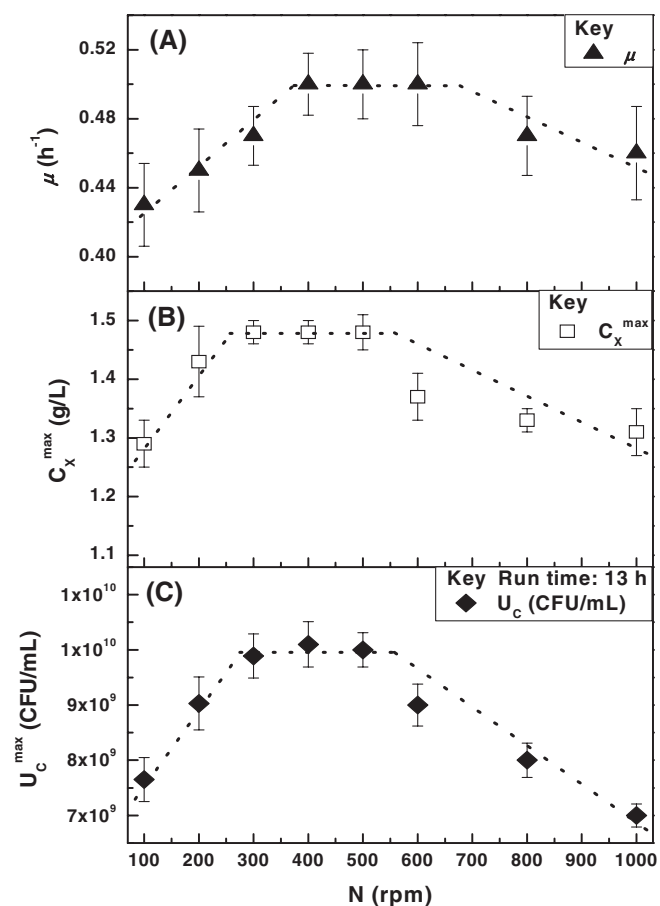


Figure 2. Kinetic parameters of biomass growth rate, μ (A) and C_x^{\max} (B), and final bacterial colony forming units, U_c^{\max} (C), obtained at different stirrer speeds.

representing how the substrate consumption rate relates with biomass growth, PDO and BP production rates, respectively.

The kinetic model was fitted to experimental data using Aspen Custom Modeler, applying the Levenberg–Mardquart algorithm together with numerical integration of the model using a fourth-order Runge–Kutta method. The validation of the fitting was performed on the basis of physicochemical and statistical criteria, including F-Fisher's value (F), the residual mean squared error (RMSE) and the variation explained (VE). The confidence intervals of kinetic parameters were determined by t-test at 95% confidence level. The statistical parameters employed to show the quality of the fittings are defined in an Appendix.

RESULTS AND DISCUSSION

Products distribution and substrate consumption

The final concentrations (after 12 h of cultivation time) of PDO, glycerol and the other mixed acid route metabolites in each run are presented in Table 1. As can be observed, under low agitation conditions, the glycerol is not totally taken up and 9.6% (w/w) remains after 12 h fermentation time. However, when the stirring speed employed is 200 rpm, glycerol consumption is more efficient and faster, because the total amount of this compound present at the end of the run is reduced to 5% (w/w). This value is maintained without significant variations in the runs carried out between 300 and 1000 rpm of stirrer speed (see Table 1).

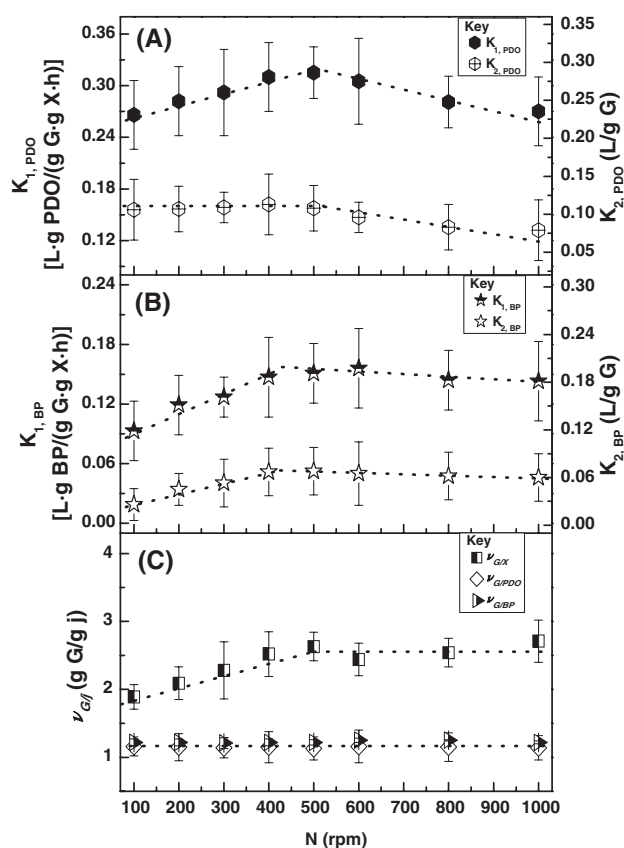


Figure 3. Kinetic model parameters of PDO production from raw glycerol by *S. blattae* in runs carried out at different stirrer speeds: PDO production rate (A), BP production rate (B) and glycerol consumption rate (C).

The metabolites distribution of the mixed acid route is also clearly affected by the fluid dynamic conditions. PDO production is favored by increasing stirrer speed to 500 rpm, reaching a maximum concentration value of 13.7 g L⁻¹.

From 600 to 1000 rpm, PDO concentration remains practically constant. Succinic acid and ethanol production present a similar evolution when stirrer speed is increased, although their concentrations decrease slightly at 500 rpm for ethanol and at 600 rpm for succinate. The synthesis of lactic acid is favored by increasing the stirring rate from 100 to 400 rpm if the agitation is increased its concentration is marginally lower. These small changes in carbon flux are reflected in the evolution of acetate concentration under different fluid dynamic conditions, reaching 4.1 g L⁻¹ at 1000 rpm.

This behavior may be due to the cellular chemical mechanisms to obtain energy according to the mixed acid route. The conversion of glycerol into pyruvate inside the cells involves the spending of two moles of ATP per mole of formed pyruvate, recovering only one mole of ATP by converting the dihydroxyacetone-3-phosphate into phosphoenolpyruvate.³⁶ This energetic disequilibrium is compensated by acetate synthesis, through the dephosphorylation of the acetyl-phosphate and the capture of the phosphate group from the ADP. Taking into account that the production of the other final metabolites of the pathway is only useful for regenerating the cell reducing power (converting NADH into NAD⁺), the synthesis of acetate is guessed as the only way to produce the necessary ATP to continue with the numerous metabolic cycles taking place inside the cells.^{36,37}

The glycerol consumption is increased when agitation is higher than 100 rpm, as can be seen in Table 1. For high agitation levels

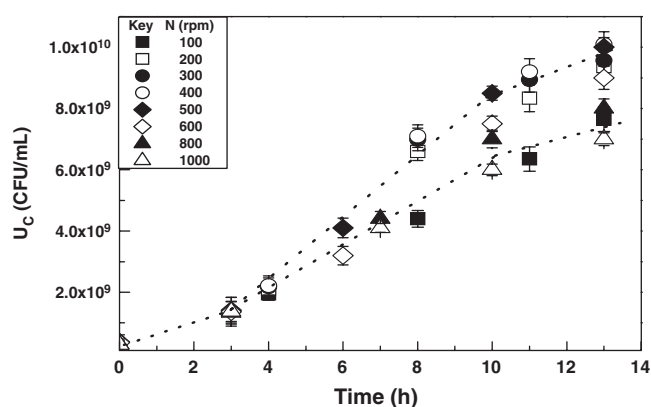


Figure 4. Evolution with time of the concentration of viable microbial colonies (U_c) in *S. Blattae* batch cultures in runs performed at different stirrer speeds.

the culture can be affected by shear stress and several branches of mixed acid route remain partially blocked, especially those producing succinate, lactate or ethanol. This deviation in carbon flux is diverted to acetate production, since the synthesis of PDO does not change significantly when the agitation is increased.

Kinetic modeling of growth and production rates

Kinetic model predictions and time course of glycerol, PDO, biomass and by-products concentrations are shown in Fig. 1. The kinetic model proposed, Equations (2) to (5), is able to describe the uptake and production rates of the different chemical species under all the fluid dynamic conditions studied, as can be seen in Fig. 1.

Biomass growth rate is described as usual by the logistic equation.^{16,38–40} The production of 1,3-propanediol is described according to a hyperbolic expression, while mixed acid route by-products were lumped into a single compound, as usually done in the kinetic modeling of complex reacting systems^{41–44} and also described by a hyperbolic model.⁴⁵

Substrate uptake rate (R_G) is related to the production rates described previously by the different yields ($v_{G/X}$, $v_{G/PDO}$, $v_{G/BB}$), which represent the relative weight of the different production rates over the total consumption of glycerol (see Equation (5)).

The validity of the proposed kinetic model is based on both the excellent fitting to experimental results and the values of the statistical parameters of Table A1, in the Appendix section of this paper. As can be seen, the calculated values of $F(F_{cal})$ are much higher than the values of F_{tab} in all the runs conducted at different agitation conditions. Therefore, the null hypothesis is fulfilled and all the fittings pass the F-test (see also Appendix section). Moreover, the values of RMSE and SSR are low, taking into account that four chemical species are fitted simultaneously

in each run, and the variation explained (VE) is close to 100% in all the experimental conditions studied.

The influence of agitation conditions over microbial growth can be analyzed according to the evolution of the kinetic model parameters of biomass growth (Equation (2)) and the final CFU concentration, given in Fig. 2. The values of biomass growth rate (μ) at several stirrer speeds are shown in Fig. 2(A). This parameter increases with stirring speed, in the runs carried out between 100 and 400 rpm, and remains practically constant in the experiments conducted from 400 to 600 rpm, with a value of around 0.5 h^{-1} . Subsequently, at higher agitation speed, a gentle drop in ' μ ' is observed, its value reached at 1000 rpm being very similar to that obtained in the run conducted at 100 rpm (see Fig. 2(A)). The evolution of C_X^{max} , the biomass concentration reached at the stationary growth stage, is presented in the Fig. 2(B). The values of this parameter follow the same trend as ' μ ', increasing first in the runs carried out at low agitations and then remaining fixed when the stirrer speed is varied from 300 to 500 rpm. Afterwards, at agitations higher than 500 rpm, C_X^{max} decreases dramatically, as a consequence of the effects of hydrodynamic stress over the culture.

The prior hypothesis is confirmed by the results of the Fig. 2(C), where the total cellular viable concentrations at the end of the runs (12 h) carried out under different stirrer speeds are shown. The final CFU concentration increases with stirring speed in the runs performed from 100 to 300 rpm. Under higher agitation conditions it remains constant up to the run carried out at 500 rpm, and then decreases clearly in the runs conducted from 600 rpm to 1000 rpm (see Fig. 2(C)).

Figure 3 shows the values of the kinetic parameters of Equations (3), (4) and (5) for the runs carried out at different stirrer speeds. Regarding the PDO production rate (see Fig. 3(A)), defined by the kinetic constants $K_{1,PDO}$ and $K_{2,PDO}$, their values have an evolution that is a function of both rates of substrate consumption and microbial growth (see Equation (3)). The kinetic constant $K_{1,PDO}$ evolves following the same trend as the total PDO produced, reaching its maximum value in the run conducted at 500 rpm. On the contrary, $K_{2,PDO}$ remains practically constant while the biomass growth rate is not negatively influenced by the fluid-dynamic conditions. In those cases, its value decreases when the stirring speed is increased (see Fig. 3(A)). Nevertheless, if the parameter confidence intervals are considered, it can be argued that PDO production occurs at the same rate between 200 and 500 rpm, i.e. the biochemical reaction network takes place at its maximum rate within this range of fluid dynamic conditions. If the stirring speed is higher, the microbial growth starts being affected by shear stress, as described above, and PDO production becomes slower, but it can be considered that the values of $K_{1,PDO}$ and $K_{2,PDO}$ hardly change. This behavior is evidenced under the most aggressive fluid dynamic conditions (see Figs 2(A) and 3(A)). The same interpretation can be made to explain the evolution

Table 2. Time course of *S. blattae* average cell size ($\lambda + \Delta\lambda$, μm) determined from TEM images in runs conducted at different stirrer speeds

N (rpm) t (h)	100	200	300	400	500	600	800	1000
0	1.07 ± 0.05	1.08 ± 0.03	1.21 ± 0.11	1.16 ± 0.08	1.11 ± 0.11	1.13 ± 0.07	1.12 ± 0.06	1.12 ± 0.07
3	1.06 ± 0.06	1.04 ± 0.06	1.20 ± 0.06	1.09 ± 0.21	1.09 ± 0.12	1.09 ± 0.08	1.00 ± 0.05	0.92 ± 0.03
7	1.06 ± 0.03	1.05 ± 0.04	1.04 ± 0.06	1.05 ± 0.10	1.02 ± 0.09	0.97 ± 0.06	0.98 ± 0.03	0.91 ± 0.04
10	1.06 ± 0.08	1.06 ± 0.05	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.05	0.94 ± 0.08	0.89 ± 0.11	0.90 ± 0.05	0.88 ± 0.07
12	1.06 ± 0.05	1.06 ± 0.06	0.98 ± 0.06	0.96 ± 0.04	0.93 ± 0.05	0.88 ± 0.09	0.87 ± 0.07	0.84 ± 0.04

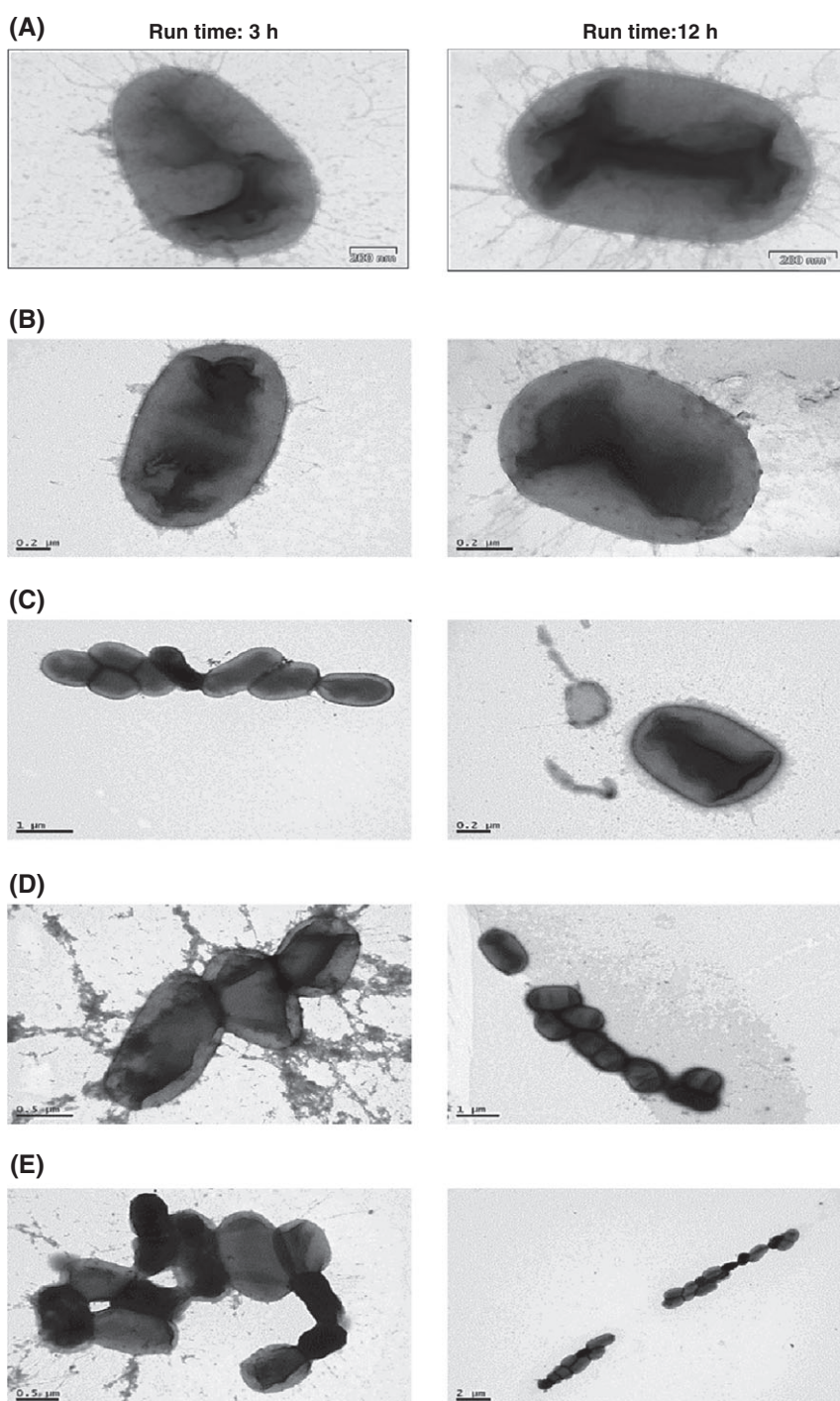


Figure 5. TEM images of *S. blattae* cells in batch cultures carried out at the following stirrer speeds: 100 rpm (A), 500 rpm (B), 600 rpm (C), 800 rpm (D) and 1000 rpm (E).

of the values of $K_{1, BP}$ and $K_{2, BP}$, shown in Fig. 3(B), which define the BP production rate. Thus, the production rate of by-products also seems to be influenced only by biomass growth rate, but the kinetic parameters of the lumped reaction of BP production can be considered constant at all stirrer speeds studied.

The evolution of the mass yield parameters of Equation (4) ($v_{G/PDO}$, $v_{G/BP}$ and $v_{G/X}$) in the runs performed at different stirrer speeds is shown in Fig. 3(C). As can be seen, their values are practically invariable for PDO and BP (see Fig. 3(C)), which means that the carbon metabolic flux with respect to these two chemical

compounds remains practically constant under any fluid dynamic condition tested. It should be noted that the constancy in the values of $v_{G/BP}$ can be explained due to the compensation between the decreases of the final concentrations of succinate, lactate and ethanol and the increase of the final acetate content (see also Table 1). The biomass yield parameter, $v_{G/X}$, is increased when the stirrer speed is increased from 100 to 500 rpm, within the interval from 1.89 to 2.71 g G⁻¹ X (see Fig. 3(C)). For higher agitation conditions this parameter takes a constant value, indicating that more glycerol has been spent to synthesize cells, since the

biomass concentration is lower at the end of the run than the value reached under non shear stressed culture conditions (see also Fig. 2(A) and (B)).

Effect of fluid dynamic conditions on biomass viability

The evolution with time of *S. blattae* viable colonies, counted in LB plates at different agitation levels, is presented in Fig. 4. As can be observed, biomass growth is favored by increasing stirrer speed, within the interval from 100 to 600 rpm, reaching a maximum viable colonies value close to 1.5×10^{10} CFU mL⁻¹. Nevertheless, for agitations of 800 and 1000 rpm the negative effects of shear stress on microbial growth can be observed in the same figure; under these conditions, the viable microbial colonies evolve more slowly. The dotted lines present in Fig. 4 help to understand the change of behavior in colonies growth with respect to the fluid dynamic conditions. The runs conducted at stirrer speeds from 200 to 500 rpm present a similar evolution of viable colonies; all of them can be drawn inside the upper dotted line if confidence intervals are considered. Similarly, the runs performed at 100, 800 and 1000 rpm can be represented according to the lower dotted line, while the experiment carried out at 600 rpm presents an intermediate behavior within these two branches, where the cells start to suffer from shear stress effects (see Fig. 4).

Taking into account all of the culture parameters analyzed, it can be affirmed that the negative effects of shear stress over the culture can be observed from 600 rpm, affecting the biomass growth and altering marginally the metabolites distribution (see Table 1 and Figs 2(A), 2(B), and 4). This can clearly be seen in Fig. 2(C). As indicated above, the final CFU concentration reached increases with stirring speed in the runs performed from 100 to 300 rpm; under upper agitation conditions, the final CFU concentration remains constant until 500 rpm; and then decreases clearly in the runs conducted from 600 rpm to 1000 rpm.

Transmission electronic microscopy (TEM) culture images were taken at different batch times in order to determine the evolution of average cell size, applying the corresponding scale factor, and also to study in more depth the possible cellular damage caused by hydrodynamic stress. The evolution with time of cell size in runs conducted under different agitation conditions is given in Table 2. As can be seen, the average cell size (λ) is maintained invariable with time within a range of stirring speeds between 100 and 400 rpm (0.95–1.1 μ m, approximately). However, if the stirrer speed is higher than 500 rpm, an important decrease in this variable is clearly observed, mainly at later times during fermentation. This effect is very clear in the run conducted at 800 rpm, when the cell size decreases by 23%, approximately, in the latter stages of the run (see Table 2). These observations are useful to describe an additional bacterial response to shear stress conditions: cells of *S. blattae* are adapted to an aggressive environment by downsizing.

TEM images are also useful to evaluate how the cells relate to each other during their cultivation and how the fluid dynamic conditions can affect their morphology and integrity. Figure 5 shows several TEM images of *S. blattae* in the early and later stages of growth in the experiments carried out at 100, 500, 600, 800 and 1000 rpm. If the run is conducted under moderate agitation conditions (Figs 5(A) and (B)), cells are observed individually in TEM images and no apparent cellular damage can be distinguished (e.g. alterations in bacterial wall or free cellular fragments in the broth). The results in the run conducted at 500 rpm stirrer speed (Fig. 5(C)) are different; *S. blattae* cells appear associated

with each other, forming bacterial chains of 3 to 10 units, or cell groups in aggregates, and some cell components are observed around the individuals, as can be seen in Fig. 5(D) and 5(E). These observations reveal both cell damage and bacterial response to shear stress conditions, together with the metabolic changes and size modifications described above.

CONCLUSIONS

The effects of changes in fluid dynamic conditions on PDO production from raw glycerol using *S. blattae* cultures have been studied. The experiments were carried out in a 3 L STBR in batch operation, varying the stirrer speed between 100 and 1000 rpm.

A kinetic model has been employed to describe the biomass growth rate, substrate uptake rate and metabolites production rates. The kinetic model is able to fit to the experimental results of all the experiments carried out, under different fluid dynamic conditions, in a very satisfactory manner. By increasing the stirrer speed from 100 to 500 rpm, an increase of growth rate is observed; maximum PDO and by-product concentrations and rates also increase with stirrer speed in the runs carried out in this interval of stirrer speeds. This fact must be due to the increase in transport rate, probably through the cell membrane or the interphase liquid-cells.

From 600 to 1000 rpm, the growth rate decreases and the maximum concentrations and production rates of the different metabolites remain practically constant, except for acetate.

Viable colony counting was performed in LB agar plates and TEM images were taken in order to measure cellular size (length and area) and bacterial response to shear stress conditions. *Shimwellia blattae* average cell size remained constant over time when the stirrer speed was lower than 500 rpm, while at higher agitation conditions, the cells adapted to shear stress by reducing their size. Likewise, from 500 to 1000 rpm, cells appeared associated, forming bacterial linear chains or aggregates, as a collective response to aggressive fluid-dynamic conditions. Under these latter fluid dynamic conditions, cell fragments were observed around the individuals, indicating that shear stress is compromising the microbial integrity mainly at long times.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by MICINN under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

FUNDING INFORMATION

MICINN under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134

REFERENCES

- 1 Merchuk JC, Shear effects on suspended cells, in *Bioreactor Systems and Effects*. Springer, Berlin, Heidelberg, 65–95 (1991).
- 2 Toma MK, Ruklisha MP, Vanags JJ, Zeltina MO, Lette MP, Galinine NI et al., Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnol Bioeng* **38**:552–556 (1991).
- 3 Silva-Santisteban BOY and Filho FM, Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microbial Technol* **36**:717–724 (2005).
- 4 Gomez E, Alcon A, Escobar S, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochem Eng J* **99**:138–146 (2015).

- 5 Garcia-Ochoa F, Gomez E, Alcon A and Santos VE, The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* **36**:911–925 (2013).
- 6 Garcia-Ochoa F and Gomez E, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv* **27**:153–176 (2009).
- 7 Joshi JB, Elias CB and Patole MS, Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chem Eng J Biochem Eng J* **62**:121–141 (1996).
- 8 Büchs J, Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* **7**:91–98 (2001).
- 9 Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE and Merchuk JC, Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem Eng J* **49**:289–307 (2010).
- 10 Meijer JJ, ten Hoopen HJG, van Gameren YM, Luyben KCAM and Libbenga KR, Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microbial Technol* **16**:467–477 (1994).
- 11 Sahoo S, Rao KK and Suraiashkumar GK, Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* **94**:118–127 (2006).
- 12 Li Y, Huang Z, Ruan W, Ren H and Miao H, Performance and microbial response during the fast reactivation of Anammox system by hydrodynamic stress control. *J Environ Sci* **26**:1861–1868 (2014).
- 13 Simões M, Simões LC and Vieira MJ, Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. *Int J Food Microbiol* **128**:309–316 (2008).
- 14 Baumgarten T, Sperling S, Seifert J, von Bergen M, Steiniger F, Wick LY *et al.*, Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **78**:6217–6224 (2012).
- 15 Kao P-M, Chen C-I, Huang S-C, Chang Y-C, Tsai P-J and Liu Y-C, Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochem Eng J* **34**:172–178 (2007).
- 16 Escobar S, Rodriguez A, Gomez E, Alcon A, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess Biosyst Eng* **39**:545–554 (2016).
- 17 Wase DAJ and Ratwate HAM, Variation of intracellular sodium and potassium concentration with changes in agitation rate for chemostat-cultivated *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **22**:325–328 (1985).
- 18 Arnaud JP, Lacroix C, Foussereau C and Choplin L, Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Biotechnol* **29**:157–175 (1993).
- 19 Yerushalmi L and Volesky B, Importance of agitation in acetone-butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* **27**:1297–1305 (1985).
- 20 Paul E, Mulard D, Blanc P, Fages J, Goma G and Pareilleux A, Effects of partial O₂ pressure, partial CO₂ pressure, and agitation on growth kinetics of *Azospirillum lipoferum* under fermentor conditions. *Appl Environ Microbiol* **56**:3235–3239 (1990).
- 21 Boswell CD, Nienow AW, Gill NK, Kocharunchitt S and Hewitt CJ, Brewing the impact of fluid mechanical stress on *Saccharomyces Cerevisiae* cells during continuous cultivation in an agitated, aerated bioreactor; its implication for mixing in the brewing process and aerobic fermentations. *Food Bioprocess Process* **81**:23–32 (2003).
- 22 Sabra W, Lünsdorf H and Zeng A-P, Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology* **149**:2789–2795 (2003).
- 23 Zeng A-P and Sabra W, Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Current Opin Biotechnol* **22**:749–757 (2011).
- 24 Lee CS, Aroua MK, Daud WMAW, Cognet P, Pérès-Lucchese Y, Fabre PL *et al.*, A review: conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. *Renew Sustain Energy Rev* **42**:963–972 (2015).
- 25 Garlapati VK, Shankar U and Budhiraja A, Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol Rep* **9**:9–14 (2016).
- 26 Jenkins BM, Global agriculture: industrial feedstocks for energy and materials, in *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, ed by Alfen NKV. Academic Press, Oxford, 461–498 (2014).
- 27 Celinska E, Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. *Biotechnol Adv* **28**:519–530 (2010).
- 28 Andres S, Wiezer A, Bendfeldt H, Waschowitz T, Toeche-Mittler C and Daniel R, Insights into the genome of the enteric bacterium *Escherichia blattae*: cobalamin (B12) biosynthesis, B12-dependent reactions, and inactivation of the gene region encoding B12-dependent glycerol dehydratase by a new mu-like prophage. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**:150–168 (2004).
- 29 Kaur G, Srivastava AK and Chand S, Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem Eng J* **64**:106–118 (2012).
- 30 Kivisto A, Santala V and Karp M, 1,3-propanediol production and tolerance of a halophilic fermentative bacterium, *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. *J Biotechnol* **158**:242–247 (2012).
- 31 Rodriguez A, Wojtusik M, Ripoll V, Santos VE and Garcia-Ochoa F, 1,3-propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: operational conditions and kinetics in batch cultivations. *Bioresource Technol* **200**:830–837 (2016).
- 32 Heinrich D, Andreessen B, Madkour MH, Al-Ghamdi MA, Shabbaj II and Steinbuechel A, From waste to plastic: synthesis of poly(3-hydroxypropionate) in *Shimwellia blattae*. *Appl Environ Microbiol* **79**:3582–3589 (2013).
- 33 Rodriguez A, Wojtusik M, Masca F, Santos VE and 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* **117**:57–65 (2017).
- 34 Rhee JI, Bode J, DiazRicci JC, Poock D, Weigel B, Kretzmer G *et al.*, Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM109 and on the production of the fusion protein EcoRI::SPA. *J Biotechnol* **55**:69–83 (1997).
- 35 Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S, Moore ERB, Abraham W-R, Lünsdorf H *et al.*, *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J System Evolution Microbiol* **48**:339–348 (1998).
- 36 Celińska E and Grajek W, Biotechnological production of 2,3-butanediol – current state and prospects. *Biotechnol Adv* **27**:715–725 (2009).
- 37 Henriksen C and Nilsson D, Redirection of pyruvate catabolism in *Lactococcus lactis* by selection of mutants with additional growth requirements. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**:767–775 (2001).
- 38 Luedeking R and Piret EL, A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng* **1**:393–412 (1959).
- 39 Weiss RM and Ollis DF, Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnol Bioeng* **22**:859–873 (1980).
- 40 Gomez E, Santos VE, Alcon A and Garcia-Ochoa F, Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chem Eng Sci* **61**:4595–4604 (2006).
- 41 Garcia-Ochoa F, Romero A and Santos VE, Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *Int Chem Eng* **32**:538–551 (1992).
- 42 Olmo CH, Alcon A, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization. *Enzyme Microbial Technol* **2**:157–166 (2005).
- 43 Adam M, Calemme V, Galimberti F, Gambaro C, Heiszwolf J and Ocone R, Continuum lumping kinetics of complex reactive systems. *Chem Eng Sci* **76**:154–164 (2012).
- 44 Lin B, Leibovici CF and Jørgensen SB, Optimal component lumping: problem formulation and solution techniques. *Comput Chem Eng* **32**:1167–1172 (2008).
- 45 Kaur G, Srivastava AK and Chand S, Determination of kinetic parameters of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium diolis* using statistically optimized medium. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**:1147–1156 (2012).

Appendix: Statistical parameters employed

F is based on the null hypothesis and backs the validation of the model to the observed data of the experimental variables. It is defined according the following equation:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N \left(\frac{y_{i, calc}}{P} \right)^2}{\sum_{i=1}^N \frac{SSR}{N-P}} \quad (\text{A.1})$$

where N is the total number of experimental data, P is the number of parameters in the model; SSR is the squared sum of residues, $(y_{i, exp} - y_{i, calc})^2$, and $y_{i, calc}$ and $y_{i, exp}$ are the experimental and calculated values of the variable, respectively.

The parameter $RMSE$ represents a measure of the global difference between the predicted and experimental values, because it includes the total amount of available data and the number of parameters of the model, through Equation (A.2):

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{N-P}} \quad (\text{A.2})$$

VE, given by Aspen Custom Modeler as a percentage, is another parameter that informs about the goodness of the fitting, given by:

$$VE (\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^L SSQ_l}{\sum_{l=1}^L SSQ_{mean_l}} \right) \quad (\text{A.3})$$

where SSQ_l and SSQ_{mean_l} are defined as follows:

Table A1. Statistical parameters resulting from the kinetic model fitting to experimental data in runs performed at different stirrer speeds

N (rpm)	F_{tab}	F_{cal}	RMSE	SSR	VE (%)
100	2.12	616	0.94	24.7	98.5
200		641	0.92	24.8	98.7
300		757	0.84	14.0	99.3
400		855	0.80	15.5	99.2
500		635	0.98	16.2	99.3
600		1114	0.73	13.6	99.4
800		718	0.84	9.81	99.5
1000		759	0.83	9.77	99.5

$$SSQ_l = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i, exp} - y_{i, calc})^2}{y_{i, calc}^{\gamma_l}} \quad (\text{A.4})$$

$$SSQ_{mean_l} = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i, exp} - \bar{y}_{i, exp})^2}{y_{i, calc}^{\gamma_l}} \quad (\text{A.5})$$

with

$$\bar{y}_{i, exp} = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{y_{i, exp}}{y_{i, calc}^{\gamma_l/2}}}{\sum_{i=1}^N \frac{1}{y_{i, calc}^{\gamma_l/2}}} \quad (\text{A.6})$$

The parameter γ_j is the heteroscedasticity parameter, which is related to the different dispersion in the error between the measured and the estimated variable. By default, Aspen Custom Modeler fixes its value at 1.

Publicación 5

Autores: Alberto Rodríguez, Vanessa Ripoll Victoria E. Santos.
Emilio Gómez y Félix García-Ochoa

Título: Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: Oxygen transfer and uptake rates

Revista: Journal of Chemical Technology and Biotechnology (2017),
DOI: 10.1002/jctb.5120

Índice de impacto (2015): 2,738

Área: Ingeniería Química

Resumen

En cultivos aerobios, la importancia del estudio de las condiciones fluido-dinámicas no sólo es necesaria para la identificación de los diferentes regímenes de circulación del fluido y la posible aparición de un estrés de tipo hidrodinámico, sino que también es fundamental para entender el papel del oxígeno como nutriente y los efectos derivados de la modificación de la velocidad de transporte de este nutriente (OTR) en un bioproceso aerobio. El trabajo pretende evaluar la respuesta de los cultivos de *Raoultella terrigena* en STBR a los cambios en las condiciones fluido-dinámicas, variando la velocidad de agitación, en la producción de 2,3-butanodiol (2,3-BD) a partir de glicerol.

El proceso se desarrolla bajo condiciones de limitación de transporte de oxígeno cuando la velocidad del agitador está entre 100 y 400 rpm; en este intervalo, el aumento de la velocidad de agitación mejora el crecimiento del biocatalizador, el consumo de sustrato y desplaza el flujo de carbono desde la producción de metabolitos relacionados con la fermentación (etanol, ácido láctico), hacia otros de diferente estado de oxidación (2,3-BD y acetoína).

A partir de una agitación de 550 rpm, la etapa limitante del proceso es la velocidad de consumo de oxígeno (OUR). El flujo de carbono se dirige entonces completamente hacia la producción de biomasa y, en consecuencia, la liberación de dióxido de carbono como metabolito final del proceso. La respuesta microbiana a unas condiciones fluido-dinámicas agresivas (a partir de 700 rpm) se refleja con un gran aumento de la viscosidad del caldo, probablemente debida a la secreción de exo-polisacáridos, como ocurre con otros biocatalizadores sometidos a estrés oxidativo. Los efectos negativos derivados de las altas agitaciones aparecen claramente en los experimentos realizados a 1900 y 2000 rpm, en los que se observa un descenso en la velocidad de crecimiento, en la concentración de biomasa en la fase estacionaria y en la concentración de colonias viables en placa.

El estudio demuestra que *R. terrigena* es capaz de adaptar el flujo metabólico de carbono en función de la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo y adaptarse a condiciones de estrés oxidativo e hidrodinámico muy agresivas. El papel del oxígeno como nutriente en los bioprocesos aerobios vuelve a mostrarse como una variable fundamental de estudio, con vistas a la posible aplicación industrial y el cambio de escala de los mismos.

Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: oxygen transfer and uptake rates

Alberto Rodriguez, Vanessa Ripoll, Victoria E Santos, Emilio Gomez and Felix Garcia-Ochoa*

Abstract

BACKGROUND: The fluid dynamic conditions play a key role in the development and scaling-up of bioprocesses. In aerobic cultures, oxygen is an essential substrate for microbial growth, production and culture maintenance; an effective gas–liquid transfer must be achieved. Changes in fluid dynamics due to stirrer speed can affect the culture negatively, causing hydrodynamic stress (increasing shear stress) or oxidative stress (by an increase of available oxygen in the liquid phase).

RESULTS: Under oxygen-limiting conditions, specific growth rate increases with stirrer speed, and several fermentation products were specifically released to the culture medium. 2,3-butanediol production increased with stirrer speed, reaching a maximum at 400 rpm. When the agitation was increased over 550 rpm, the metabolic flux was mainly routed to increase the cell growth. Negative effects of fluid dynamic conditions on biomass production were observed at 1900 and 2000 rpm. Cellular response to shear stress conditions was also shown in the large increase of the broth viscosity over time.

CONCLUSIONS: *Raoultella terrigena* is able to adapt the carbon metabolic flux to the availability of oxygen, producing fermentation products, alcohols or directing microbial growth. Moreover, cells can withstand aggressive agitation conditions (up to 1600 rpm).

© 2016 Society of Chemical Industry

Keywords: 2,3-butanediol; *Raoultella terrigena*; fluid dynamics; hydrodynamic and oxidative stress; oxygen mass transfer coefficient; stirred tank bioreactor

NOTATION

a	Specific interfacial area (m ²)
C_j	Concentration of compound j (g L ⁻¹)
C_{O_2}	Concentration of oxygen in the medium (mol L ⁻¹)
$C_{O_2}^*$	Oxygen concentration in equilibrium with gas concentration (mol L ⁻¹)
C_x	Biomass concentration (g L ⁻¹)
CMD	Cell dry mass (g L ⁻¹)
CO ₂	Carbon dioxide
Da	Damköhler number (-)
d_b	Bubble diameter (m)
D_L	Mass diffusion coefficient (m ² s ⁻¹)
F_{O_2}	Oxygen molar flow rate (mol s ⁻¹)
K	Consistency index in a power-law model (Pa.s ^{n})
k_L	Mass transfer coefficient (m s ⁻¹)
$k_{L,a}$	Volumetric oxygen mass transfer coefficient (s ⁻¹)
N	Stirrer speed (rpm)
n	Flow behaviour index (-)
OD ₆₀₀	Optical density at 600 nm
OTR	Oxygen transfer rate (mmol O ₂ L ⁻¹ s ⁻¹)
OUR	Oxygen uptake rate (mmol O ₂ L ⁻¹ s ⁻¹)
t	Time (s or h)

V	Volume of the liquid in the vessel (L)
Y_i	Molar yields of compound j (-)

Greek Letters

ϵ	Energy dissipation rate per unit mass (W kg ⁻¹)
η	Effectiveness factor for oxygen uptake rate (-)
η_{MT}	Effectiveness factor for oxygen transfer rate (-)
θ	Gas hold-up (-)
μ_a	Apparent liquid viscosity (Pa s)
μ_{max}	Specific maximum growth rate (h ⁻¹)
ρ_L	Liquid density (kg m ⁻³)

Subscripts

AA	referred to acetate
Ac	referred to acetoin

* Correspondence to: F Garcia-Ochoa, Department of Chemical Engineering, Facultad CC, Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense, 28040-Madrid, Spain. Email: fgchoa@ucom.es

Department of Chemical Engineering, Facultad CC, Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense, 28040-Madrid, Spain

BD	referred to 2,3-butanediol
CO ₂	referred to carbon dioxide
DO	referred to dissolved oxygen
Et	referred to ethanol
G	referred to glycerol
L	relative to liquid phase
La	referred to lactate
max	referred to maximum value
Su	referred to succinate
X	referred to biomass
0	referred to initial value

Superindexes

IN	referred to inlet.
max	referred to maximum value
OUT	referred to outlet

INTRODUCTION

In aerobic bioprocesses, oxygen is a key substrate employed for cell growth and maintenance, and also for other metabolic routes, including product and by-product synthesis. Bioprocess development and performance are dependent not only on an efficient biocatalyst, but also on operating conditions and physiochemical properties of gas and liquid phases, affecting the relative rates of different phenomena taking place.

One of the most important factors affecting aerobic bioprocesses is the gas–liquid oxygen transfer rate, because the rate of oxygen consumption (OUR) by cells is usually high, compared with the rate of oxygen transfer (OTR).^{1–5} A balance between OTR and OUR determines the dissolved oxygen (DO) concentration, which may significantly affect the process performance.^{6–10}

In stirred tank bioreactors (STBR), if stirrer speed is increased, the mass transfer coefficient also increases and the fluid dynamics can affect the culture, provoking hydrodynamic stress (by increasing the shear stress) or oxidative stress (by increasing DO concentration). This may affect the growth rate,^{11–14} but also the production rate of the different metabolites,¹⁵ or both.^{16,17}

Raw glycerol, the main by-product in biodiesel manufacture (10% w/w), has been considered as a feedstock for other platform chemicals in order to reduce its negative impact over the economic viability of biodiesel production and its accumulation as industrial waste.^{18–20} Bioconversion of glycerol presents advantages over the chemical route, such as more selectivity, moderate operating conditions and less energy demand, and provides useful chemical platforms like 1,3-propanediol, ethanol, D-lactic acid, propionic acid or 2,3-butanediol (BD).^{21,22}

2,3-butanediol (BD) has a large number of applications in the synthesis of many raw materials^{23,24} and also presents potential uses in perfumes, fumigants, moistening agents, pharmaceuticals, plasticizers, food and explosives.^{25,26} Several bacteria, belonging to genera *Bacillus*, *Enterobacter* and *Klebsiella*, are able to produce BD using glucose and other sugars (mannose, lactose or fructose) as substrates.^{23,25,27} There are different bacterial strains able to produce BD from glycerol, by means a metabolic pathway where glycerol is degraded by oxidative and reductive routes, depending on the DO concentration.^{28,29} Recently, *Raoultella terrigena* has been proposed as biocatalyst to produce BD from glycerol.³⁰ The DO concentration is considered one of the most important variables affecting bioprocess performance, due to its influence on the key enzymes of the pathway and, hence, over

the cell metabolic flux.^{23,25} At low DO concentrations, glycerol is converted into 3-hydroxypropionaldehyde through glycerol dehydrogenase, and subsequently reduced to 1,3-propanediol by a dehydrogenase; both enzyme activities are regulated by coenzyme B12 and NADH, respectively.^{31,32} At higher DO concentrations, glycerol is first converted to pyruvate and then it is channeled into a mixture of short chain organic acids (succinic, lactic, acetic and formic acids), ethanol, acetoin and BD.²³ In this case, a higher DO level leads to a biomass increase and, hence, to a higher BD production. Nevertheless, the BD production could be reduced by the deviation of metabolic flux to tricarboxylic acid cycle.^{28,33} Considering these published results, at least, if the oxygen supplied is lower than demand, fermentation products, such as ethanol and acetic acid, would be synthesized; while if the OTR is increased, metabolic flux could move to BD and acetoin production. However, if the oxygen provided exceeds microbial demand, some authors have detected that only biomass and carbon dioxide (CO₂) are produced.²³

According to the methodology proposed in previous work,^{9,13,16} OTR and OUR must be related with potential hydrodynamic and/or oxidative cellular stress, and OUR could be used as a stress indicator.³⁴ The effects of changing fluid dynamic conditions by increasing stirrer speed can induce cell stress, either hydrodynamic or oxidative. Hydrodynamic stress is caused in agitated cultures by collisions between cells and between cells and the components of the reaction system, which involves shear injuries and mechanical damage.³⁵ Oxidative stress is produced when the ability of the biological system to readily detoxify the medium, due to the reactive intermediates and the reactive oxygen species, is unbalanced,³⁶ this disequilibrium of the normal redox state of the cells can cause toxic effects through the production of peroxides and free radicals able to cause cellular damage or changes in the cell metabolism.

The aim of this work is to study the influence of fluid dynamics on biomass growth rate, by-products and BD production by *R. terrigena* CECT 4519 cultures in a STBR, changing stirrer speed from 100 to 2000 rpm. The results will be explained as the coupling of OTR and OUR and, therefore, by the OD concentration level reached over time in each run. Also viable cells have been measured and several parameters have been defined taking into account the relative rates of the different phenomena taking place.

EXPERIMENTAL

Microorganism and medium

Raoultella terrigena CECT 4519 was the biocatalyst employed in this work. Cells were stored at –80°C in 50% w/w glycerol–saline serum solution before inoculation. Medium M92x was used for all cultures, with the following composition (per liter of deionized water): 2 g of NH₄Cl, 6 g of KH₂PO₄, 12 g of Na₂HPO₄, 1 g of NaCl, 0.246 g of MgSO₄ · 7H₂O, 0.011 g of CaCl₂ and 1.5 g of yeast extract. The initial glycerol concentration was 30 g L⁻¹ in all runs, including the inoculum build-up. The two-steps inoculum build-up was carried out in shaken flasks with 50 mL working volume, at 30°C and 210 rpm in an orbital shaker, for 14 and 4 h, respectively. These conditions were established in a previous work.³⁷

STBR batch culture procedure

Experiments were carried out in a 3 L Biostat® B-Plus (Sartorius AG Germany), with a working volume of 2000 mL. The bioreactor consisted of an unbaffled cylindrical vessel of inner diameter 13.5

cm and height 20 cm, with agitation by means of a dual six blade Rushton turbine system (5.3 cm diameter) coupled to an electrical motor (Kollmorgen 3θPM, Danaher Motion, Czech Republic). The reaction equipment was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. The experiments were carried out employing 12.5% (v/v) of an inoculum at adequate operating conditions determined in previous work:^{30,37} 30°C temperature, 0.25 g L⁻¹ initial biomass concentration, pH monitored at 5.5 after free evolution from 6.9 using 2 mol L⁻¹ NaOH and 2 mol L⁻¹ HCl solutions and airflow of 1.5 vvm. Stirrer speed was modified from 100 to 2000 rpm and the outlet gas bioreactor stream was coupled to a combined oxygen-carbon dioxide sensor for determining outlet gas composition. Culture samples were withdrawn during each run to determine biomass concentration and to quantify broth metabolite concentrations by HPLC, previously having removed the biomass by centrifugation (14000 × g for 10 min).

Analytical methods

Biomass concentration was determined by measuring the culture optical density at 600 nm (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1603). The cell dry mass (CDM), obtained after drying biomass at 105°C until constant weight, was related with optical density (OD₆₀₀), according to the following equation:

$$CDM \text{ (g/L)} = 1.616 \times OD_{600} \quad (1)$$

Colony viable counting was carried out in several runs in order to be compared with the OD measurements described above. Agar plates with LB medium³⁸ were seeded (three for each sample) from saline serum serially diluted samples taken at different times from the STBR. Microbial colonies appearing in the dishes after incubation at 30°C within 24 h were counted and the biomass concentration was determined as colony forming units (CFU) per mL of culture, applying the corresponding dilution factor.

Glycerol and other metabolites (succinate, lactate, acetate, ethanol, acetoin and BD) were quantified by HPLC (Agilent Technologies, 1100 Series), using a Rezex RHM-Monosaccharide H+ (8%) column (300 × 7.8 mm, Phenomenex), coupled to both refractive index and diode array detectors. The sample volume was 5 μL and 0.005 mol L⁻¹ H₂SO₄ was employed as mobile phase at 0.6 mL min⁻¹ flow rate. Column temperature was monitored at 65°C, while refractive index detector operated at 55°C.

Bioreactor outlet gas stream composition was determined using a combined oxygen-carbon dioxide sensor BioPAT[®] Xgas (Sartorius AG, Germany), connected to the STBR outlet gas stream. The sensor was calibrated before every run by circulating 3 L min⁻¹ of compressed air for 30 min.

Broth apparent viscosity (μ_a) was determined by measuring the shear stress (τ) at different shear rates (γ) in a Brookfield[®] Synchro-Electric Viscosimeter (Brookfield, USA), according to the Ostwald de Waele rheological model:

$$\tau = K \cdot \gamma^n = \mu_a \cdot \gamma \quad (2)$$

THEORETICAL BACKGROUND

Growth rate modeling

Microbial growth rate has been described according to Equation (3), employed in previous work for different bioprocesses:^{10,17,39}

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_{max} C_X \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{max}} \right) \quad (3)$$

If this equation is integrated with the boundary condition ($t = 0$; $C_X = C_{X0}$), the logistic growth equation is obtained:

$$C_X(t) = \frac{C_{X0} \exp(\mu_{max} t)}{1 - \frac{C_{X0}}{C_X^{max}} [1 - \exp(\mu_{max} t)]} \quad (4)$$

OTR and OUR determination

The oxygen mass balance in the liquid phase, assuming well-mixed culture, can be established by:⁵

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad (5)$$

OTR depends on the mass coefficient transfer, k_L , the specific interfacial area, a , and the driving force of the oxygen transfer, which is the difference between the equilibrium dissolved oxygen concentration in the liquid phase at working pressure and temperature, $C_{O_2}^*$, and the DO concentration in the broth, C_{O_2} , according to:

$$OTR = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (6)$$

OTR can be determined by an oxygen mass balance in the gas phase by the difference between the inlet and outlet oxygen molar flow rates ($F_{O_2}^{IN}$ and $F_{O_2}^{OUT}$, respectively), as follows:

$$\frac{F_{O_2}^{IN} - F_{O_2}^{OUT}}{V} = OTR \quad (7)$$

Once OTR is determined and DO concentration is measured in the liquid phase, $k_L a$ can be calculated directly from Equations (6) and (7), yielding:

$$k_L a = \frac{F_{O_2}^{IN} - F_{O_2}^{OUT}}{V \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})} \quad (8)$$

Then OUR can be calculated according to Equation (5), once OTR and DO oxygen profile are known, calculating dC_{O_2}/dt by numerical methods, such as those described elsewhere.¹⁷

Volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) prediction

In order to evaluate the validity of the experimental measurements of OTR and $k_L a$, calculated as indicated above, these values were compared with those given by semi-empirical prediction methods widely used in the literature for k_L and a .^{40,41} If the rheological behavior of the broth is described by the Ostwald de Waele model (see Equation (2)), the following equation is obtained to predict the mass transfer coefficient:

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left(\frac{\varepsilon \cdot \rho_L}{K} \right)^{\frac{1}{2(1+n)}} \quad (9)$$

The interfacial area (a) can be calculated from the values of the average bubble size (d_b) and the gas hold-up (θ), assuming spherical bubbles.⁴²

$$a = \frac{6\theta}{d_b} \quad (10)$$

Calculation of the average energy dissipation rate per mass unit, ε , the gas hold-up, θ , and the average bubble size, d_b , are detailed in previous works.^{40,41}

OTR and OUR analysis

Oxygen transfer and uptake rate limitations have been analyzed employing the methodology previously described,⁵ defining two dimensionless parameters, the observed effectiveness factor (η) and the *Damköhler* number (Da), in order to evaluate whether the overall process rate is limited by oxygen transport or by the biochemical reactions forming the cell metabolism.^{7,9}

The effectiveness factor for the oxygen uptake rate indicates the degree of utilization of oxygen by the cells during the culture process, and is defined as the ratio of the observed oxygen uptake and the uptake rate without mass transfer limitations, according to:

$$\eta = \frac{OUR}{OUR_{max}} \quad (11)$$

If $\eta < 1$, transport is the rate-limiting step of the bioprocess; if η is close to 1, the cellular activity is not limited by oxygen transfer.

The *Damköhler* number is useful for determining the rate-limiting step of the bioprocess, comparing the potential OUR and OTR maximum values as follows:

$$Da = \frac{OUR_{max}}{OTR_{max}} \quad (12)$$

This dimensionless parameter indicates the ratio between the potential rates of oxygen consumption and transport rates, also indicating if the bioprocess is transport-limited, biochemical reaction-limited, or whether it occurs under intermediate operating conditions. If $Da > 1$, the biochemical reaction rate is faster than the oxygen supply rate and, therefore mass transfer resistance is the controlling step of the overall process rate. However, if $Da \leq 1$, the oxygen consumption rate is slower than OTR and the overall process rate is then limited by the rate of chemical reactions.⁵

In this work, another dimensionless parameter is defined, η_{MT} , or effectiveness factor for oxygen transfer rate, as the ratio between the experimental OTR and the potential OTR maximum values, in a similar way to that done for the chemical phenomenon, according to:

$$\eta_{MT} = \frac{OTR}{OTR_{max}} \quad (13)$$

The value of η_{MT} provides an idea of the limitations in oxygen transfer throughout the biochemical process. If $\eta_{MT} < 1$, the bioprocess is oxygen transfer-limited; if η_{MT} is close to 1, the cellular activity is not limited by oxygen transfer. It must be taken into account that $k_L a$ values can decrease with the time course of a bioprocess due to physical changes in the liquid phase, such as an increase in viscosity or a decrease in surface tension, and also the driving force, in Equation (6), can be smaller if DO concentrations increase.

The value of OTR_{max} is easily calculated from Equation (6) with C_{O_2} equal to zero.

$$OTR_{max} = k_L a \cdot C_{O_2}^* \quad (14)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Experiments at 11 different stirrer speeds were performed (100, 250, 400, 550, 700, 850, 1000, 1300, 1600, 1900 and 2000 rpm). Experimental results of *R. terrigena* growth at different stirrer speeds are shown in Fig. 1(A)–(B), together with the DO concentration profiles (C–D) and the glycerol concentration profiles (E–F). Maximum biomass and metabolite concentrations achieved in the different runs are given in Table 1. Experimental growth

data were used to determine the kinetic parameters of Equation (4) by nonlinear regression, minimizing the sum of squared residuals as convergence criterion. The parameter values obtained in all the runs are given in Fig. 2. This figure also shows the ratio between molar yield, Y_j , and the maximum theoretical yield, Y_j^{max} , for each product; these latter values were calculated as described by Doran.⁴³ Finally, in Fig. 2 are also given the OTR_{max} values calculated as previously indicated. All these results suggest that microbial metabolism is clearly affected by fluid dynamic conditions.

Influence of oxygen transfer rate on biomass growth and substrate consumption rates

The reproduction of experimental biomass concentration by Equation (4), using the kinetic parameter values given in Fig. 2, is also presented in Fig. 1(A) and (B); as can be seen the model of Equation (4) is able to fit all the experimental results; all the fittings passed F-test at 95% confidence interval. Moreover, Figs 1 and 2 show that biomass growth rate increased with stirrer speed between 100 and 550 rpm; then, the growth rate remained constant between 550 and 1600 rpm; but at higher stirrer speeds, in the runs carried out at 1900 and 2000 rpm, a slight decrease in growth rate can be observed.

These results are in agreement with the DO concentration profiles (Fig. 1(C) and (D)) and glycerol concentration evolution (Fig. 1(E) and (F)). Changes in fluid dynamic conditions involve three different behaviors regarding microbial growth and substrate consumption. When the culture evolves under limiting oxygen conditions, that is, when DO concentration becomes zero, the biomass growth rate and the glycerol uptake rate increase with agitation (see Fig. 1(A), (C) and (E)). In these runs, OTR is equal to OUR according to Equation (5), because DO concentration remains equal to zero. If stirrer speed is higher than 400 rpm, the oxygen supplied to the liquid phase is not consumed completely, which means that OTR is higher than OUR, and therefore DO concentration is greater than zero. If the batch is conducted between 550 and 1600 rpm of stirrer speed, the biomass growth rate reaches its highest value and the biomass concentration profiles overlap, together with the evolution of glycerol concentration (see Fig. 1(B), (D) and (F)). Under this range of agitations, the DO concentration virtually does not change during batch time. That is, OTR is slightly greater than OUR, but the value of $k_L a$ is so high that, to maintain a coherent value of OTR, the driving force, the difference between the oxygen saturation concentration and DO concentration, decreases to a value close to zero, and then DO concentration profile is practically constant (Fig. 1(D)).

A negative effect of very high agitation conditions over microbial growth can be observed at 1900 and 2000 rpm, although DO and glycerol concentration profiles remain close to those values obtained for stirrer speeds between 550 and 1600 rpm.

These effects of fluid dynamic conditions, through stirrer speed, can be clearly seen in Fig. 2(A), where the values of the two kinetic parameters of Equation (4) are shown. First, both μ_{max} and C_X^{max} increase in parallel as the stirrer speed increases; then, these parameters remain constant between 550 and 1600 rpm; and finally, these values decrease, when 1900 and 2000 rpm of stirrer speed are employed.

Influence of oxygen transfer rate on cell metabolism

In Fig. 2 the evolution of several variables with respect to the stirrer speed employed in each run can be observed. Thus, the metabolite yields reached with respect to their maximum theoretical values

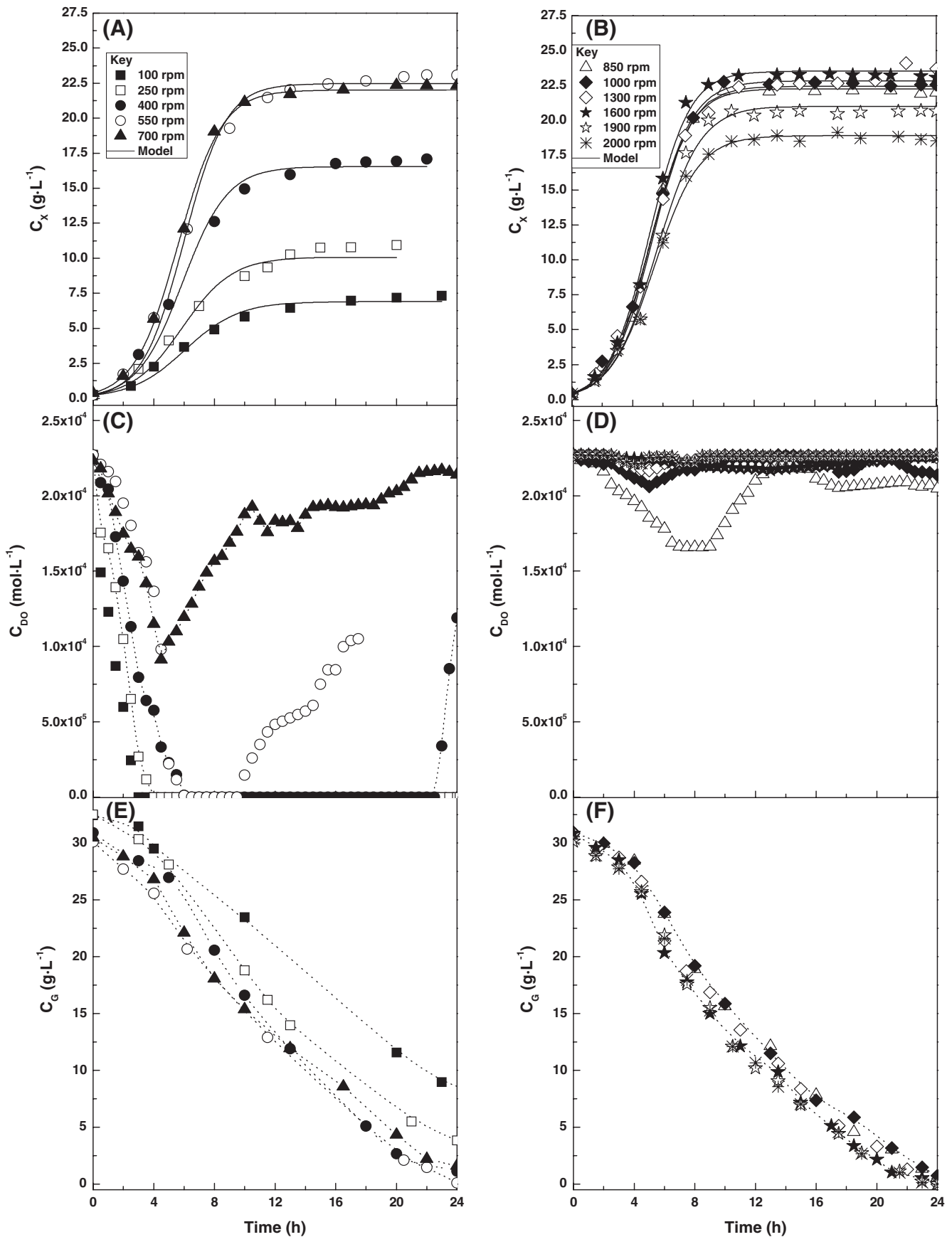


Figure 1. Biomass (A)–(B), dissolved oxygen (C)–(D) and glycerol (E)–(F) concentrations time course in *R. terrigena* batch cultures under different agitation conditions.

Table 1. Experimental results of the conversion of glycerol by *R. terrigena* through a mixed acid route under different agitation rates: biomass and metabolite concentrations achieved at the end of the experiments. Confidence interval is also given

N (rpm)	C_X (g L ⁻¹)	C_{Su} (g L ⁻¹)	C_{La} (g L ⁻¹)	C_{AA} (g L ⁻¹)	C_{Ac} (g L ⁻¹)	C_{Et} (g L ⁻¹)	C_{BD} (g L ⁻¹)	C_{CO_2} (g L ⁻¹)
100	6.91 ± 0.58	0.74 ± 0.09	2.49 ± 0.37	0.76 ± 0.11	0.48 ± 0.07	5.20 ± 0.62	4.28 ± 0.61	9.1 ± 1.01
250	10.1 ± 0.62	0.89 ± 0.11	1.46 ± 0.24	0.79 ± 0.14	1.02 ± 0.16	4.27 ± 0.54	5.74 ± 0.82	9.4 ± 1.21
400	16.5 ± 0.71	0.88 ± 0.15	0.78 ± 0.12	0.76 ± 0.17	1.56 ± 0.24	3.33 ± 0.47	5.85 ± 0.86	9.8 ± 1.23
550	22.5 ± 0.74	0.18 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.95 ± 0.12	0.08 ± 0.01	1.18 ± 0.20	11.1 ± 1.55
700	22.1 ± 0.77	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.03	1.14 ± 0.17	15.6 ± 1.46
850	22.3 ± 0.78	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	16.8 ± 1.82
1000	22.5 ± 0.78	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	13.8 ± 1.94
1300	22.9 ± 0.73	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	12.6 ± 1.33
1600	23.5 ± 0.79	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	7.3 ± 1.58
1900	21.1 ± 0.72	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	6.9 ± 1.07
2000	18.9 ± 0.71	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	6.5 ± 0.96

and the total CO₂ produced can be seen in Fig. 2(B); in Fig. 2(C) the maximum observed values of the oxygen transfer rate (OTR_{max}) are given.

The three different bacterial behaviors, described above, are more evident when the metabolic response to the oxygen supplied is analyzed. When OTR is low, related fermentation products, such as ethanol and lactate, are the main final metabolites in the culture medium. BD yield reaches its maximum value at 400 rpm, when OTR_{max} is close to 5.5×10^{-3} mmol O₂ L⁻¹ s⁻¹. If stirrer speed is increased from that value, the cellular metabolism changes, being clearly directed to biomass production; thus, the maximum values of μ_{max} and C_X^{max} are reached, several pathways of mixed acid route are inactivated and CO₂ production clearly increases (see Fig. 2(A), (B) and (C)). These observations agree with previous work, where the influence of the dissolved oxygen level was studied in different bioprocesses. For example, Park *et al.*⁴⁴ observed that if the stirrer speed was higher than 350 rpm, the production of 2,3-BD decreased dramatically while the biomass growth increased in cultures with *Klebsiella oxytoca* using glucose as sole carbon source. In this work,⁴⁴ the biomass profiles overlap from 550 to 750 rpm. Ji *et al.*⁴⁵ have proposed a two-stage agitation speed strategy for enhancing 2,3-BD final concentration with engineered strains of *K. oxytoca*, because the production declined from 300 rpm, in favor of biomass growth.⁴⁵

The OTR_{max} values are higher than 0.017 mmol O₂ L⁻¹ s⁻¹ in the runs from 700 rpm to 1300 rpm stirrer speed, when the biomass concentration profiles overlap. At 1600 rpm, a significant decrease in CO₂ production and OTR_{max} are observed and this fact is more evident at 1900 and 2000 rpm. Thus, it can be assessed that the mixed acid route remains blocked to produce alcohols, diols and organic acids for stirrer speeds of 850 rpm and higher, the main metabolic products being CO₂ and biomass up to 2000 rpm (Fig. 2(B)).

These observations suggest four culture behaviors with respect to the fluid dynamic conditions: an initial fermentation zone (100–400 rpm), where an increase in OTR favors BD and acetoin production; an intermediate region, whose border is highly sensitive to OTR (since at 550 rpm the metabolic change is evident in terms of mixed acid route products distribution); a third zone (700–1300 rpm), where the culture maximizes microbial growth, and carbon dioxide is the main by-product; and a last agitation range (1600–2000 rpm), where the increase in stirring speed continues a decrease in microbial growth rate, in OTR_{max} and in CO₂

production. According to these observations it can be suggested that *R. terrigena* is really sensitive to changes in dissolved oxygen availability, as occurs with other bacterial strains able to produce 2,3-BD.^{44–46}

Theoretical values of $k_L a$ have been calculated (Equations (9) and (10)) at several times in various runs carried out under different stirrer speeds. It was necessary to measure the broth viscosity, describing its evolution with time using the Ostwald de Waele rheological model (Equation (2)). With the $k_L a$ values the theoretical maximum values of transport rate, OTR_{max}^t, were calculated. Then values of η , Da and η_{MT} were determined using the experimental measured values of OTR and OUR. The evolution with time of these three dimensionless numbers, together with the viscosity and the $k_L a$ profiles are presented in Fig. 3. The broth viscosity increases with time (see Fig. 3(A)), especially when the culture is conducted under non-limiting oxygen conditions and the metabolic change previously described is observed (from 550 rpm). This change in broth viscosity with time is dramatic when the biomass growth reaches the stationary growth stage (see also Fig. 1(B)). This may be due to the secretion of cell polysaccharides at later stages of growth as a cellular response to the aggressive agitation conditions, as quoted by other authors.⁴⁷ The production of these polysaccharides is reinforced by the fact that when the broth viscosity reaches its highest values (from 1000 rpm), the total CO₂ produced at the end of the fermentation decreases when stirrer speed is increased (see also Fig. 2(C)). Broth viscosity profiles influence the evolution of $k_L a$ predictions, involving a sharp decline of this coefficient with time, according to Fig. 3(B). These observations presume that theoretical OTR_{max} is getting smaller with time, as given by Equation (14).

When the run is conducted under limiting oxygen conditions (e.g. 400 rpm), Da is always close to 1 and the rate-limiting step is the OTR. If stirring speed is higher, Da decreases with time, as a result of OUR_{max} being lower from run to run (see Fig. 3(C)). The latter increase of this parameter in the experiments conducted at 550 and 700 rpm is due to the critical decrease in $k_L a$ (see also Fig. 3(A)), which affects directly the theoretical value of OTR_{max}^t, according to Equation (14).

The time course of η_{MT} at different agitation conditions is shown in Fig. 3(D). When the oxygen transport is the rate-limiting step, the levels of experimental OTR are close to the theoretical OTR_{max} and $\eta_{MT} = 1$ throughout the run. However, for runs conducted from 700 rpm, the overall process rate is limited by the biochemical reaction

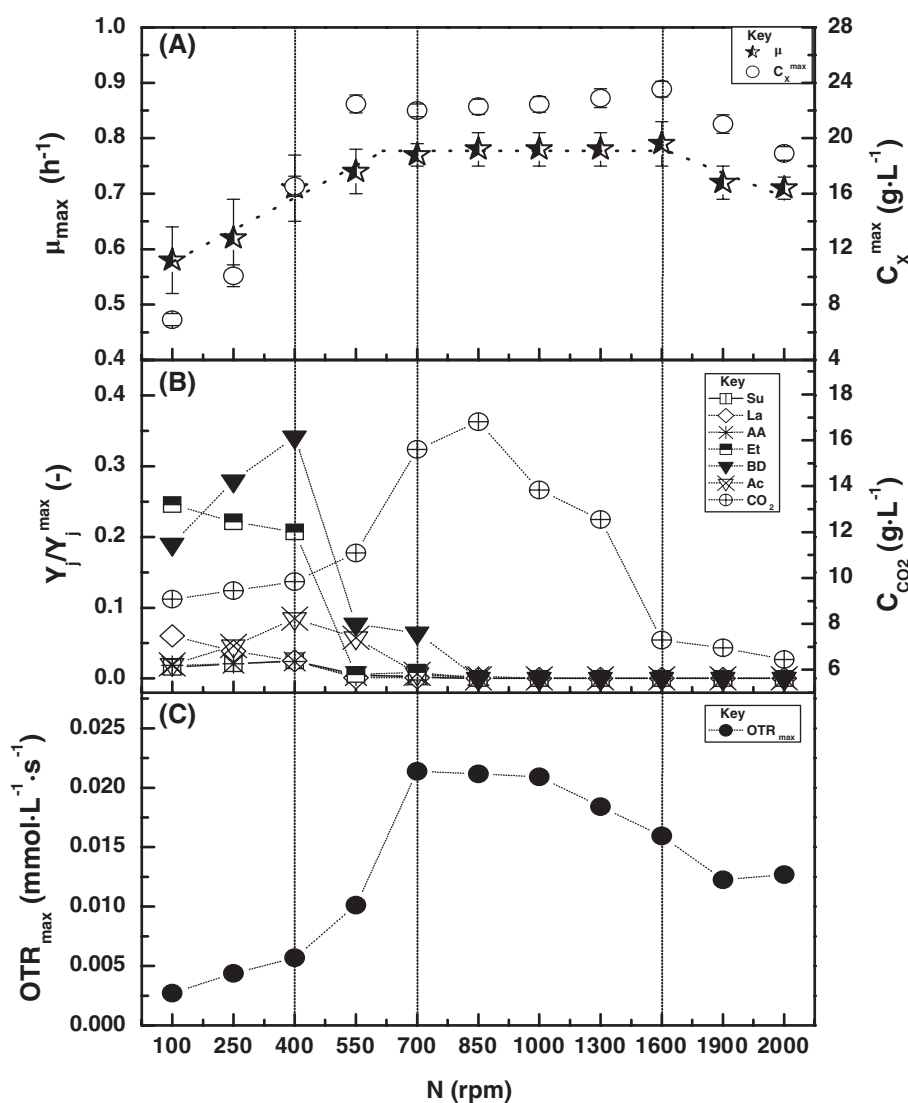


Figure 2. Kinetic growth parameters (A), relative metabolite yields with respect to the maximum theoretical value and CO₂ produced (B) and maximum oxygen transfer rate (C) for *R. terrigena* cultures in runs conducted at several agitation speeds.

rate (see also *DO* profiles in Fig. 1(C) and 1(D)), and η_{MT} decreases with time after reaching its maximum value. For the runs carried out with $N > 700$ rpm, cellular stress provokes low values of OUR, and consequently also low values of OTR, which causes the driving force of Equation (6) to be reduced. Moreover, the increase in broth viscosity affects $k_L a$ negatively and hence, the measured OTR is significantly lower than the predicted value of OTR_{\max} .

The evolution with time of the effectiveness factor (η) is presented in Fig. 3(E). If the rate controlling step is the oxygen transfer rate (e.g. 400 rpm), η remains close to 1, which means that OUR takes its maximum possible value.⁵ Conversely, if the biochemical reaction rate is the slowest process step (from 550 rpm), η takes the value 1 in the early stages of the run, till the stationary growth phase is reached, and then decreases with time. This drop is more pronounced the higher the stirrer speed is, indicating that the oxygen consumption by the culture is negatively influenced by the stress conditions.

Evaluation of cellular stress under high agitation conditions

Experimental data on biomass growth, described above and shown in Fig. 1(A) and 1(B), establishes different growth rate ranges

when stirrer speed is changed. Biomass quantification by OD is based on the culture sample absorbance, which is compared with a water pattern at a certain wavelength. The absorbance is related with broth turbidity, but does not inform about cell integrity or damage due to hydrodynamic stress or oxidative stress. Figure 4 presents bacterial growth profiles under different rates of agitation, measured by viable colony counting on LB agar plates. The results confirm OD measurements, but also show that *R. terrigena* cells are affected by shear stress at high agitation conditions, especially after 18 h of growth, when the number of colony forming units decreases significantly. This behavior can explain the decrease in total CO₂ released and OTR_{\max} in the runs carried out from 1300 rpm. If culture cells are damaged, and OUR is lower, OTR is accordingly reduced, which affects the driving force value in Equation (6). The growth rate decline observed at 1900 rpm by OD measurements (see Fig. 1(B)) is confirmed by viable colony counting, reaching a final number of colonies similar to that achieved at 400 rpm (see Fig. 4). This analysis reinforces the previous description of four different regions that can be observed in the culture behavior when different stirrer speeds are employed. The first one corresponds to runs conducted at low

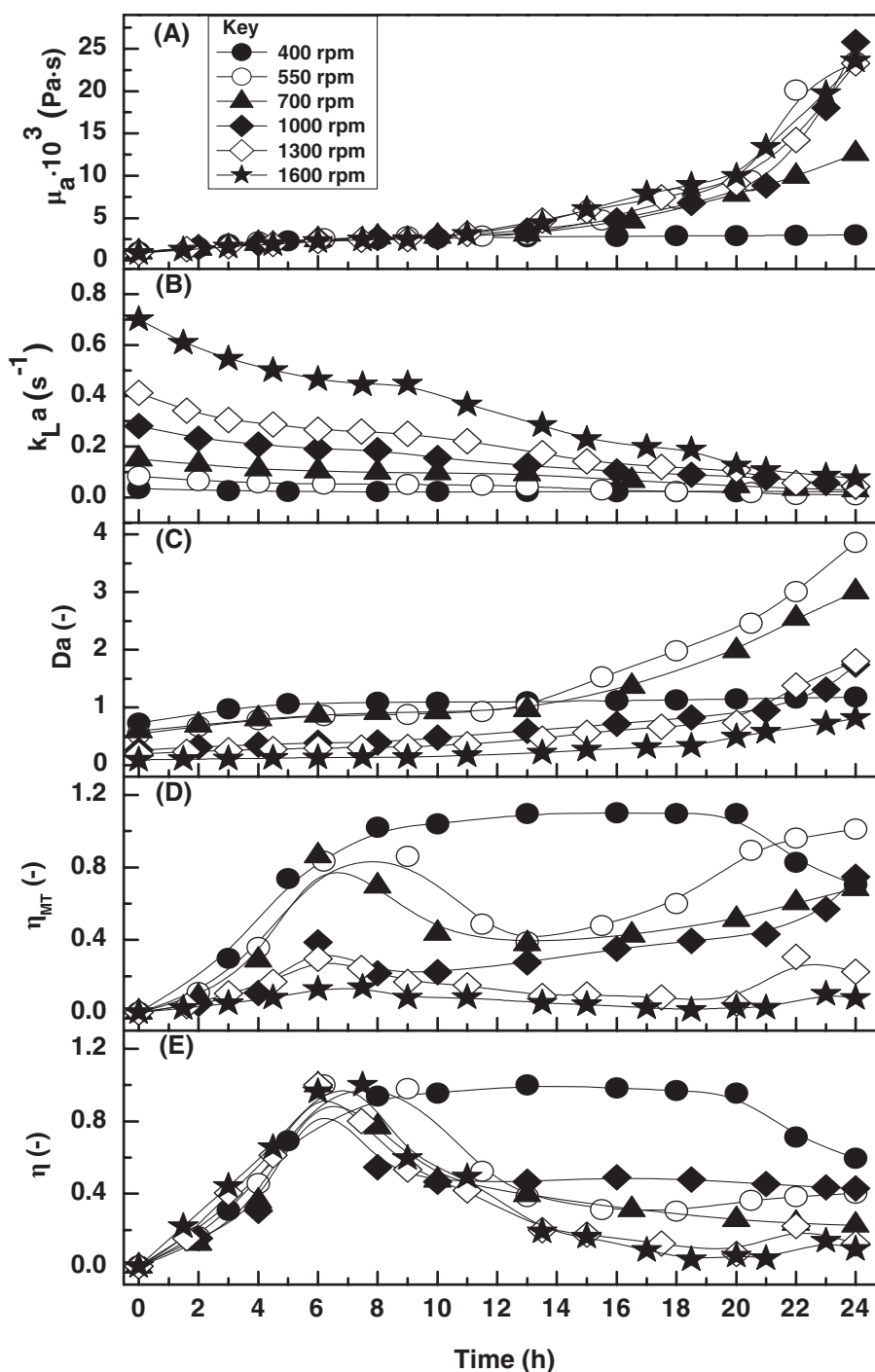


Figure 3. Evolution with time of broth viscosity (A); volumetric mass transfer coefficient (B); Damköhler number (C); effectiveness factor for oxygen transfer rate (D); effectiveness factor for oxygen uptake rate (E) for *R. terrigena* cultures carried out under different agitation conditions.

agitation (from 100 to 400 rpm of stirrer speed) when the process is carried out under oxygen transport limiting conditions; the biomass growth rate increases with increasing agitation and mixed acid route metabolites are produced. When the culture is conducted under non-limiting transport conditions (stirrer speed higher than 550 rpm), all the oxygen supplied is directed to bacterial growth and no by-products are obtained, except CO₂; this behavior is maintained in all the runs carried out with stirrer speeds between 550 and 1300 rpm. If the stirrer speed is even higher (1600–2000 rpm), cells are affected by stress, which is

reflected in the decrease in total CO₂ released and the decrease of the value of OTR_{max}, which happens from 1300 rpm. Cellular stress involves lower values of OUR, consequently reducing OTR according to Equation (6), because the DO concentration remains close to C_{O₂*} throughout the run (see also Fig. 1(D)). If the runs are conducted at the maximum stirrer speeds studied, 1900 and 2000 rpm, cells are affected by hydrodynamic stress, and the values of CO₂ produced and OTR_{max} are significantly lower; thus, bacterial growth rate is slower and the biomass concentration

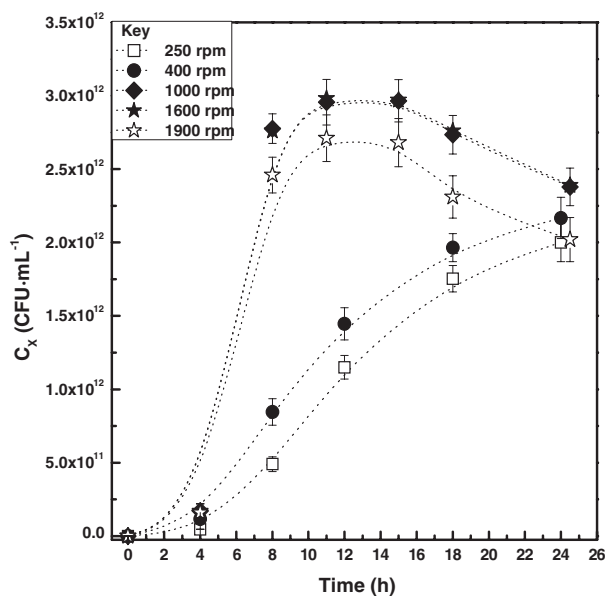


Figure 4. Time-course of *R. terrigena* colony forming units (CFU) in LB medium agar plates in runs carried out with different stirrer speeds to evaluate culture hydrodynamic stress.

when the stationary growth stage is reached is lower too (see Fig. 2(A) and 2(C)).

CONCLUSIONS

The BD production bioprocess with *R. terrigena* CECT 4519 has been studied under different fluid dynamic conditions in a STBR. Stirrer speed has been changed from 100 to 2000 rpm. Cellular metabolism is clearly affected by fluid dynamic conditions and DO concentration level. At low stirrer speed, under oxygen-limiting conditions, growth rate increases with the agitation, as clearly shown for the kinetic parameter values of Equation (4). Under these conditions, fermentation products are synthesized, such as ethanol and lactate. Also BD production increases with stirrer speed, reaching a maximum at 400 rpm. For stirrer speed higher than 550 rpm, the metabolic flux changes to biomass production, although substrate uptake rate remains constant from 550 to 1600 rpm. In experiments carried out employing very high stirrer speed, 1900 and 2000 rpm, biomass production is negatively affected most probably by hydrodynamic stress. In the runs conducted under no-limiting oxygen conditions, the broth viscosity increases dramatically during the steady state growth phase, reducing the values of volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$), and the maximum theoretical value of OTR . Cellular stress due to fluid dynamic conditions is observed by the changes in broth viscosity and the decrease in the number of colony forming units after 18 h of culture.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by MICINN under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R, RTC-2014-1826-3 and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

FUNDING INFORMATION

MICINN under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R, RTC-2014-1826-3 and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134

REFERENCES

- Siegel MH and Merchuk JC, Mass transfer in a rectangular air-lift reactor: effects of geometry and gas recirculation. *Biotechnol Bioeng* **32**:1128–1137 (1988).
- Gianetto A, Merchuk JC, Osemberg G, Siegel M and Shacham M, Twelfth international symposium on chemical reaction engineering today. A method for evaluation of mass transfer coefficients in the different regions of air lift reactors. *Chem Eng Sci* **47**:2221–2226 (1992).
- Kilonzo PM and Margaritis A, The effects of non-Newtonian fermentation broth viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift bioreactors: a critical review. *Biochem Eng J* **17**:27–40 (2004).
- Garcia-Ochoa F and Gomez E, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv* **27**:153–176 (2009).
- Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE and Merchuk JC, Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem Eng J* **49**:289–307 (2010).
- Badino Jr AC, Facciotti MCR and Schmidell W, Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochem Eng J* **8**:111–119 (2001).
- Çalik P, Yilgör P, Ayhan P and Demir AS, Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chem Eng Sci* **59**:5075–5083 (2004).
- Puthli MS, Rathod VK and Pandit AB, Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochem Eng J* **23**:25–30 (2005).
- Gomez E, Santos VE, Alcon A, Martin AB and Garcia-Ochoa F, Oxygen-uptake and mass-transfer rates on the growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy Fuels* **20**:1565–1571 (2006).
- Gomez E, Santos VE, Alcon A and Garcia-Ochoa F, Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chem Eng Sci* **61**:4595–4604 (2006).
- Meijer JJ, ten Hoopen HJG, van Gameren YM, Luyben KCAM and Libbenga KR, Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microbial Technol* **16**:467–477 (1994).
- Sahoo S, Rao KK and Suraishkumar GK, Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* **94**:118–127 (2006).
- Garcia-Ochoa F, Gomez E, Alcon A and Santos VE, The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* **36**:911–925 (2013).
- Merchuk JC, Shear effects on suspended cells, in *Bioreactor Systems and Effects*. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 65–95 (1991).
- Kao P-M, Chen C-I, Huang S-C, Chang Y-C, Tsai P-J and Liu Y-C, Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochem Eng J* **34**:172–178 (2007).
- Gomez E, Alcon A, Escobar S, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Effect of fluid dynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochem Eng J* **99**:138–146 (2015).
- Escobar S, Rodriguez A, Gomez E, Alcon A, Santos VE and Garcia-Ochoa F, Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess Biosyst Eng* **39**:545–554 (2016).
- Knothe G, 9 - other uses of biodiesel, in *The Biodiesel Handbook* (2nd edn). AOCS Press, 401–403 (2010).
- Tan HW, Abdul Aziz AR and Aroua MK, Glycerol production and its applications as a raw material: a review. *Renew Sustain Energy Rev* **27**:118–127 (2013).
- Anuar MR and Abdullah AZ, Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* **58**:208–223 (2016).
- Hájek M and Skopal F, Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresour Technol* **101**:3242–3245 (2010).
- Garlapati VK, Shankar U and Budhiraja A, Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol Reports* **9**:9–14 (2016).
- Celińska E and Grajek W, Biotechnological production of 2,3-butanediol – current state and prospects. *Biotechnol Adv* **27**:715–725 (2009).
- Wu K-J, Saratate GD, Lo Y-C, Chen W-M, Tseng Z-J, Chang M-C et al., Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen

- with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresource Technol* **99**:7966–7970 (2008).
- 25 Ji X-J, Huang H and Ouyang P-K, Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* **29**:351–364 (2011).
 - 26 Syu M-J, Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:10–18 (2001).
 - 27 Petrov K and Petrova P, Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:943–949 (2010).
 - 28 Maddox IS, Microbial production of 2,3-butanediol, in *Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 269–291 (2008).
 - 29 Magee RJ and Kosaric N, The microbial production of 2,3-butanediol, in *Advances in Applied Microbiology*, ed by Allen IL. Academic Press, pp. 89–161 (1987).
 - 30 Ripoll V, de Vicente G, Morán B, Rojas A, Segarra S, Montesinos A et al., Novel biocatalysts for glycerol conversion into 2,3-butanediol. *Process Biochem* **51**:740–748 (2016).
 - 31 Zeng A-P and Sabra W, Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Current Opin Biotechnol* **22**:749–757 (2011).
 - 32 Andres S, Wierze A, Bendfeldt H, Waschkowitz T, Toeche-Mittler C and Daniel R, Insights into the genome of the enteric bacterium *Escherichia blattae*: cobalamin (B12) biosynthesis, B12-dependent reactions, and inactivation of the gene region encoding B12-dependent glycerol dehydratase by a new mu-like prophage. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**:150–168 (2004).
 - 33 Yang T, Rao Z, Zhang X, Xu M, Xu Z and Yang S-T, Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Cell Factories* **14**:122 (2015).
 - 34 Garcia-Ochoa F, Escobar S and Gomez E, Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects. *Chem Eng Sci* **122**:491–499 (2015).
 - 35 Trujillo-Roldán MA and Valdez-Cruz NA, Hydrodynamic stress: death and cellular damage in agitated cultures. *Rev Latinoam Microbiol* **48**:269–280 (2006).
 - 36 Sabra W, Kim E-J and Zeng A-P, Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* **148**:3195–3202 (2002).
 - 37 Ripoll V, de Vicente G, Morán B, Montesinos A, Rojas A, Tortajada M et al., 2,3-butanediol production from glycerol by *Raoultella terrigena* CECT4519, in *II Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías (2-CIAB)*, Jaén, Spain (2013).
 - 38 de Sarrau B, Clavel T, Bornard I and Nguyen-the C, Low temperatures and fermentative metabolism limit peptidoglycan digestion of *Bacillus cereus*. Impact on colony forming unit counts. *Food Microbiol* **33**:213–220 (2013).
 - 39 Alcon A, Martin AB, Santos VE, Gomez E and Garcia-Ochoa F, Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT5279. *Biochem Eng J* **39**:486–495 (2008).
 - 40 Garcia-Ochoa F and Gomez E, Prediction of gas–liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol Bioeng* **92**:761–772 (2005).
 - 41 Garcia-Ochoa F and Gomez E, Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem Eng Sci* **59**:2489–2501 (2004).
 - 42 Kawase Y, Halard B and Moo-Young M, Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem Eng Sci* **42**:1609–1617 (1987).
 - 43 Doran PM, Chapter 4 - Material Balances, in *Bioprocess Engineering Principles* (2nd edn). Academic Press, London, pp. 87–137 (2013).
 - 44 Park JM, Song H, Lee HJ and Seung D, Genome-scale reconstruction and in silico analysis of *Klebsiella oxytoca* for 2,3-butanediol production. *Microbial Cell Factories* **12**:1–11 (2013).
 - 45 Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N et al., Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresource Technol* **100**(13):3410–3414 (2009).
 - 46 Beronio PB and Tsao GT, Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. *Biotechnol Bioeng* **42**:1263–1269 (1993).
 - 47 Bandaipheth C and Prasertsan P, Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, *kLa* in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydr Polym* **66**:216–228 (2006).

Publicación 6

Autores: Sebastián Escobar, Alberto Rodríguez, Emilio Gómez, Almudena Alcón, Victoria E. Santos y Félix García-Ochoa

Título: Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida*: Effects on growth rate and biodesulfurization capacity

Revista: Bioprocess and Biosystems Engineering (2016), 39(4), pp. 545-554

Índice de impacto (2015): 1,901

Área: Biotecnología y Microbiología Aplicada

Resumen

En esta publicación se estudia la influencia de la velocidad de transporte de oxígeno y de las condiciones fluido-dinámicas sobre el crecimiento y la capacidad desulfurante de *Pseudomonas putida* KTH2 en cultivos realizados a distintas agitaciones en tanque agitado, operando en discontinuo en crecimiento y en *resting cells* en los ensayos de desulfuración. En concreto, se realizaron cultivos con células en crecimiento variando la agitación entre 400 y 2000 rpm, mientras que la capacidad desulfurante fue determinada midiendo la actividad catalítica de las enzimas de la ruta 4S con células en estado de *resting cells* obtenidas a distintas velocidades de agitación, entre 100 y 800 rpm.

El aumento de la velocidad de agitación entre 400 y 700 rpm incrementa también la velocidad de crecimiento, así como la velocidad de consumo de oxígeno (OUR). Por el contrario, entre 700 y 2000 rpm esta variable se mantiene constante, al igual que la concentración de biomasa en la fase estacionaria, de manera que la evolución del crecimiento del biocatalizador es prácticamente coincidente en este intervalo. Estos resultados pueden ser modelizados cinéticamente a través de la ecuación logística de crecimiento, que describe todos los resultados experimentales cambiando el valor de sus dos parámetros característicos: μ_{\max} y C_X^{\max} .

El estudio de la capacidad desulfurante en *resting cells* reflejó la enorme dependencia del oxígeno disponible que presentan las enzimas de la ruta 4S, poniendo de manifiesto su sensibilidad al nivel de oxígeno suministrado en el crecimiento. Un aumento de la agitación de 100 a 300 rpm mejora la capacidad desulfurante global del biocatalizador, mientras que a velocidades de agitación mayores ésta se reduce drásticamente debido a la pérdida de actividad de las enzimas DszA y DszC. En el caso de la enzima DszB, su máxima actividad se alcanza cuando las células se cultivan a una agitación muy baja, de 100 rpm, descendiendo exponencialmente cuando se emplea una velocidad de agitación mayor.

Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity

S. Escobar¹ · A. Rodriguez¹ · E. Gomez¹ · A. Alcon¹ · V. E. Santos¹ · Felix Garcia-Ochoa¹

Received: 10 September 2015 / Accepted: 4 January 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The growth rate and desulfurization capacity accumulated by the cells during the growth of *Pseudomonas putida* KTH2 under different oxygen transfer conditions in a stirred and sparged tank bioreactor have been studied. Hydrodynamic conditions were changed using different agitation conditions. During the culture, several magnitudes associated to growth, such as the specific growth rate, the dissolved oxygen concentration and the carbon source consumption have been measured. Experimental results indicate that cultures are influenced by the fluid dynamic conditions into the bioreactor. An increase in the stirrer speed from 400 to 700 rpm has a positive influence on the cell growth rate. Nevertheless, the increase of agitation from 700 to 2000 rpm hardly has any influence on the growth rate. The effect of fluid dynamics on the cells development of the biodesulfurization (BDS) capacity of the cells during growth is different. The activities of the intracellular enzymes involved in the 4S pathway change with dissolved oxygen concentration. The enzyme activities have been evaluated in cells at several growth time and different hydrodynamic conditions. An increase of the agitation from 100 to 300 rpm has a positive influence on the development of the overall BDS capacity of the cells during growth. This capacity shows a decrease for higher stirrer speeds and the activity of the enzymes monooxygenases DszC and DszA decreases dramatically. The highest value of the activity of DszB enzyme was obtained with cells cultured at 100 rpm, while this activity

decreases when the stirrer speed was increased higher than this value.

Keywords Hydrodynamic · Stirred tank bioreactor · Oxygen transfer · Biodesulfurization · *Pseudomonas putida*

List of symbols

Variables and abbreviations

a_j	Activity of enzyme j ($\mu\text{M g}_{\text{C}_x}^{-1} \text{min}^{-1}$)
BDS	Biodesulfurisation
C^*	Oxygen concentration in equilibrium (mol L^{-1})
C_j	Concentration of compound j ($\mu\text{M L}^{-1}$)
C_{O_2}	Oxygen dissolved concentration ($\%$ or $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$)
C_X	Concentration of biomass ($\text{g}_X \cdot \text{L}^{-1}$)
D	Stirrer diameter (m)
DBT	Dibenzothiophene
DBTO	Dibenzothiophene sulfoxide
DBTO ₂	Dibenzothiophene-sulfone
F	Fischer statistical parameter
HBP	2-Hydroxybiphenyl
HBPS	2-Hydroxybiphenyl-2-sulfinic acid
k_{LA}	Volumetric oxygen mass transfer coefficient (s^{-1})
N	Stirrer speed (rpm)
OTR	Oxygen transfer rate ($\text{mol O}_2\text{L}^{-1}\text{s}^{-1}$)
OUR	Oxygen uptake rate ($\text{mol O}_2\text{L}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Re	Impeller Reynolds number (–)
SSR	Sum of square residuals
T	Vessel diameter (m)
t	Time (min, s or h)
V	Volume (m^3)
X_j	Conversion or yield of compound j (–)

✉ Felix Garcia-Ochoa
fgochoa@quim.ucm.es

¹ Chemical Engineering Department, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Greek letters

- η Effectiveness factor for growth (–)
 μ Specific growth rate (h^{-1})

Subscripts

- G Relative to gas phase
 L Relative to liquid phase
 Max Referred to maximum value
 O_2 Referred to oxygen
 X Referred to biomass
 0 Referred to initial value

Superscripts

- t Referred to time of 120 min of resting cell assay
 0 Referred to initial value

Introduction

Aerobic bioprocesses are gas–liquid–solid systems involving a series of several successive steps. The overall rate that is macroscopically observed depends on the slower system among those. These steps (mixing, mass transfer, biochemical reactions, etc.) take place at rates dictated by different phenomena (turbulence, transport and biochemical reactions). The evaluation of each of the rates of these phenomena is a key to unveil which of them is the one controlling the overall rate. In most cases, the transfer from the gas phase to the liquid phase is the limiting step of the overall process rate, mainly due to the low solubility of oxygen in the growth medium [1]. The increase of the power dissipation per volume unit, usually caused by an increase of the agitation, is often beneficial in most bioprocesses due to the improvement of mass transfer and mixing rates; however, excessive agitation causes a concomitant increase in hydrodynamic forces that may become a negative factor due to the interaction of turbulence with living cells, called hydrodynamic stress.

The effect of turbulence on suspended cells is one of the most complex problems in the scale-up of cell cultures because shear effects of flow turbulence inside the bioreactor may have an important impact on the cellular response, modifying their morphology [2–4], the growth rate [3, 5], the production rate [6, 7] or the nutrients consumption rate [7, 8] and, in general, the metabolism and the activity of several enzymes [3, 9].

These restrictions can determine the bioreactor operating conditions, the scale-up criteria and even deciding the type of bioreactor to be used. In some studies, the problem has been evaluated in terms of threshold values of either shear rate, shear stress or stirrer speed, above which the growth rate and cell viability [10–12], product yield [7, 13], or some other critical culture parameters are significantly affected [14, 15].

Biodesulfurization (BDS) is a promising process and a complementary technology for desulfurization of some petrochemical fractions. The biocatalysts used in BDS are microorganisms selected for their ability to specifically degrade some organic-sulfur compounds. A key organism in this context is *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, the first strain discovered to be able to extract sulfur from a variety of organic-sulfur compounds. The genes involved in the BDS steps have been characterized and named *dszA*, *dszB* and *dszC*. In the past few years, it has been recognized that the use of a genetically modified organism might increase the BDS yield [16–18]. *Pseudomonas putida* KTH2, a genetically modified organism with the genes of *R. erythropolis*, has been employed in many BDS studies. In this work, *P. putida* KTH2 has been used as a model to evaluate the fluid dynamic (and the OTR) effects on the growth rate and on BDS capacity accumulated by the cells during growth.

In previous works [19, 20], the media composition and the operating conditions for obtaining high growth rate and BDS capacity were established and a kinetic model was proposed to describe the biomass growth rate of *P. putida* under different operating conditions (aeration, temperature and pH). In others studies [21, 22] it was stated that both cell membrane transport rate and the reduced cofactors concentration and HpaC activity are not factors limiting the BDS rate. In these previous works, a kinetic model employing resting cells at different cellular ages was proposed. Finally, in other previous work [23], the influence of mass transfer conditions on growth rate and BDS capacity of the cells was observed.

These results suggest that growth rate, BDS capacity and intracellular enzyme activities of *P. putida* are affected by the dissolved oxygen concentration in the broth and, therefore, by the operating conditions employed. However, there is no complete study focused on fluid dynamic evaluation of sensitivity of these cultures in a STBR to determine the restrictions that such sensitivity imposes. On this work, an optimal agitation policy is searched. This agitation must yield a profile of dissolved oxygen concentration which produces an optimum growth rate with the optimum enzymatic activities, as previously performed by *R. erythropolis* [24].

The aim of this work is to study the effect of hydrodynamic conditions and oxygen transfer on bacterial cultures of *P. putida* KTH2 under different operating conditions, changing agitation in a STBR. A kinetic model able to fit different growth curves has been applied and an effectiveness factor for growth has been related to the different conditions used. Also, the effect on BDS capacity accumulated by the cells during growth and on the intracellular enzyme activity, which has been determined by resting cell

assays, for cells cultured under different stirrer speeds has been evaluated.

Materials and methods

Microorganism and culture medium

The microorganism used was *Pseudomonas putida* KTH2, supplied by the Biological Research Centre (CIB-CSIC, Madrid, Spain). This bacterium has the genes *dszA*, *dszB* and *dszC* cloned from *R. erythropolis* IGTS8 and the gene of the flavin-oxido-reductase, *hpaC*, comes from the bacterium *Escherichia coli*. Therefore, the BDS pathway of *P. putida* KTH2 is analogous to that followed by *R. erythropolis* [25]. In this case, the main difference is that the flavin-oxido-reductase is not the DszD but the HpaC enzyme [26, 27].

Cultures were maintained on concentrated stocks with glycerol in saline serum solution and conserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. To obtain comparative experimental results for inoculum build-up, a previously described standardized procedure was employed [19, 20]. Frozen stocks were used as inoculum and grown in Luria–Bertani (LB) complex medium containing 1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl and a solution of tetracycline (25 mg/L) in Erlenmeyer flasks, and maintained at 210 rpm and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an orbital shaker for 12 h. A second culture was accomplished in LB medium under the same conditions for 4 h, after inoculating bacteria from the previous culture. These cells were employed as inoculum.

The culture medium composition for growth was a basal standard medium (BSM) which has the following composition: $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 4 g/L; K_2HPO_4 , 4 g/L; $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0245 g/L; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L; MgSO_4 , 2 mM; glycerin, 2 % (w/w); $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L; NH_4Cl , 2 g/L. IPTG (0.2 mM) and tetracycline (25 μg /mL).

Bioreactor description

Batch-bioreactor experiments were carried out in a stirred tank bioreactor, made by B. Braun (Biostat-B), with 2 L working volume, equipped with pH, dissolved oxygen concentration, temperature and foam probes. Agitation was provided by two-disk turbine stirrers with the relative dimensions between the stirrer and the tank diameter (D/T) of 1/3. Each turbine was made by six blades 1 mm thick. The stirrer was driven by a mixing head equipped with a speed controller. A 4 cm diameter ring type gas sparger with holes of 0.5 mm in diameter was employed as gas distributor. Deflectors were used and the foam was mechanically disrupted.

Analytical methods

A Shimadzu UV-visible spectrophotometer (model UV-1603) was used to measure cell concentration, which was determined from the optical density at 600 nm, after calibration by dry cellular weight measurements.

The dissolved oxygen (DO) concentration throughout the growth was measured on line using an oxygen polarographic electrode Oxyferm FDA 160 from Hamilton with a response time lower than 9 s.

The glutamic acid was analyzed by HPLC (Hewlett Packard, series 1100) using a UV diode array detector. A Develosil 60 column was used (150 \times 4.6 mm). The mobile phase was a mixture of a K_2HPO_4 , 2.5 μM with pH 2.85/acetonitrile (25:75) solution with a flow rate of 0.2 mL min^{-1} . The retention time was 22 min. Glycerol concentration was measured by means of HPLC using a RID detector. A Rezex ROA-organic acid H^+ (8 %) column (300 \times 7.8 mm) was used. The mobile phase was a solution of sulfuric acid $5 \times 10^{-3}\text{ M}$ with a flow rate of 0.5 mL min^{-1} and the retention time of 17 min. Evolution of DBT and HBP concentrations in resting cells assays were analyzed by HPLC as described in previous works [19, 20].

Resting cell desulfurization assays were carried out using cells previously obtained on time course of culture, under the studied operating conditions. These cells were conserved at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, after centrifugation and suspension in a glycerol-saline (1:1) solution [28]. Cells (0.7 g/L) were resuspended in Erlenmeyer flasks with 50 mL of 50 mM HEPES buffer (pH 8.0) and 10 μM sulfur-substrate, according to the test: DBT, DBTO, DBTO2 or HBPS, and desulfurization assays were carried through at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 210 rpm in orbital shaker for 180 min.

Samples of 0.5 mL were collected periodically on time course; afterwards, these samples were mixed with 0.5 mL of acetonitrile in Eppendorf and then centrifuged at 14,000g for 9 min. Finally, 0.75 mL of the supernatant was withdrawn for analysis.

Theoretical background

Growth kinetic modeling

For growth rate description an unstructured kinetic model employed in previous works has been used [19, 23, 29, 30]:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_{\max} C_X \left(1 - \frac{C_X}{C_{X_{\max}}} \right) \quad (1)$$

Equation (1) has been integrated, with the boundary condition: $t = 0$; $C_X = C_{X_0}$, yielding the well-known equation usually named logistic equation:

$$C_X = \frac{C_{X_0} \exp(\mu_{\max} t)}{1 - \frac{C_{X_0}}{C_{X_{\max}}} (1 - \exp(\mu_{\max} t))} \quad (2)$$

where μ_{\max} represents the maximum specific growth rate and C_{X_0} and $C_{X_{\max}}$ the initial and maximum biomass concentrations, respectively. The model parameters, $C_{X_{\max}}$ and μ_{\max} , were determined using a nonlinear regression applied to each experimental data set (C_X vs t). The convergence criteria were the minimization of the sum of squared residuals.

To evaluate the effects of hydrodynamic conditions on growth, several culture runs were performed, changing the stirrer speed. Under different fluid dynamic conditions, different situations can take place: oxygen limitation conditions for growth or the damage produced to the cells by hydrodynamic stress are the two extreme situations, that can be easily shown by the use of an effectiveness factor for growth rate as previously proposed [12, 24]. This parameter is obtained as the ratio between the growth rates in the presence of external limitations (bad mixing conditions, oxygen transfer limitations or cell damage) and that calculated under the best conditions, that is, when the growth rate is the controlling step of the overall process rate, and is not affected by any other physical phenomena, according to:

$$\eta = \frac{\mu}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

The effectiveness factor for growth, η , in aerobic bioprocesses, changes with the operating conditions in the bioreactor. From the evaluation of the effectiveness factor for growth it is possible to establish different kinds of limitations in the development of an aerobic bioprocess, due to the effects that can exert the bioreactor hydrodynamics on mixing, on mass transfer and on the macro-level cell responses [12].

Determination of OTR and OUR

In batch operation, the following mass balance equation for the dissolved oxygen concentration, assuming well mixed liquid phase can be established:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} \quad (4)$$

The oxygen transfer rate (OTR) is proportional to the mass transfer coefficient, k_L , the specific interfacial, a , and the difference between the saturation concentration and the dissolved oxygen concentration in the broth. In this work, the prediction of the mass transfer coefficient (k_L) and the specific interfacial area (a) values were carried out according to the method previously proposed [31, 32] and successfully used in different systems [33–35]. Then, OUR

values were calculated from OTR values and oxygen concentration profile, according to the following expression:

$$\text{OUR} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(\frac{dC_{O_2}}{dt} \right) \quad (5)$$

being C_{O_2} the dissolved oxygen concentration in the broth and $C_{O_2}^*$ the dissolved oxygen concentration in equilibrium at the gas–liquid interface; under the experimental conditions employed, $C_{O_2}^*$ takes a value 0.21 mol m^{-3} .

Desulfurization capacity and intracellular enzyme activity

The BDS capacity of the cells accumulated during the growth was monitored through resting cell desulfurization assays. For a quantitative analysis of the desulfurization capacity under different agitation conditions, the dibenzothiothiophene (DBT) conversion (Eq. [6]) and the yield of 2-hydroxybiphenyl (HBP) (Eq. 7)) was determined by the following relationships:

$$X_{\text{DBT}} = \frac{C_{\text{DBT}}^{t,0} - C_{\text{DBT}}^t}{C_{\text{DBT}}^{t,0}} \times 100 \quad (6)$$

$$X_{\text{HBP}} = \frac{C_{\text{HBP}}^t}{C_{\text{DBT}}^{t,0}} \times 100 \quad (7)$$

being C_{DBT}^t and C_{HBP}^t , the DBT and HBP concentrations at 120 min of resting cell assay.

The BDS capacity of the cells is due to the activities of the enzymes DszA, DszB and DszC involved in the 4S route [25, 36]. The enzymes activities were determined in resting cell assays from cells of different time course of growth, using DBT, DBTO, DBTO₂ and HBPS as sulfur substrates independently. The experimental method employed is described elsewhere [21, 22]. The enzyme activity has been calculated as the specific time-zero reaction rate, according to equation:

$$a_j = \left. \frac{-dC_j}{C_X \cdot dt} \right|_{t=0} \quad (8)$$

where C_j is the concentration of the enzyme substrate j and C_X is the concentration of the biomass employed in the resting cell assays.

Results and discussion

Biomass growth: cell, dissolved oxygen and substrates concentration profiles

In a previous work [23], it was reported that the growth rate of *P. putida* is strongly dependent on the availability of

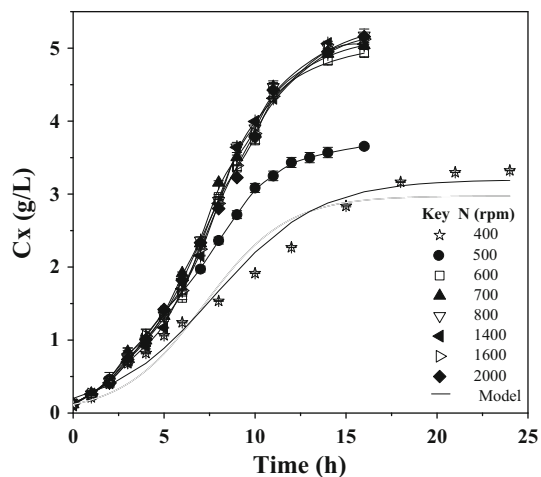


Fig. 1 Biomass concentration time course for *P. putida* KTH2 cultures conducted at different agitation conditions and a constant aeration rate of 1 vvm

dissolved oxygen concentration, showing that the specific growth rate increases when the stirrer speed increases, from 300 to 500 rpm. According to the previous results, and to obtain a wide range of fluid dynamic conditions, a new set of experiments was performed, changing the stirrer speed from 400 to 2000 rpm, keeping the aeration constant at 2 L min^{-1} (1.0 vvm).

The effect of stirrer speed on bacterial growth rate in a STBR can be seen in Fig. 1. The growth rate increases when the stirrer speed is increased from 400 to 600 rpm, but for higher stirrer speeds the results are very similar, from 600 to 2000 rpm. Thus, no hydrodynamic stress is observed for this microorganism until 2000 rpm of stirrer speed. The kinetic growth kinetic model given by Eq. (2) has been fitted to the experimental biomass concentration data using a nonlinear regression algorithm [37]. Model simulation is also shown in Fig. 1 as lines. Parameter values for both μ_{\max} and $C_{X_{\max}}$ are given in Table 1, as previously commented, the kinetic parameters of the growth rate increase when the stirrer speed increases, between 400 and 600 rpm, and these values are practically

constant from 700 to 2000 rpm. Nevertheless, for the runs carried out using 400, 500 and 600 rpm, the values obtained for μ_{\max} and $C_{X_{\max}}$ are smaller than those obtained for the other runs performed, due to the oxygen transfer rate becoming the limiting step of the overall growth process.

In Fig. 2a the dissolved oxygen concentration versus time course of fermentation data under different operating conditions are shown. As can be seen, in the runs conducted at 400 and 500 rpm the oxygen concentration drops to 0 % saturation, remains at this value for about 20 h in the first case (400 rpm), and during 5 h at 500 rpm. The DO evolution shows that the culture at agitation below 700 rpm is being carried out under mass transfer limitation, that is to say, the oxygen transfer rate is controlling the overall process rate. Nevertheless, from 700 rpm up to 2000 rpm, the oxygen dissolved concentration decreases to reach a minimum value (always above 50 % of the saturation value), corresponding to the middle of the exponential phase of growth, where the greatest demand for oxygen of the cells is required. Later, when the cell energy requirement decreases, and the demand for oxygen is reduced, the dissolved oxygen concentration increases in some cases (higher stirrer speed runs) even reaching 100 % of the saturation value.

The experimental results of glycerol and glutamic acid concentrations throughout the time course, under different stirrer speeds, are shown in Fig. 2b and 2c, respectively. As can be observed, in all runs both nutrients are consumed simultaneously, but not at the same rate, since with the increase of agitation from 400 to 700 rpm, the consumption rate of both nutrients also increases. At the end of growth (24 h), when 400 rpm are employed as stirrer speed, all of the glycerol and 10.9 g/L of glutamic acid were consumed; while at 700 rpm all of the glycerol (2 g/L) is consumed at only 10 h of growth time course, and at the end of growth, around 16 h, 12.51 g/L of glutamic acid has been consumed. However, an increase of the stirrer speed from 700 to 2000 rpm, does not result in increasing of the consumption rate of the carbon substrate, showing a very

Table 1 Kinetic growth and statistical parameter values obtained by fitting of Eq. (2) to experimental data for different fluid dynamic conditions

N (rpm)	C_{X_0} (g/L)	μ_{\max} (h^{-1})	$C_{X_{\max}}$ (g/L)	SSR	F de Fisher	
					Obtained	Tabulated (95 %)
400	0.12	0.439 ± 0.031	2.983 ± 0.195	0.051	536	2.81
500	0.12	0.465 ± 0.018	3.884 ± 0.118	0.018	2602	2.57
600	0.13	0.510 ± 0.013	4.878 ± 0.181	0.016	3512	2.46
700	0.12	0.520 ± 0.013	4.916 ± 0.173	0.015	3922	2.44
800	0.13	0.509 ± 0.010	5.065 ± 0.156	0.011	5329	2.44
1400	0.13	0.503 ± 0.009	5.137 ± 0.144	0.009	6676	2.44
1600	0.12	0.510 ± 0.011	5.013 ± 0.174	0.014	4277	2.46
2000	0.13	0.517 ± 0.014	4.917 ± 0.206	0.012	3831	2.46

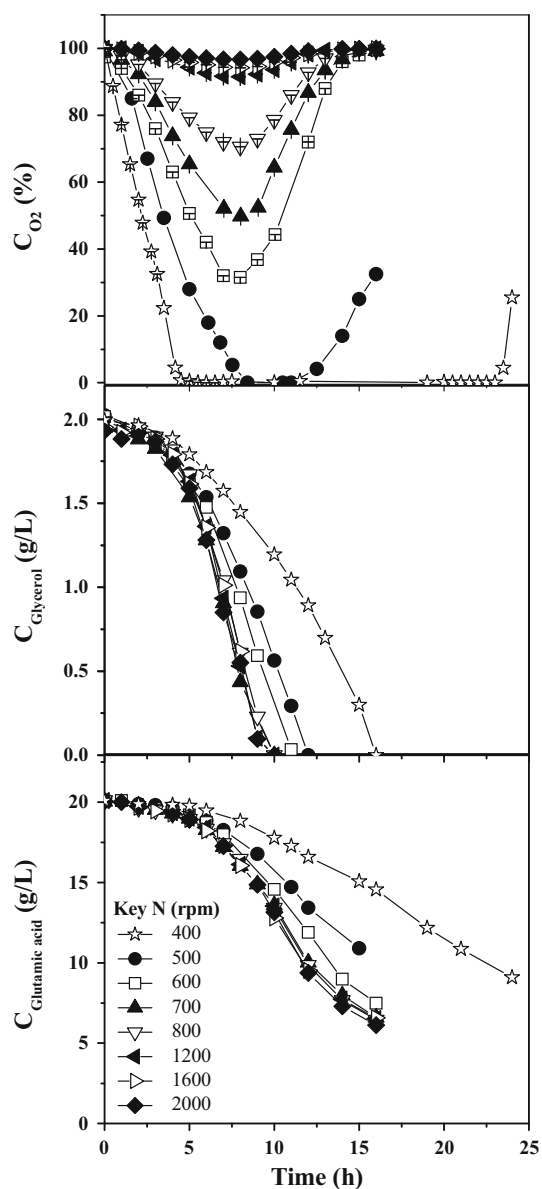


Fig. 2 Dissolved oxygen (a) and carbon source glycerol (b) and glutamic acid (c) concentrations time course for *P. putida* KTH2 cultures conducted at different agitation conditions and a constant aeration rate of 1 vvm

similar evolution of the experimental concentrations of both nutrients.

To establish a comparable basis of analysis of the influence of hydrodynamic conditions on growth rate, the effectiveness factor has been related to $k_L a$ and OUR. Figure 3 shows the relationship between the effectiveness factor for growth and the stirrer speed and impeller Reynolds number. As can be observed, at stirrer speeds below 700 rpm, the biochemical reactions was limited by mass transfer and η values increases from 0.53 (400 rpm) to 1.0 (700 rpm). These results reveal that limitations of mass transfer rate could be occurring when agitation below

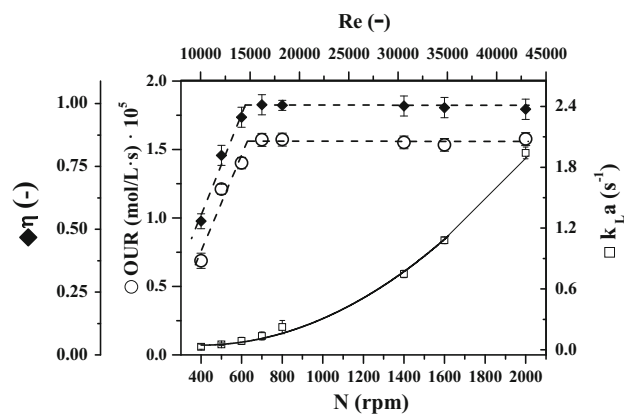


Fig. 3 Variation of the effectiveness factor, η , with stirrer speed and impeller Reynolds for *P. putida* KTH2 cultures in a STBR at a constant gas flow rate of 1 vvm

700 rpm is employed, as was stated in a previous work [23]. The improvement of η is due to the increase in oxygen transport rate ($k_L a$ increases with N) and its effect on OUR and consequently on growth rate. However, for agitation conditions from 700 to 2000 rpm, η takes a value of 1.0, the mass transport limitations are overcome and the process rate is determined by the cell metabolism, reaching the maximum growth rate.

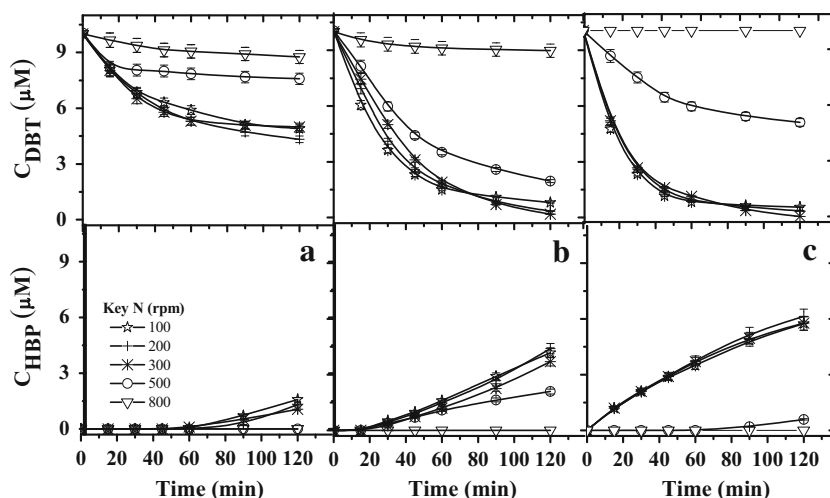
OUR values at first increase with the increase of stirrer speed (N), because OUR is taking the highest possible value under these conditions, being equal to the OTR value. When N is increased, $k_L a$ increases, and therefore OTR increases, and OUR can take higher values, till the maximum value is reached. Then, the increase of N will provoke an increase of $k_L a$ and OTR but now OUR value is not affected, and also the value of the effectiveness factor is constant and equal to 1.

Desulfurization capacity and intracellular enzyme activity study

To observe the agitation effects on desulfurization, DBT and HBP concentrations have been measured during resting cells assays, carried out with cells obtained at 5, 15 and 23 h of growth time cultured at different agitation rates (from 100 to 800 rpm) and a constant gas flow rate of 1 vvm.

In Fig. 4 can be observed the concentration time course of DBT (the sulfur substrate) and HBP (the final sulfur-free product) concentrations for different ages and cells obtained at different stirrer speeds tests. As can be seen, under low agitation conditions (from 100 to 300 rpm), the DBT consumption rate is faster on more advanced age cells; that is, higher HBP concentration is obtained with cells of 23 h of growth time.

Fig. 4 Evolution of DBT and HBP concentrations in resting cells assays using cells of *P. putida* KTH2 cultivated during 5 h (a), 15 h (b) and 23 h (c) of growth carried out at different stirrer speeds and a constant aeration rate of 1 vvm



This influence is not the same for higher agitation conditions. Thus, for 500 rpm, there is an increase in the DBT consumption rate and an increment in the HBP final concentration to 15 h of growth; however, for cells of 23 h of growth, a decrease can be observed in the consumption of DBT and a smaller final HBP concentration.

For cells cultured at 800 rpm, there is an evident high slowdown in the DBT elimination rate and a lower final HBP concentration is obtained for all the cell ages.

Figure 5 shows the changes of X_{DBT} and X_{HBP} values with the agitation for each run of resting cell assays. For the cell ages studied, in the range between 100 and 300 rpm, the evolution of both parameters X_{DBT} and X_{HBP} are similar, both values are constant under these conditions. However, the cell age at this stirring speed range has a significant impact in the results. The X_{DBT} has a value around 50 % for cells of 5 h and 100 % with cells of 15 and 23 h of age. Regarding the X_{HBP} , it has a value of 15 % at 5 h, reaching a value close to 40 and 60 % for cells of 15 and 23 h, respectively.

On the other hand, under higher agitation, from 500 to 800 rpm, the DBT consumption and HBP formation rates decrease, being this decrease higher when the stirrer speed is increased. In fact, with cells cultured at 800 rpm the BDS capacity is almost completely lost. To carry out a quantitative comparison, the intracellular enzyme activities were calculated for cells cultured under the different fluid dynamic conditions. Figure 6 shows the values of DszC, DszA and DszB enzymes activities obtained by resting cells assays using different sulfur substrates. The monooxygenases DszC (whether using DBT as DBTO as substrate) and DszA enzymes show the maximum activity values at advanced age cells. Likewise, the influence of the hydrodynamic conditions over the values of the activities of these enzymes are very similar: at low stirring speeds (100, 200 and 300 rpm) reaching a maximum value around

0.70 $\mu\text{M/g min}$; nevertheless, at higher stirrer speeds (500 and 800 rpm), these enzymes show evident lower values for all the growth time cells reaching maximums around 0.15–0.20 $\mu\text{M/g min}$, but at the higher stirrer speed studied, 800 rpm, the activities fall down close to zero when the growth time is increased. The DszB desulfinate enzyme shows the maximum activity at early cell ages of growth (around 5 h) for all tested operating conditions. The influence of the hydrodynamic conditions is very significant, since highest value of DszB activity is obtained when cells growth is carried out at 100 rpm (0.32 $\mu\text{M/g min}$). This activity value is reduced gradually with the increase of the stirrer speed; for the same cell age, at 200 rpm, it is 0.22 $\mu\text{M/g min}$; at 300 rpm, it is 0.21 $\mu\text{M/g min}$; at 500 rpm, it is 0.10 $\mu\text{M/g min}$; and finally, at 800 rpm, it is 0.04 $\mu\text{M/g min}$.

Hence, it seems that, although the agitation affects the activities of all the enzymes of the 4S pathway, the monooxygenases DszC and DszA and the DszB desulfinate are affected only when the growth is carried out at high stirrer speeds, as shown in a previous work [28]. Nevertheless, in this work, is clearly showed that the activity of the DszB enzyme is affected significantly as soon as the hydrodynamic conditions change, since there is a decrease in its enzyme activity even when the growth is performed at low agitation. This could be due to the fact that, when the OTR increases, the dissolved oxygen concentration available for the cells also increases, and then, as the experimental results show, the activity of this enzyme is adversely affected at two levels: by the growth time of the cells and by the increase of the stirring speed during growth.

Therefore, all indicators seemed to confirm the possible inactivation by oxidation of the DszB desulfinate when the OTR increases, increasing the dissolved oxygen concentration available for the cells. It has been noted that this

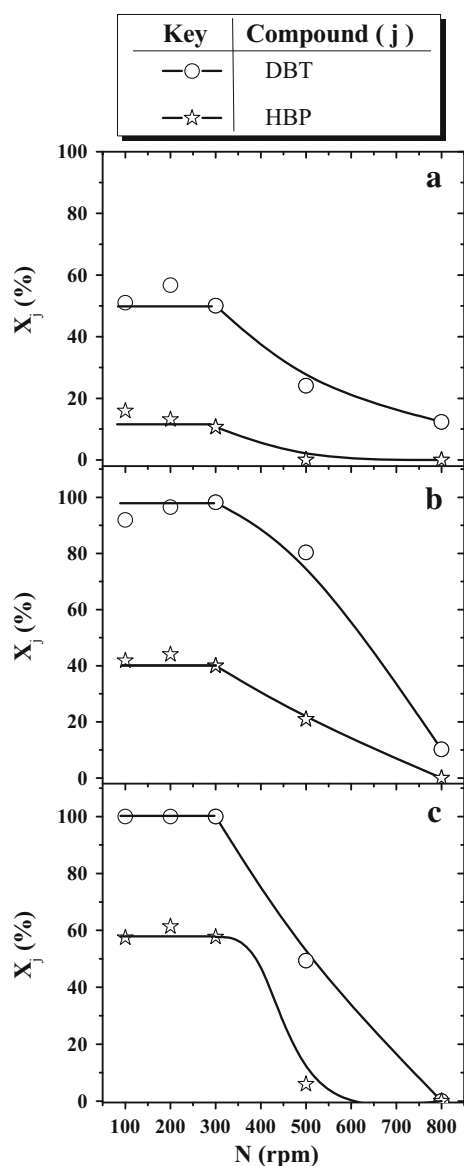


Fig. 5 Evolution of X_{DBT} and X_{HBP} values in resting cell assays (data at 120 min) using cells of *P. putida* KTH2 cultivated during 5 h (a), 15 h (b) and 23 h (c) of growth carried out at different stirrer speeds and a constant aeration rate of 1 vvm

enzyme is adversely affected at two levels: by the growth time of the cells and by the increase of the stirring speed during growth.

Conclusions

The effects of the operating conditions and the corresponding transport phenomena on the *Pseudomonas putida* KTH2 cultures have been studied. The analysis was carried out in cultures conducted under different stirrer speeds, from 400 to 2000 rpm, in a 2 L STBR, thus changing the hydrodynamic conditions.

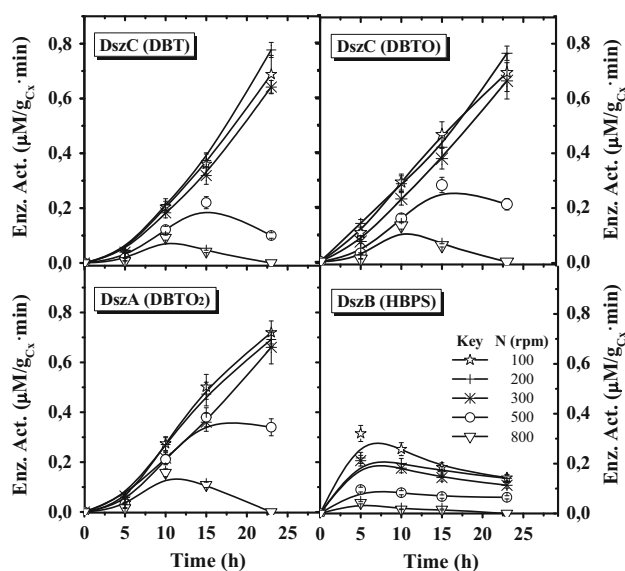


Fig. 6 DszA, DszB and DszC enzyme activities time course for *P. putida* KTH2 resting cells of bacteria cultured to different stirrer speed

By increasing the stirrer speed from 400 to 700 rpm an increase of the growth rate is observed. This increase is a consequence of the combined effect of an improvement of the mass transfer rate and therefore a decrease in the resistance to the transport of nutrients to cells, mainly because the culture is oxygen limited. Nevertheless, for stirrer speeds from 700 to 2000 rpm, although the oxygen transfer conditions are improved with the increase of the stirrer speed, the growth rate on time course is similar. This fact can be due to that, maximum OUR value must be reached and, nevertheless, hydrodynamic stress effects have not been observed. Other microorganisms, *R. erythropolis*, for example, suffer this stress on growth at much lower stirrer speeds [24].

This fact has been expressed by the variation of the effectiveness factor versus the stirrer speed employed on the cell culture. Thus, under oxygen transfer limitation, an increase in the stirrer speed up to 700 rpm provokes an increase in η , reaching a maximum value of 1.

The effect of the stirrer speed during growth on BDS capacity has also been evaluated. Under low stirring speed (from 100 to 300 rpm), the BDS capacity developed by the cells along their growth did not show any relevant differences. However, for agitation from 500 to 800 rpm, the BDS capacity decreases significantly. This means that an improvement of the oxygen transferred in the culture improves the specific growth rate of *P. putida* KTH2, but the BDS capacity is drastically affected.

Likewise, the intracellular enzyme activity showed that the differences in the influence of the hydrodynamic conditions on the BDS capacity was evidently due to the fact

that the activities of all 4S route enzymes were affected by high stirring speeds (from 500 rpm) used in the biomass growth, particularly the DszB activity enzyme (affected from cultures conducted at stirrer speeds higher than 100 rpm), which is the enzyme catalyzing the last reaction of the 4S pathway, and it becomes the enzyme catalyzing the step that controls the overall rate of the process.

Acknowledgments This work has been supported by MICINN under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R, CTQ2011-12725-E and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

References

- Garcia-Ochoa F, Gomez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv* 27:153–176
- Märkl H, Bronnenmeier R, Wittek B (1991) The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. *Int Chem Eng* 31:185–197
- Sahoo S, Verma RK, Suresh AK, Rao KK, Bellare J, Suraishkumar GK (2003) Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. *Biotechnol Prog* 19:1689–1696
- Chisty Y (2010). In: M.C. Flickinger (ed) *Shear Sensitivity in Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons, New York
- Hodaifa G, Martinez ME, Orpez R, Sanchez S (2010) Influence of hydrodynamic stress in the growth of *Scenedesmus obliquus* using a culture medium based on olive mill waste water. *Chem Eng Process* 49:1161–1168
- Calik P, Yilgör P, Ayhan P, Demir A (2004) Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chem Eng Sci* 59:5075–5083
- Olmos E, Mehmood N, Haj-Husein L, Goergen JL, Fick M, Delaunay S (2013) Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess Biosyst Eng* 36:259–272
- Prokop A, Bajpai RK (1992) The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Adv Appl Microbiol* 37:165–232
- Hewitt CJ, Boon LA, McFarlane CM, Nienow AW (1998) The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 59:612–620
- Meijer JJ, ten Hoopen HJG, van Gameren YM, Luyben KChAM, Libbenga KR (1994) Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enz Microb Technol* 16:467–477
- Yepez BO, Maugeri F (2005) Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enz Microb Technol* 36:717–724
- Garcia-Ochoa F, Gomez E, Alcon A, Santos VE (2013) The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 36:911–925
- Kao P-M, Chen C-I, Huang S-C, Chang Y-C, Tsay P-Y, Liu Y-C (2007) Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochem Eng J* 34:172–178
- Arnaud JP, Lacroix C, Foussereau C, Choplin L (1993) Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *J Biotechnol* 29:157–175
- Bronnenmeier R, Märkl H (1982) Hydrodynamic stress capacity of microorganisms. *Biotech Bioeng* 24:553–578
- Denome SA, Olson ES, Young KD (1993) Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol* 59:2837–2843
- McFarland BL (1999) Biodesulfurization. *Curr Opin Microbiol* 2:257–264
- Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheirrolomoom A, Tanaka E, Katoh S (2001) Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem Eng J* 8:151–156
- Martin AB, Alcon A, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2004) Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene (DBT) biodesulfurization for different media compositions. *Energy Fuels* 18:851–857
- Martin AB, Alcon A, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2005) Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels* 19:775–782
- Alcon A, Santos VE, Martin AB, Yustos P, Garcia-Ochoa F (2005) Biodesulfurization of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem Eng J* 26:168–175
- Alcon A, Martin AB, Santos VE, Gomez E, Garcia-Ochoa F (2008) Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT5279. *Biochem Eng J* 39:486–495
- Gomez E, Santos V, Alcon A, Martin AB, Garcia-Ochoa F (2006) Oxygen-uptake and mass-transfer rates on the growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy Fuels* 20:1565–1571
- Gomez E, Alcon A, Escobar S, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2015) Effect of fluid dynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochem Eng J* 99:138–146
- Oldfield C, Pogrebinsky O, Simmonds J, Olson ES, Kulpa CH (1997) Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology* 143:2961–2973
- Galan B, Diaz E, Garcia JL (2000) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* 2:687–694
- Galan B, Diaz E, Fernandez A, Prieto MA, Garcia JL, Garcia-Ochoa F, Garcia Calvo E (2001) Method for desulfurization of dibenzothiophene using a recombinant *Pseudomonas putida* strains as biocatalyst. *International Patent* WO 01/70996 AL
- Calzada J, Zamorro MT, Alcon A, Santos VE, Diaz E, Garcia JL, Garcia-Ochoa F (2009) Analysis of dibenzothiophene desulfurization in a recombinant *Pseudomonas putida* strain. *Appl Environ Microbiol* 75:875–877
- Luedeking R, Piret EL (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng* 1:393–412
- Weiss RM, Ollis DF (1980) Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotech Bioeng* 22:859–873
- Garcia-Ochoa F, Gomez E (2004) Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem Eng Sci* 59:2489–24501
- Garcia-Ochoa F, Gomez E (2005) Prediction of gas-liquid mass transfer in sparged stirred tank bioreactors. *Biotech Bioeng* 92:761–772
- Santos VE, Galdeano C, Gomez E, Alcon A, Garcia-Ochoa F (2006) Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus*

- erythropolis* IGTS8: modelling and difference in results. *Biochem Eng J* 32:198–204
34. Garcia-Ochoa F, Gomez E (2010) Oxygen transfer rate: determination, chemical, physical and biological methods. In: Flickinger MC (ed) *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Wiley, Hoboken
 35. Martinez I, Santos VE, Gomez E, Garcia-Ochoa F (2014) Biodesulfurization of dibenzothiophene by resting cells of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence of the oxygen transfer rate in the scale-up from shaken flask to stirred tank reactor. *J Chem Technol Biotechnol*. doi:[10.1002/jctb.4559](https://doi.org/10.1002/jctb.4559)
 36. Etemadifar Z, Emtiazi G, Christofi N (2008) Enhanced Desulfurization Activity in Protoplast Transformed *Rhodococcus erythropolis*. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 3:795–801
 37. Marquardt AW (1963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J Soc Ind Appl Math* 11:431–441

Publicación 7

Autores: Alberto Rodríguez, Sebastián Escobar, Emilio Gómez, Victoria E. Santos y Félix García Ochoa

Título: Behavior of the *Pseudomonas putida* strains growth under different agitation and oxygen supply conditions

Revista: Bioprocess and Biosystems Engineering. Enviado el 18 de febrero de 2017. Código identificativo: BPBSE-17-0091.

Índice de impacto (2016): 1,901

Área: Biotecnología y Microbiología Aplicada.

Resumen

En este trabajo se evalúa el crecimiento de cuatro cepas diferentes de *Pseudomonas putida*, dos de tipo wild type o nativas (KT2440 y KT2442) y dos individuos genéticamente modificados (KTH2 y KTH2 peSOX3), obtenidos a partir de la cepa KT2442 bajo diferentes condiciones de aporte de oxígeno variando la velocidad de agitación (entre 100 y 800 rpm) en un biorreactor de tipo tanque agitado. El estudio evalúa el efecto de las modificaciones genéticas sobre el crecimiento a diferentes velocidades de transporte de oxígeno (OTR). Además de todo lo anterior, se proponen dos modelos cinéticos para reproducir la evolución con el tiempo de la concentración de biomasa: la ecuación logística y un modelo dependiente de la concentración de oxígeno disuelto.

Las cepas nativas (KT2440 y KT2442) evolucionan de forma sigmoideal bajo cualquiera de las condiciones de operación estudiadas y, por tanto, sus perfiles de concentración de biomasa pueden ajustarse a la ecuación logística de crecimiento. Sin embargo, en los organismos genéticamente modificados (KTH2 y KTH2 peSOX3), este comportamiento es de tipo hiperbólico a bajas agitaciones (entre 100 y 400 rpm), de modo que el crecimiento en estos casos no sigue la tendencia habitual. Bajo estas condiciones, el modelo cinético compuesto es capaz de reproducir la evolución de la biomasa con el tiempo, evidenciando la importancia de este nutriente para explicar este comportamiento anómalo.

Los resultados observados en el crecimiento de las cuatro cepas se han corroborado mediante conteo de viables en placas, donde prácticamente no se observa un cambio significativo en el número de colonias viables para las cepas modificadas genéticamente bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Cuando la agitación es superior a 400 rpm, las cuatro cepas estudiadas se comportan de forma sigmoideal, siendo mayor el crecimiento de los organismos modificados genéticamente que de las cepas KT2440 y KT2442 y no observándose ningún efecto derivado de un estrés de tipo hidrodinámico.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) tomadas en los cultivos de la cepa KTH2 a distintas agitaciones evidencian la presencia de vesículas extracelulares a baja agitación, como respuesta a un estrés de tipo oxidativo, derivado de la acción de la enzima hpaC, que libera peróxido de hidrógeno al medio tras ejercer su acción catalítica.



Behavior of the *Pseudomonas putida* strains growth under different agitation and oxygen supply conditions

Journal:	<i>Bioprocess and Biosystems Engineering</i>
Manuscript ID	Draft
Type of Manuscript:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rodriguez, Alberto; Universidad Complutense, Chemical Engineering; Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Environmental Biotechnology Escobar, Sebastian; Universidad Complutense, Chemical Engineering; Colombian Corporation for Agricultural Research-Corpoica., Biotechnology Gomez, Emilio; COMPLUTENSE UNIVERSITY, CHEMICAL ENGINEERING Santos, Victoria; Universidad Complutense, Chemical Engineering Garcia-Ochoa, Felix; Universidad Complutense, Chemical Engineering
Keywords:	Stirred tank bioreactor, Growth rate, Oxygen transfer and uptake rates, <i>Pseudomonas putida</i> , Vesicles formation

Behavior of the *Pseudomonas putida* strains growth under different agitation and oxygen supply conditions

Alberto Rodriguez², Sebastian Escobar³, Emilio Gomez¹, Victoria E. Santos¹ and Felix Garcia-Ochoa^{1(*)}

¹ Chemical Engineering Department. Universidad Complutense. Madrid. Spain

² Biological Research Center. CSIC. Madrid. Spain

³ Colombian Corporation for Agricultural Research-Corpoica. Colombia.

(*) To whom correspondence must be addressed

Telephone: +34 913944176, Fax:+34 913944179, e-mail: fgochoa@ucm.es

ABSTRACT

The growth rate of four strains of *Pseudomonas putida* (KT2440, KT2442, KTH2 and KTH2 peSOX3) under different fluid dynamic conditions has been studied. The cultures were conducted in a stirred tank bioreactor changing the stirrer speed. Several process variables, such as biomass concentration, dissolved oxygen concentration, oxygen mass transfer rate and oxygen uptake rate, have been measured or calculated. Also cell viability was determined by colony viable counting in Petri dishes and culture samples were subjected to a transmission electron microscopy technique, in order to describe the integrity of the individual cells. The experimental results show that the genetically modified organisms, the strains KTH2 and KTH2 peSOX3, present a different growth under low agitation conditions, and low oxygen supply level, while the growth of the wild type strains, KT2440 and KT2442, followed the typical sigmoidal evolution that could be described by the logistic equation. The presence of outer membrane vesicles has been observed in the GMO strains. When the cultures are conducted at low stirrer speed, and so at low oxygen transfer rate, these vesicles were detected, indicating the bacterial response to oxidative stress, caused by the catalytic activity of the HpaC enzyme. For all of the strains tested, no hydrodynamic stress has been detected, even at very high agitation levels.

Key Words:

Stirred tank bioreactor; Growth rate; Oxygen transfer and uptake rates; *Pseudomonas putida*; Vesicles formation.

INTRODUCTION

The performance of aerobic microbial bioprocesses is affected by the medium composition and the operational conditions. The oxygen dissolved into the broth is an essential substrate for microbial growth, production and culture maintenance. Therefore, the oxygen supply to the culture is a very important variable affecting the performance and scale-up of bioprocesses. [1-3].

In a stirred tank bioreactor (STBR), air gas flow rate and agitation are the main variables affecting fluid dynamic conditions, and they have a decisive importance in the growth rate of cells and in product distribution, even in the controlling step of the overall bioprocess rate culture [3-5]. Many studies have been conducted to show how the agitation and aeration rates influence the oxygen transfer rate and much less the influence on cell growth and metabolites productivity [4, 6-8].

The biodesulfurization of fossil fuels has been widely studied, employing different biocatalysts to transform dibenzothiophene (DBT) into 2-hydroxybiphenil (2-HBP) [4, 9-12]. This bioprocess has experienced a great impulse since the 4S route was discovered in *Rhodococcus erythropolis* IGTS68 [13]. This pathway consists in four serial reactions in which DBT is converted into 2-HBP by the catalyst action of the enzymes DszA, DszB and DszC, contained in operon *dsz* [14]. Due to the necessity for the continuous regeneration of reducing power (NADH, FMNH₂), the presence of an oxidoreductase enzyme is required and in *R. erythropolis* it was called DszD [15].

In addition to the natural producers, when the genes of operon *dsz* were codified and isolated by molecular biology techniques, some microorganisms have been engineered to produce the 4S route fermentative, such as *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *Mycobacterium* [16-18].

In previous studies with *Pseudomonas putida* CECT 5279 cultures, the protocols for obtaining the biocatalyst and the optimal medium composition to perform the biotransformation are described [19, 20]. In another work, the influence of agitation speed employed in the cell growth on desulfurization capacity in resting cell was determined [19, 20].

Afterwards, it was observed that the yield of the process depended on the age cell [19] and the desulfurization capacity were analyzed at different culture times, establishing the most adequate cell age for the bioprocess [21]. Next, the transformation was described through a kinetic model for all the operational conditions tested, including the biocatalyst in resting cells state [22].

1
2
3 The strain *Pseudomonas putida* KTH2 peSOX3 was obtained by introducing the genes of the
4 oxidoreductase enzyme HpaC of *Escherichia coli* W into the bacterial genome [12] and
5 expressing the operon *dsz* through the plasmid peSOX3. With this GMO several studies have
6 been made. Firstly, the optimal cell age was established and the enhancing of the process by
7 addition of co-substrates was evaluated [10]. Subsequently, a kinetic model was proposed in
8 order to describe the experimental results and the influence of OTR over the biomass growth and
9 the desulfurization capacity was studied, by changing the agitation or the airflow rate [4, 23].
10
11
12
13
14

15 The results showed that, if the culture is carried out at a high agitation, which induces high
16 dissolved oxygen concentration, the growth rate increases and the cells are not affected by shear
17 stress. However, the desulfurization capacity operating with resting cells present a dramatic
18 decrease if the growth is carried out at a stirrer speed higher than 300 rpm [4].
19
20
21
22

23 In the present study, the growth rate of different *Pseudomonas putida* strains, wild type and
24 GMO, under different agitation and oxygen supply conditions have been tested, in order to obtain
25 data from the cultures under different oxygen conditions. The main aim of this work is to study
26 the growth of different *P. putida* strains, wild type and GMO, cultured under low level of oxygen
27 supply.
28
29
30
31

32 MATERIALS AND METHODS

33 *Microorganisms and medium*

34
35 Four different strains of *Pseudomonas putida* have been employed as biocatalyst. Two of them,
36 *P. putida* KT-2440 and KT-2442, can be considered as wild-type strains, while the strains KTH2
37 and KTH2 peSOX3, are GMO. The strain KTH2 was obtained by introducing the genes of
38 oxidoreductase enzyme HpaC of *E. coli* W into the bacterial chromosome of the strain KT-2442,
39 as previously described [12]. The operon *dszABC* from *R. erythropolis* IGTS8 was introduced
40 into the plasmid peSOX3, resistant to tetracycline, and expressed by isopropyl β -D-1-
41 thiogalactopyranoside (IPTG) induction in the strain KTH2, resulting the strain KTH2 peSOX3
42 [18].
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Before inoculation, the cells were stored at -80 °C in a 50% (w/w) glycerol/saline serum solution.
52 From this stock, two previous growth steps were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50
53 mL of LB medium in orbital shaker during 12 and 4 h, respectively. Afterwards, STBR with
54 BSM medium was inoculated with an initial inoculum volume of 7% ($v \cdot v^{-1}$). The medium
55 composition for STBR experiments was as follows, per liter of deionized water [19]: 4 g
56
57
58
59
60

1
2
3 NaH₂PO₄·H₂O, 4 g K₂HPO₄·3H₂O, 2 g NH₄Cl, 0.0245 g MgCl₂·6H₂O, 0.001 g CaCl₂·2H₂O,
4 0.001 FeCl₃·6H₂O, 0.444 g MgSO₄·7H₂O. The carbon sources employed were L-glutamic acid
5 (20 g·L⁻¹) and glycerol (2 g·L⁻¹). Additionally, 0.5 mL·L⁻¹ of silicone antifoam liquid were added
6 to the culture medium before inoculation in order to avoid the formation of surfactants during the
7 runs. In the experiments carried out with the strain KTH2 peSOX3, 0.025 g/L of tetracycline
8 have to be added into LB or BSM medium, so that the microorganism does not lose the plasmid
9 where the operon *dszABC* is contained. The induction of the plasmid was achieved by adding
10 2·10⁻⁶ g/L of IPTG before STBR inoculation [4, 23].
11
12
13
14
15
16

17 *STBR batch cultures procedure*

18
19 The experiments were performed in a 2 L Biostat ® B-Plus (Sartorius AG Germany), with a
20 working volume of 2 L. The bioreactor consisted in a baffled vessel 13.5 cm of inner diameter
21 and 20 cm height. The agitation system was formed by a six blade Rushton turbine system (5.3
22 cm of diameter), coupled to an electrical motor (Kollmorgen 3ΦPM, Danaher Motion, Czech
23 Republic). The reaction system was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. The runs were
24 conducted using 7 % (v/v) of LB inoculum at the operational conditions determined in a previous
25 work [4]: 30 °C, 0.1 g·L⁻¹ of initial biomass concentration, 1 vvm airflow and free evolution of
26 pH from 7.0.
27
28
29
30
31
32

33
34 Runs were carried out changing the stirrer speed from 100 to 800 rpm. The evolution of dissolved
35 oxygen (DO) concentration was followed by a specific polarographic sensor OxyFerm FDA
36 Hamilton 160 (Hamilton, USA). During each run, culture samples were extracted from the STBR
37 to determine the biomass concentration and viability.
38
39
40

41 *Analytical methods*

42
43 The quantification of biomass was made measuring the culture optical density at 600 nm
44 (Shimadzu UV-visible spectrophotometer, Japan). The relationship between the cell dry biomass
45 concentration (*C_x*) after drying at 105 °C until constant weight and the optical density (OD₆₀₀) for
46 each strain is expressed by following equations:
47
48
49

$$50 \quad C_{x_{KT2440}} \left(\frac{g}{L} \right) = 0.533 \cdot OD_{600} \quad [1]$$

$$51 \quad C_{x_{KT2442}} \left(\frac{g}{L} \right) = 0.566 \cdot OD_{600} \quad [2]$$

$$52 \quad C_{x_{KTH2}} \left(\frac{g}{L} \right) = 0.591 \cdot OD_{600} \quad [3]$$

$$C_{X_{KTH2 peSOX3}} \left(\frac{g}{L} \right) = 0.621 \cdot OD_{600} \quad [4]$$

Biomass viability was evaluated by colony viable counting in Petri dishes with LB solid agar medium. The dishes were seeded from saline serum serial diluted samples withdrawn from the bioreactor at different culture times and incubated at 30 °C during 24 h [24]. The microbial colonies grown in the dishes were counted and the concentration of colony forming units (CFU) was determined by applying the corresponding dilution factor.

Samples of STBR runs subjected at different agitation conditions were prepared for transmission electron microscopy (TEM), following the protocol described previously by [25]. Several TEM images of each sample were compiled in order to evaluate the influence of changes of conditions over the cellular integrity of *P. putida* strains at different culture times.

The STBR outlet gas stream composition was determined using a combined oxygen-carbon dioxide sensor BioPAT® Xgas (Sartorius AG, Germany), connected to the STBR outlet gas stream. The sensor was calibrated before every run by circulating 3 L·min⁻¹ of compressed air for 30 min.

OTR and OUR determination

The oxygen mass balance in the liquid phase, assuming well-mixed culture, can be established by [1-3]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad [5]$$

Considering the mass material balance in the gas phase, the oxygen transfer rate can be determined as the difference between the inlet and outlet oxygen molar flow rates per volume unit, as expressed according to the following equation:

$$\frac{F_{O_2}^{IN} - F_{O_2}^{OUT}}{V} = OTR \quad [6]$$

Then OUR can be calculated according to equation (5), once OTR and DO oxygen profiles are known, such as those described elsewhere [4].

Mathematical methods

Kinetic models were fitted to experimental data using Aspen Custom Modeler® (Aspentech, USA), integrating the differential equations by an implicit Euler method, as previously described [26, 27]. The model parameters were estimated by an adaptive non-linear-least-squares algorithm

(NL2SOL), minimizing the differences between the experimental observations and the model simulations according to the “*least squares method*”. The validation of the fittings was performed attending to the values of the following statistical parameters: F-Fisher’s value (F_{cal}), the sum of squared residuals (SSR), the residual mean squared error (RMSE) and the validation explained (VE), which are defined in the Appendix.

RESULTS AND DISCUSSION

In previous works (Gomez et al., 2006; Escobar et al., 2015) it was reported that the growth rate of *P. putida* CECT 5279 and KTH2 is strongly dependent on the agitation, showing that the growth rate increases when the stirrer speed increases. According to the previous results, and in order to identify the influence of the oxygen supply conditions on cell growth, a new set of experiments was performed with the different strains, changing the stirrer speed from 100 to 800 rpm, and keeping the air flow rate constant at $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (1.0 vvm).

In Figure 1, the evolution of the biomass concentration with time at different agitation conditions are shown for the four *P. putida* strains tested in this work. The results indicate that oxygen conditions played a vital role in cell growth. For all of the strains tested, the increase of agitation enhances microbial growth rate (and substrates consumption rates). As can be observed in this figure, the *P. putida* KT2440 and KT2442 cultures show a similar growth, reach a relative high final cell dry weight (up to $4\text{-}4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ at 800 rpm). Moreover, under the fluid dynamic conditions studied, the graph of $C_X(t)$ versus time shows a sigmoidal behavior following a logistic growth pattern. However, the cultures employing the GMO strains (KTH2 y KTH2 peSOX3) reach higher final cell dry weight (up to $5.5\text{-}6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ at 800 rpm); but show a different growth for low agitation conditions (low oxygen supply) with a hyperbolic growth curve.

In Figure 2, the growth rate, calculated as the OD_{600} derivative with time at different agitation conditions, of the four *P. putida* strains (KT2440, KT2442, KTH2 and KTH2 peSOX3) can be seen. The oxygen supply affects clearly the behavior of optical density with time. In a typical microbial growth profile OD_{600} derivative presents a maximum value when the culture reaches half the exponential growth stage and then decreases with time. This performance is manifested in all the cultures carried out with the strains KT2440 and KT2442 (see Figures 2A and 2B) and also with the GMO strains at 600 and 800 rpm. However, under low agitation conditions (100 and 200 rpm), the GMO strains KTH2 and KTH2 peSOX3 present a different evolution, reaching the maximum value of R_X at the beginning and decreasing with time through the run (see Figures 2C and 2D). These observations, characteristic of a hyperbolic behavior of the microbial growth

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

curve, highlight the effect of the genetic mutations in the GMO strains, and may be due to the expression of the enzyme hpaC, which releases hydrogen peroxide to the medium by exerting its catalytic action. Similar effects derived of the presence of this compound in *Pseudomonas* cultures have been previously reported [28]. The analysis in Figure 2 is very useful in order to propose a kinetic model to describe the microbial growth, considering that the experiments carried out under low oxygen availability with GMO strains cannot be modeled by the logistic growth equation.

Biomass quantification by OD is based on the culture sample absorbance, which is compared with a water pattern at a certain wave length. The absorbance is related with broth turbidity, but does not inform about how many viable cells there are in the broth. This fact has been verified by counting viable colonies in plates. Figure 3 presents the time course of bacterial growth profiles under several agitation conditions for different *P. putida* strains. Measurements of viable cells were carried out by counting colonies in LB agar plates. As can be seen in this figure, the final CFU concentration increases with stirring speed in the runs performed from 100 to 600 rpm. The results support the previous description showing that the wild type strains have a similar sigmoidal growth under all the agitation conditions studied; but the behavior of the GMO strains is diverse. When the cultures are conducted at low agitation (200 rpm and lower) the wild type strains reach a number of CFU greater than GMO strains. In the runs conducted between 400 and 600 rpm, the GMO strains (KTH2 and KTH2 peSOX3) show a higher growth than the previous ones, although the behavior can be considered as intermediate between a hyperbolic and a sigmoidal evolution.

The dissolved oxygen concentration depends on the oxygen transfer rate (OTR) from the air bubbles to the liquid and on the oxygen uptake (OUR) for growth, maintenance and bio-desulphurization capacity (enzymes) accumulation by the cells. It is also known that OTR is increased by increasing the power input, which can mainly be made by changing either airflow or agitation, In Figure 4 the time course dissolved oxygen (DO) concentration and oxygen transfer rate (OTR) under different operating conditions are shown.

As can be seen, in the runs conducted at 100, 200 and 400 rpm the oxygen dissolved concentration drops to 0% saturation in less than 4 hours, remaining at this value for the whole time of the process progress. Thus, OTR increases almost linearly with an increasing stirrer speed, reaching a plateau where its value is equal to the OUR. The DO concentration evolution shows that the culture at agitation below 400 rpm is being carried out under oxygen mass transfer limitation, that is to say, the OTR is controlling the overall process rate. On the other hand, OTR

1
2
3 must be equal to OUR according to equation [5], when DO concentration remains equal to zero.
4 Nevertheless, if stirrer speed is higher than 400 rpm, the oxygen dissolved concentration
5 decreases to reach a minimum value, corresponding to the middle of the exponential phase of
6 growth (maximum value of growth rate according to Figure 2), where the greatest demand for
7 oxygen of the cells is required. Later on, when the cell energy requirement decreases, and the
8 demand for oxygen is reduced, the dissolved oxygen concentration increases, in some cases
9 (higher stirrer speed runs) even reaching 100 % of the saturation value. Accordingly, OTR firstly
10 increases during lag stage and especially during the first exponential growth stage, taking a
11 maximum value; afterwards, the values of OTR decrease slowly at the growth stationary stage. In
12 this case, the oxygen supplied to the liquid phase is not consumed completely, which means that
13 OTR is higher than OUR, and therefore DO concentration is greater than zero, and it increases
14 with time (thus the derivative value is also greater than zero).
15
16
17
18
19
20
21
22

23 In order to study more in depth the growth of strains, cell morphology images were taken at
24 different batch times under different conditions. As an example, in Figure 5 TEM images of
25 *Pseudomonas putida* KTH2 cells are shown. As can be observed, if the run is conducted under
26 moderate agitation conditions and low oxygen supply (Figures 5A), the cells appear associated
27 with each other, or cell groups in aggregates, probably consequence of biofilm around the
28 individuals cells. Moreover, under these conditions, extracellular vesicles are observed by TEM
29 observations. This fact can be due to the cells response of GMO to low oxygen conditions,
30 caused by the catalytic activity of the HpaC. Nevertheless, the results in the runs conducted at
31 400 and 600 rpm of stirrer speed (Figures 5B y 5C) are different; *P. putida* cells are noticed
32 individually, and neither aggregates nor extracellular vesicles are observed.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 GROWTH KINETIC MODELLING

44
45 As indicated above, according to the results presented in Figures 1 and 2, two different kinetic
46 models for describing the evolution of biomass concentration have been employed, taking into
47 account whether the behavior of this variable was sigmoidal or hyperbolic throughout the growth
48 experiments. The sigmoidal growth of the tested strains was fitted to the logistic growth equation,
49 according to the results obtained in a previous work [4], as follows:
50
51
52
53

$$54 \frac{dC_X}{dt} = \mu_{max} \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{max}}\right) \quad (7)$$

55
56
57 Integrating this equation with the boundary condition $t = 0, C_X = C_{X0}$, equation (7) yields:
58
59
60

$$C_X(t) = \frac{C_{X_0} \cdot \exp(\mu_{max} \cdot t)}{1 - \frac{C_{X_0}}{C_X^{max}} \cdot [1 - \exp(\mu_{max} \cdot t)]} \quad (8)$$

The hyperbolic evolution of biomass concentration, reached in the runs conducted under oxygen limitations with the strains KTH2 and KTH2 peSOX3 was modeled employing a Monod type expression with respect to the dissolved oxygen concentration, as follows:

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu \cdot C_{O_2}}{K_1 + C_{O_2}} \cdot \frac{C_X}{K_2 \cdot C_{O_2} + C_X} \quad (9)$$

In this way, the special growth of the GMO strains under low oxygen supply; that is, when the stirrer speed is low and therefore OTR and OUR values are very low, the variation of the OD₆₀₀ is due to two different phenomena, cell growth and vesicle formation. The first phenomena is described according to the equation usually employed (similar to Eq. (7), but with influence from the limiting nutrient, oxygen in this case), and the second phenomena is described according to a model of Monod type respect to the DO concentration.

The fitting of both of these kinetic models to the experimental results can be observed in Figure 1, where the experimental results (points) are represented together with the simulations provided by the kinetic models (lines) with the parameter values given in Tables 1 and 2. In these tables also the statistical parameters defined in the Appendix are shown.

Table 1 shows the kinetic and statistical parameters obtained by the fitting of the logistic growth equation (Eq. 8) to the biomass concentration profiles of the strains KT2440 and KT2442 in all the runs, for stirring speeds from 100 to 800 rpm, and also for the GMO strains (KTH2 and KTH2peSOX3) in the runs conducted at 600 and 800 rpm. As can be seen the fittings achieve the F-test and the variation explained is very close to 100 %; additionally, the SSR and RMSE are considerably small, as expected from a robust kinetic model. The confidence intervals of the parameter (for 95 %) are also included; for the wild-type strains, μ_{max} is higher when the stirrer speed is increased, although its values are practically coincident at 600 and 800 rpm. This situation is also observed in the parameters calculated for the GMO, supporting the results obtained in a previous work [4]. The biomass concentration reached in the stationary growth stage increases when the oxygen supply is higher in all the strains tested, providing similar values in KTH2 and KTH2 peSOX3 strains under high agitation conditions.

The kinetic constants and the statistical parameters for the strains KTH2 and KTH2 peSOX3 when the culture is carried out under low oxygen supply conditions, in runs conducted from 100

1
2
3 to 400 rpm are given. All the fittings pass the F-test at a 95% of confidence level and the
4 variation explained is close to 99%. Moreover, the model dependent on the dissolved oxygen
5 concentration is able to reproduce the biomass growth at 400 rpm in two GMO strains, when their
6 behavior seems to be intermediate between a hyperbolic and a sigmoidal evolution (see Figures
7 1C and 1D). The values of the specific growth rate " μ " increases when the culture agitation gets
8 higher, according to the experimental results obtained.
9
10
11
12

13 CONCLUSIONS

14
15
16 Taking into account experimental results of previous works, in order to identify the effect of
17 different oxygen supply conditions on cell growth, a set of experiments was performed with
18 different *Pseudomonas putida* strains, wild type and GMO, changing the stirrer speed from 100
19 to 800 rpm, and keeping the air flow rate constant at $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (1.0 vvm).
20
21
22

23
24 The results of this work show that OTR conditions, and that the oxygen availability by the
25 culture, play a vital role in cell growth for all of the strains tested. The increase of agitation
26 enhances microbial growth in all the cases, no hydrodynamic stress is detected even at high stirrer
27 speed, which is in agreement with previous results obtained with the KTH2 peSOX3 strain
28 (Escobar et al., 2016).
29
30
31

32
33 Nevertheless, the influence of a low OTR is different in the case of the cultures of GMO strains,
34 *P. putida* KTH2 and KTH2 peSOX3. In the runs carried out at low stirrer speed, under low OTR
35 values, these GMO strains do not show a sigmoidal behavior, as usual, following a logistic
36 growth pattern. The cell viability, determined by colony viable counting, showed that growth
37 scarcely takes place under oxygen default conditions. Also, TEM images of *Pseudomonas putida*
38 KTH2 cells under low oxygen availability demonstrate the appearance of extracellular vesicles in
39 response to those conditions of oxygen default, surely due to the presence of hydrogen peroxide
40 in the culture broth [28]. These structures are not observed at higher stirrer speeds. The formation
41 of vesicles under the above mentioned conditions could be a simple method to obtain
42 extracellular vesicles.
43
44
45
46
47
48
49
50

51 NOMENCLATURE

52
53 2-HBP 2-hydroxybiphenyl

54 Cx Biomass concentration ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

55
56 C*: Oxygen concentration in equilibrium ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
57
58
59
60

1		
2		
3	CFU	Colony forming unit
4		
5	DBT	Dibenzothiophene
6		
7	DO	Dissolved oxygen ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
8		
9	F	F Fisher's value in F-test
10		
11	GMO	Genetically modified organism
12		
13	K_La	Volumetric mass transfer coefficient (s^{-1})
14		
15	N	Stirrer speed (rpm)
16		
17	OD_{600}	Optical density at 600 nm
18		
19	OTR:	Oxygen transfer rate ($\text{mol O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
20		
21	OUR:	Oxygen uptake rate ($\text{mol O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
22		
23		
24	R_X	OD_{600} derivative with time (h^{-1})
25		
26	STBR	Stirred Tank Bioreactor
27		
28	T:	Time (h)
29		
30	TEM:	Transmission Electronic Microscopy
31		
32	U_C :	Viable colony forming unit concentration ($\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$)
33		
34	V:	Volume of the liquid in the vessel (L)
35		
36		
37	Subscripts	
38		
39	X	Referred to biomass
40		
41	O_2	Referred to oxygen
42		
43	Superindexes	
44		
45	cal	Referred to the calculated value of a certain variable
46		
47	max	Referred to the biomass concentration in stationary phase in Eq (8) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
48		
49	inlet	Referred to inlet
50		
51	outlet	Referred to outlet
52		
53	tab	Referred to tabulated value of F Fisher
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by MINECO under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

REFERENCES

1. Hassan R, Loubiere K, Legrand J, Delaplace G (2012) A consistent dimensional analysis of gas-liquid mass transfer in an aerated stirred tank containing purely viscous fluids with shear-thinning properties. *Chemical Engineering Journal* 184, 42-56.
2. Kao P-M, Chen C-I, Huang S-C, Chang Y-C, Tsai P-J, Liu Y-C (2007) Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochemical Engineering Journal* 34, 172-178.
3. Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal* 49, 289-307.
4. Escobar S, Rodriguez A, Gomez E, Alcon A, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2016) Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39, 545-554.
5. Toma MK, Ruklisha MP, Vanags JJ, Zeltina MO, Lelte MP, Galinine NI, Viesturs UE, Tengerdy RP (1991) Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 552-556.
6. Rodriguez A, Ripoll V, Santos VE, Gomez E, Garcia-Ochoa F (2016) Effect of fluid dynamic conditions on 2,3-butanediol production by *Raoultella terrigena* in SBTR: oxygen transfer and uptake rates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, n/a-n/a.
7. Gomez E, Alcon A, Escobar S, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2015) Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochemical Engineering Journal* 99, 138-146.
8. Trujillo-Roldan MA, Valdez-Cruz NA (2006) Hydrodynamic stress: death and cellular damage in agitated cultures. *Rev Latinoam Microbiol* 48, 269-280.
9. Mohamed ME-S, Al-Yacoub ZH, Vedakumar JV (2015) Biocatalytic desulfurization of thiophenic compounds and crude oil by newly isolated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 6.
10. Martinez I, Santos VE, Alcon A, Garcia-Ochoa F (2015) Enhancement of the biodesulfurization capacity of *Pseudomonas putida* CECT 5279 by co-substrate addition. *Process Biochemistry* 50, 119-124.

11. Rhee S-K, Chang JH, Chang YK, Chang HN (1998) Desulfurization of Dibenzothiophene and Diesel Oils by a Newly Isolated Gordona Strain, CYKS1. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2327-2331.
12. Galan B, Diaz E, Garcia JL (2000) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environmental Microbiology* 2, 687-694.
13. Gallagher JR, Olson ES, Stanley DC (1993) Microbial desulfurization of dibenzothiophene: A sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiology Letters* 107, 31-35.
14. Gray KA, Pogrebinsky OS, Mrachko GT, Xi L, Monticello DJ, Squires CH (1996) Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnology* 14, 1705-1709.
15. Oldfield C, Pogrebinsky O, Simmonds J, Olson ES, Kulpa CF (1997) Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology* 143, 2961-2973.
16. Mohebbali G, Ball AS (2008) Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology* 154, 2169-2183.
17. Singh SP, Singh D (2010) Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 200-216.
18. Gallardo ME, Fernandez A, de Lorenzo V, Garcia JL, Diaz E (1997) Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *Journal of Bacteriology* 179, 7156-7160.
19. Alcon A, Santos VE, Martin AB, Yustos P, Garcia-Ochoa F (2005) Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochemical Engineering Journal* 26, 168-175.
20. Gomez E, Santos VE, Alcon A, Martin AB, Garcia-Ochoa F (2006) Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT 5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability. *Energy & Fuels* 20, 1565-1571.
21. Calzada J, Alcon A, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2011) Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochemistry* 46, 1323-1328.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
22. Calzada J, Alcon A, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2012) Extended kinetic model for DBT desulfurization using *Pseudomonas Putida* CECT5279 in resting cells. *Biochemical Engineering Journal* 66, 52-60.
23. Martinez I, Santos VE, Gomez E, Garcia-Ochoa F (2016) Biodesulfurization of dibenzothiophene by resting cells of *Pseudomonas putida* CECT 5279: influence of the oxygen transfer rate in the scale-up from shaken flask to stirred tank reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 91, 184-189.
24. de Sarrau B, Clavel T, Bornard I, Nguyen-the C (2013) Low temperatures and fermentative metabolism limit peptidoglycan digestion of *Bacillus cereus*. Impact on colony forming unit counts. *Food Microbiology* 33, 213-220.
25. Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S, Moore ERB, Abraham W-R, Lünsdorf H, Timmis KN (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48, 339-348.
26. del Olmo CH, Alcón A, Santos VE, García-Ochoa F (2005) Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of media composition. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 157-166.
27. Garcia-Ochoa F, Casas JA (1999) Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 613-621.
28. McDonald IA, Kuehn MJ (2013) Stress-Induced Outer Membrane Vesicle Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 195, 2971-2981.

APPENDIX: Statistical parameters

The F test is based on the null hypothesis and represents a criterion for the validation of a kinetic model. The calculated value of F (F_{cal}) is defined by the equation (10):

$$F_{cal} = \frac{\sum_{i=1}^N \left(\frac{y_{i,calc}}{M} \right)^2}{\sum_{i=1}^N \frac{SSR}{N-M}} \quad (10)$$

where N is the number of the experimental points, M is the number of parameters in the model, $y_{i, cal}$ and $y_{i, exp}$ are the calculated and experimental values of the fitted variable, respectively, and SSR is the sum of squared residuals, $(y_{i, exp} - y_{i, cal})^2$. If F_{cal} is higher than its tabulated value (F_{tab})

for the same degrees of freedom (N-M) for a determined confidence interval (95% by default in Aspen Custom Modeler®), the hypothesis null is achieved and the fitting passes the F-test.

The residual mean squared error represents a measure of the global difference between the predicted and the experimental values. It englobes the total available data and the number of parameters of the model, expressed as shown in equation (11):

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{N - M}} \quad (11)$$

The variation explained (VE) is given by Aspen Custom Modeler® as a percentage, given by:

$$VE (\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^L SSQ_l}{\sum_{l=1}^L SSQ_{mean_l}} \right) \quad (12)$$

where SSQ_l and SSQ_{mean_l} are the sum of the quadratic residues and the squared sum of deviations between the experimental and the mean score respect to the calculated values, respectively, given by the equations (13) and (14):

$$SSQ_l = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,exp} - y_{i,calc})^2}{y_{i,calc}^{\gamma_l}} \quad (13)$$

$$SSQ_{mean_l} = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,exp} - \bar{y}_{i,exp})^2}{y_{i,calc}^{\gamma_l}} \quad (14)$$

being

$$\bar{y}_{i,exp} = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{y_{i,exp}}{y_{i,calc}^{\gamma_l/2}}}{\sum_{i=1}^N \frac{1}{y_{i,calc}^{\gamma_l/2}}} \quad (15)$$

The term " γ_j " is the heteroscedasticity parameter, which is related with the different dispersion in the error between the measured and the estimated variable. By default, Aspen Custom Modeler® fixes its value at 1.

LIST OF TABLES

Table 1. Kinetic and statistical parameters of the model proposed in Eq. (8) for the different *Pseudomonas putida* strains under several agitation conditions.

Table 2. Kinetic and statistical parameters of the model proposed in Eq. (9) for the GMO strains of *Pseudomonas putida* under low agitation conditions.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Evolution with time of the biomass concentration and kinetic model simulations of Eqs. (8) and (9) at different agitation conditions for the four *P. putida* strains tested: (A) KT2440, (B) KT2442, (C) KTH2 and (D) KTH2 peSOX3.

Figure 2. Evolution of OD₆₀₀ derivative with time at different agitation conditions for the four *P. putida* strains tested: (A) KT2440, (B) KT2442, (C) KTH2 and (D) KTH2 peSOX3.

Figure 3. Evolution with time of viable colonies concentration (U_C) for *P. putida* strains at different agitation conditions: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm and (C) 600 rpm.

Figure 4. Time of course of dissolved oxygen (DO) concentration and oxygen transfer rate (OTR) under several agitation conditions for the *P. putida* strains tested. For DO: (A) 100 rpm, (B) 200 rpm, (C) 400 rpm, (D) 600 rpm and (E) 800 rpm. For OTR: (F) 100 rpm, (G) 200 rpm, (H) 400 rpm, (I) 600 rpm and (J) 800 rpm.

Figure 5. TEM images of *P. putida* KTH2 cells in batch cultures carried out at the following stirrer speeds: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm and (C) 600 rpm.

Table 1. Kinetic and statistical parameters of the model proposed in Eq. (8) for the different *Pseudomonas putida* strains under several agitation conditions.

Strain	N (rpm)	μ_{max} (h ⁻¹)	C_X^{max} g·L ⁻¹	SSR	RMSE	F _{cal}	F _{tab}	VE (%)
KT2440	100	0.326 ± 0.012	1.31 ± 0.05	0.02	0.03	4,120	3.885	99.3
	200	0.344 ± 0.013	2.01 ± 0.04	0.04	0.05	7,383	2.668	99.4
	400	0.497 ± 0.015	2.65 ± 0.04	0.05	0.05	13,315	2.668	99.7
	600	0.761 ± 0.011	3.44 ± 0.04	0.02	0.04	24,895	2.924	99.9
	800	0.741 ± 0.016	4.58 ± 0.16	0.08	0.07	12,053	2.807	99.8
KT2442	100	0.268 ± 0.012	1.68 ± 0.07	0.03	0.05	2,893	2.807	99.2
	200	0.304 ± 0.016	2.14 ± 0.14	0.15	0.11	800	2.860	97.6
	400	0.364 ± 0.021	2.93 ± 0.21	0.22	0.14	876	2.924	98.1
	600	0.602 ± 0.024	3.54 ± 0.12	0.41	0.17	1,472	2.807	98.2
	800	0.532 ± 0.022	4.21 ± 0.11	0.24	0.13	3,854	2.763	99.3
KTH2	600	0.551 ± 0.012	5.83 ± 0.19	0.18	0.11	5,780	2.807	99.7
	800	0.590 ± 0.009	5.78 ± 0.15	0.13	0.09	9,898	2.807	99.8
KTH2 peSOX3	600	0.510 ± 0.013	4.88 ± 0.18	0.14	0.11	3,643	2.860	99.6
	800	0.509 ± 0.010	5.07 ± 0.16	0.23	0.13	2,145	2.860	99.4

Table 2. Kinetic and statistical parameters of the model proposed in Eq. (9) for the GMO strains of *Pseudomonas putida* under low agitation conditions.

Strain	N (rpm)	μ [g X·(L·h) ⁻¹]	$K_1 \cdot 10^7$ (g O ₂ ·L ⁻¹)	K_2 (g X·g O ₂ ⁻¹)	SSR	RMSE	F _{cal}	F _{tab}	VE (%)
KTH2	100	0.075 ± 0.003	1.72 ± 0.02	18.5 ± 1.31	0.04	0.05	3,011	3.708	96.9
	200	0.109 ± 0.011	1.74 ± 0.05	17.2 ± 1.44	0.12	0.08	3,950	3.287	98.3
	400	0.259 ± 0.017	1.71 ± 0.02	18.7 ± 1.24	0.11	0.08	15,244	3.344	99.6
KTH2 peSOX3	100	0.143 ± 0.010	1.67 ± 0.04	20.3 ± 1.94	0.05	0.06	2,525	3.587	97.4
	200	0.144 ± 0.012	1.64 ± 0.01	20.5 ± 1.22	0.05	0.05	7,566	3.344	99.1
	400	0.217 ± 0.016	1.65 ± 0.06	20.8 ± 1.46	0.35	0.16	1,497	3.708	97.6

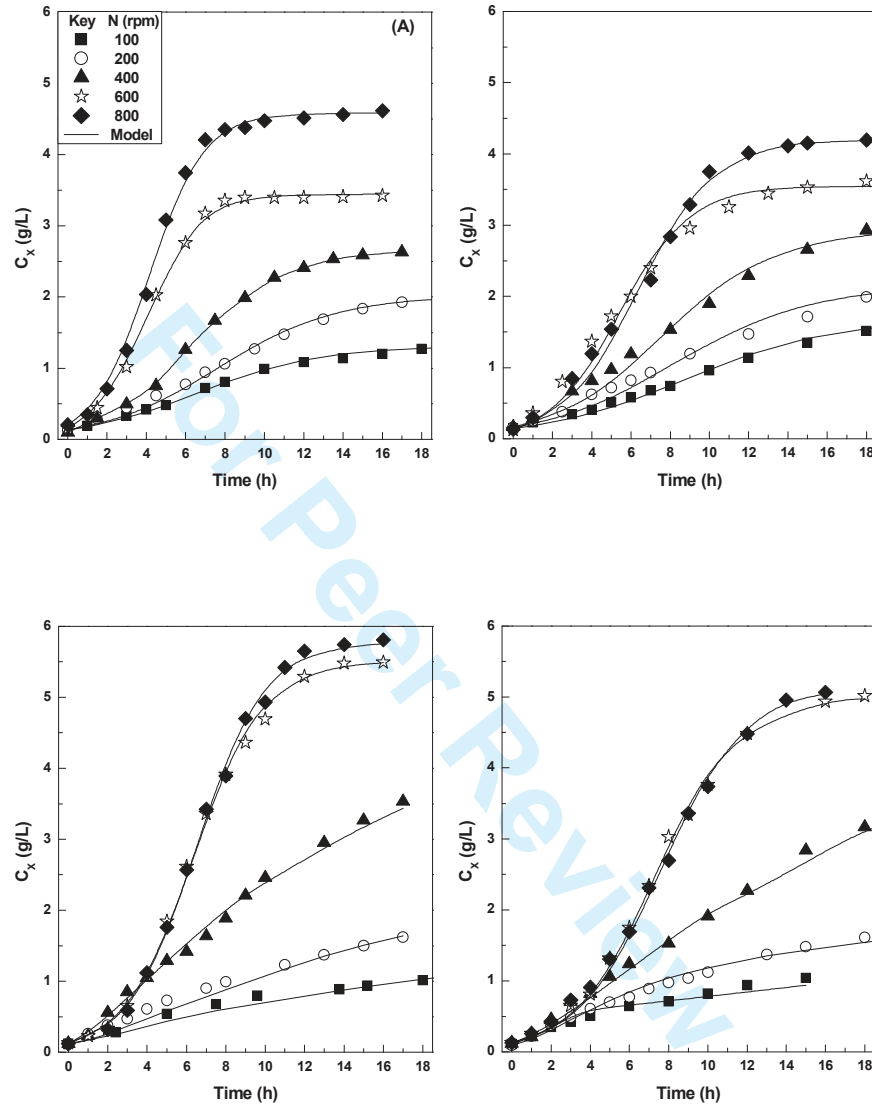


Figure 1. Evolution with time of the biomass concentration and kinetic model simulations of Eqs. (8) and (9) at different agitation conditions for the four *P. putida* strains tested: (A) KT2440, (B) KT2442, (C) KTH2 and (D) KTH2 peSOX3.

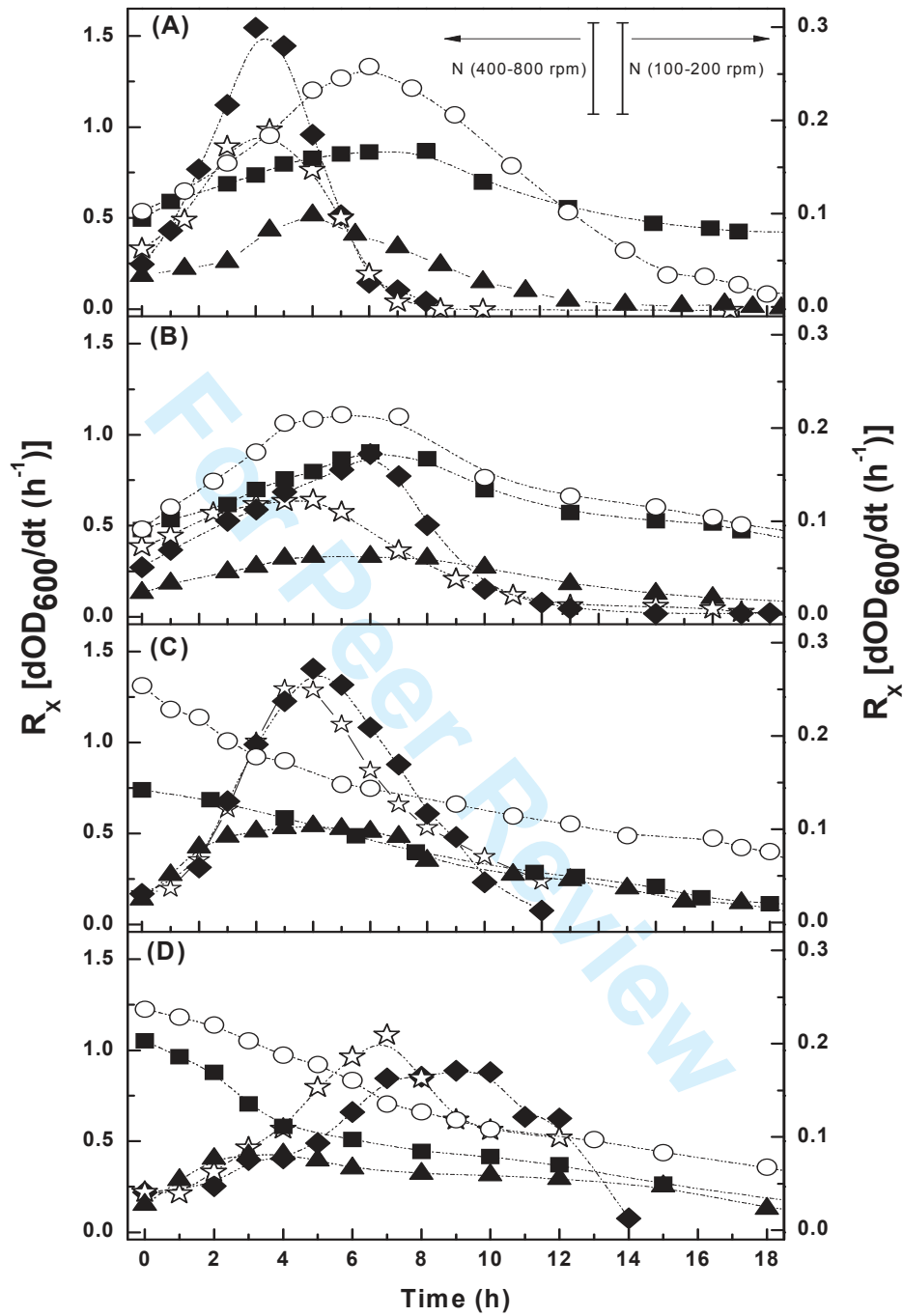


Figure 2. Evolution of OD_{600} derivative with time at different agitation conditions for the four *P. putida* strains tested: (A) KT2440, (B) KT2442, (C) KTH2 and (D) KTH2 peSOX3.

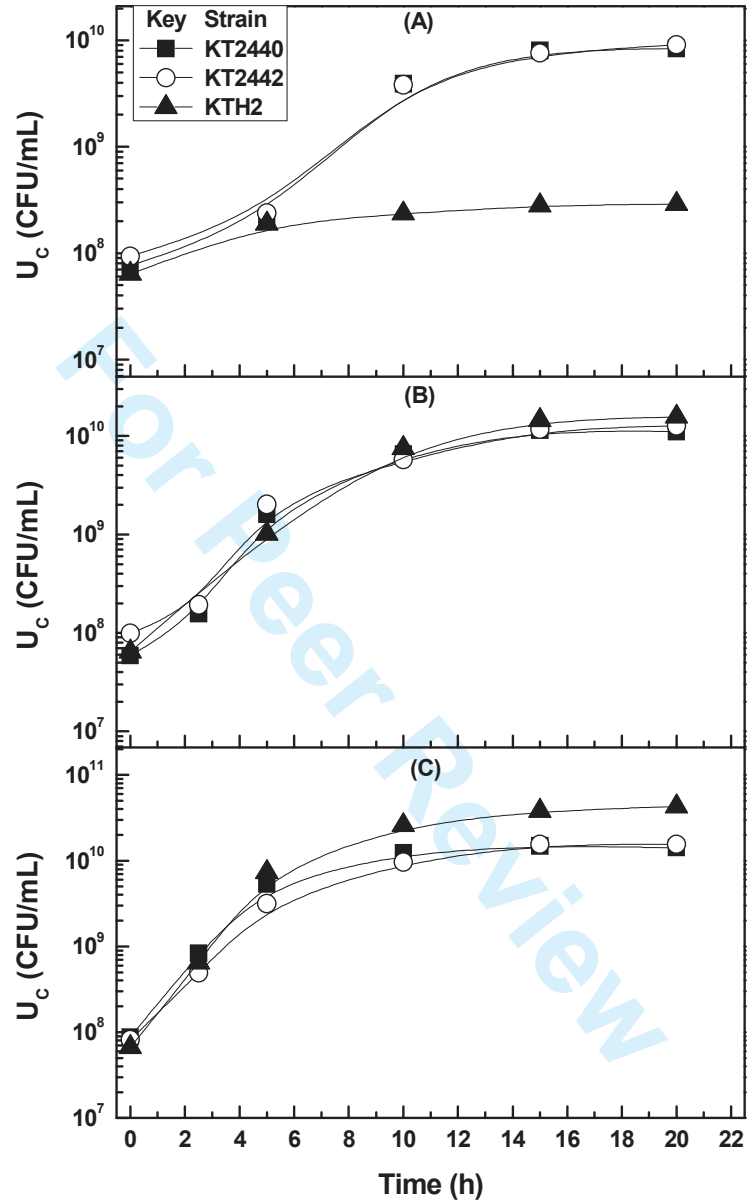


Figure 3. Evolution with time of viable colonies concentration (U_c) for *P. putida* strains at different agitation conditions: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm and (C) 600 rpm.

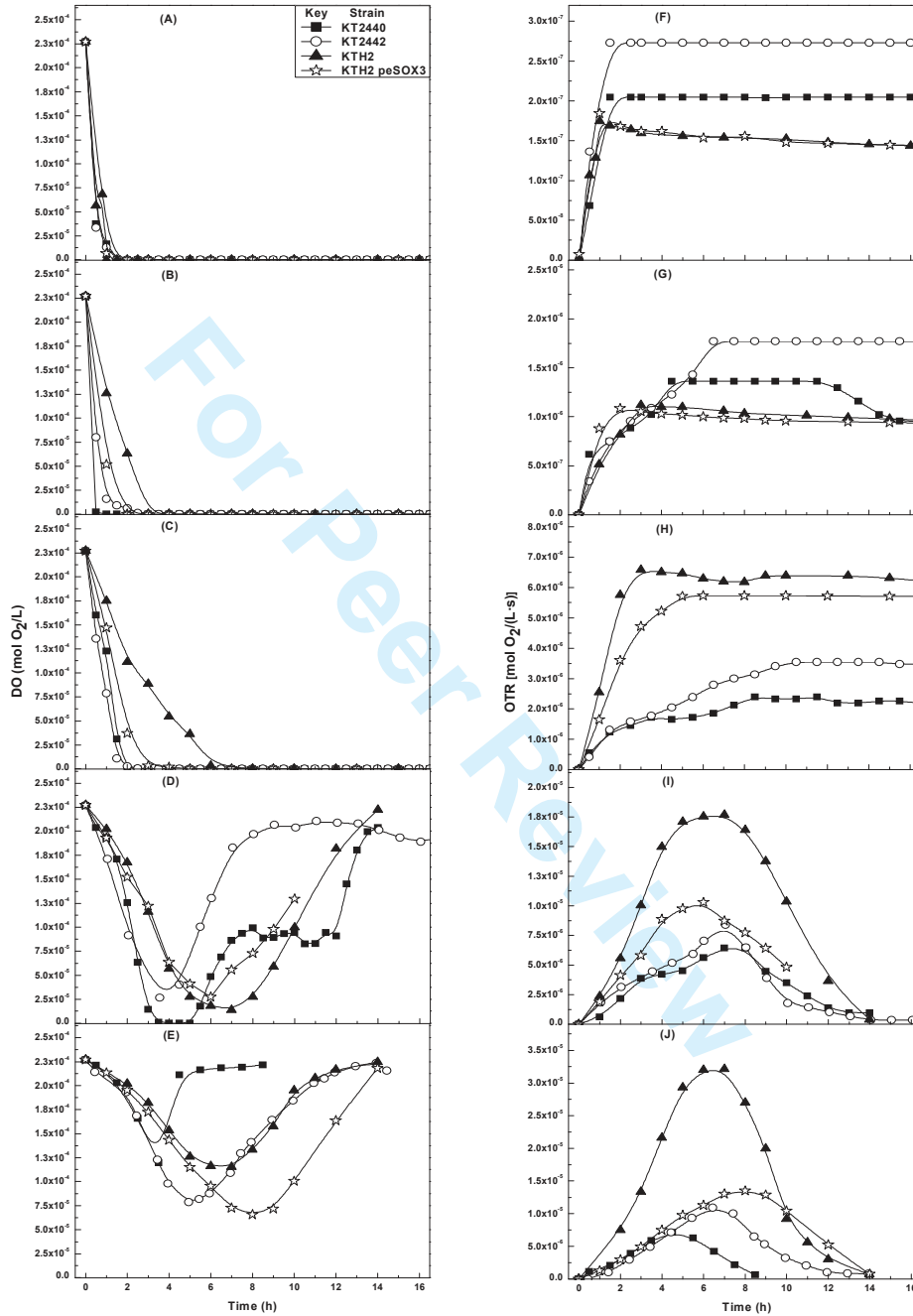
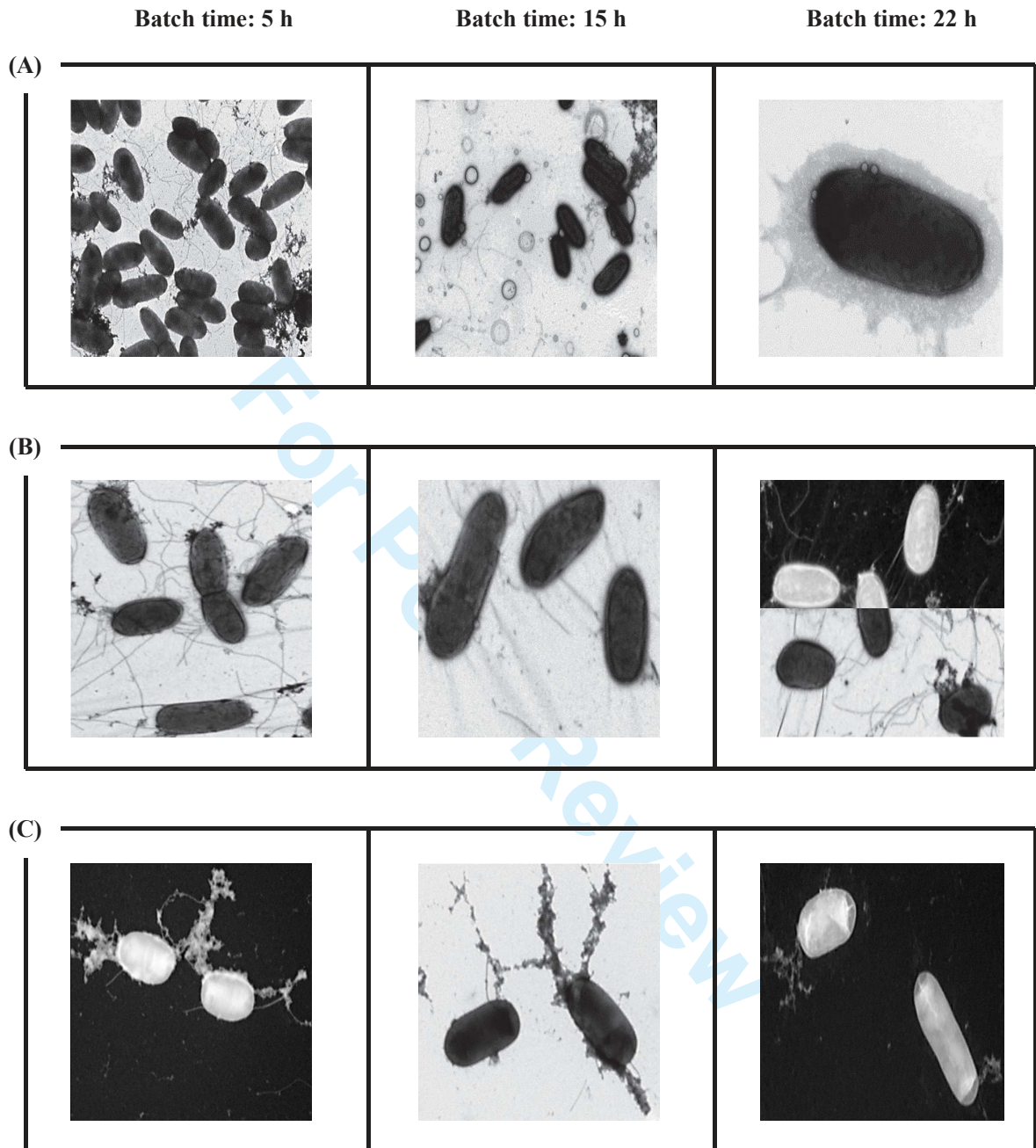


Figure 4. Time of course of dissolved oxygen (DO) concentration and oxygen transfer rate (OTR) under several agitation conditions for the *P. putida* strains tested. For DO: (A) 100 rpm,



(B) 200 rpm, (C) 400 rpm, (D) 600 rpm and (E) 800 rpm. For OTR: (F) 100 rpm, (G) 200 rpm,

(H) 400 rpm, (I) 600 rpm and (J) 800 rpm.

Figure 5. TEM images of *P. putida* KTH2 cells in batch cultures carried out at the following stirrer speeds: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm and (C) 600 rpm.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Growth of *P. putida* strains under different oxygen supply level
Different behavior of wild type and GMO strains
Vesicle formation

For Peer Review

