



Producción de ácido propiónico por *Propionibacterium acidipropionici* en un BIOSTAT® A



#09

Nota de la
aplicación

#10

#11

#12

#13

Carlos H Luna-Flores, Lars Nielsen
y Esteban Marcellin*

Australian Institute for Bioengineering and
Nanotechnology (AIBN), The University of
Queensland, Brisbane, Qld 4072, Australia

* Autor para correspondencia
Dr. Esteban Marcellin, Australian Institute
for Bioengineering and Nanotechnology,
The University of Queensland,
Brisbane, QLD 4072, Australia.
Teléfono: +61 7 334 64298,
Fax: +61 7 3346 3973,
Correo electrónico: e.marcellin@uq.edu.au

Introducción

El ácido propiónico (AP), derivado tradicionalmente de combustibles fósiles, es muy utilizado en las industrias alimentaria y farmacéutica. El AP se utiliza como conservante y, cada vez más, en la síntesis de monómeros. Recientemente, el mercado del AP ha crecido, con un incremento anual constante del 3 %, hasta superar las 410 000 toneladas por año. Las crecientes preocupaciones ambientales han animado a los usuarios finales a buscar alternativas sostenibles para obtener AP, lo que ha abierto un nicho de mercado para la producción biológica de AP (Liu et al., 2012). La bio-producción de AP responde a muchas de las preocupaciones ambientales y ofrece una alternativa sustentable para la producción de sustancias químicas C3 como el propileno, el propanol y el propionato de vinilo. El *Propionibacterium acidipropionici* (*P. acidipropionici*) es una bacteria en forma de vara, gram-positiva y anaeróbica que produce naturalmente AP como principal producto en el ciclo fermentativo de Wood-Werckman (Liu et al., 2012; Parizzi et al., 2012). De forma nativa, el AP se produce junto con otros ácidos orgánicos como el lactato, el succinato y el acetato.

La fermentación anaeróbica de *P. acidipropionici* es sensible a las condiciones ambientales, fisicoquímicas e hidrodinámicas, incluidas la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y el stress por agitación. Estas condiciones se deben controlar rigurosamente durante la fermentación. El *P. acidipropionici* utiliza una compleja mezcla de nutrientes para producir el AP en condiciones óptimas. Esto genera un metabolismo dinámico en las distintas fases de crecimiento. En este estudio demostramos la robustez del BIOSTAT® A para fermentar *P. acidipropionici*. El equipo fue capaz de controlar el pH satisfactoriamente a pesar de la gran producción de AP. Los parámetros de control del pH se tuvieron que ajustar para conseguir un control adecuado del mismo. Para asegurar la condición anaerobia del proceso se añadió constantemente nitrógeno al reactor. La temperatura se controló con la manta calefactora que cubre el vaso y el enfriador que proveía agua de recirculación. El enfriador ayudó también a controlar la evaporación, enfriando los gases de escape. Las condiciones hidrodinámicas se mantuvieron utilizando dos impulsores Rushton.

1. Material y métodos

1.1 Bacterias y medios

P. acidipropionici ATCC 55737 fue seleccionado de una colección de 17 cepas (Stowers, Cox, & Rodriguez, 2014). La cepa se conservó a -80 °C con glicerol (20 %) como crioprotector. El medio de cultivo (PAM) se componía de (g/L): extracto de levadura (10), tripticasa de soja (5), K₂HPO₄ (0,05), MnSO₄ (0,05) y glucosa (75). Los componentes del medio y la fuente de carbono se esterilizaron por separado durante 20 min a 121 °C.

1.2 Cultivo

Los cultivos madre de glicerol se resuspendieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL que contenían 1 mL de medio PAM inoculado con 0,8 % (% v) de la solución madre de glicerol. Este cultivo se incubó durante 24 horas a 32 °C. Luego se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL que contenía 14 mL de medio PAM y se dejó crecer durante otras 24 horas. Un 5 % (% v) de este cultivo se utilizó para inocular botellas de suero de 250 mL que contenían 100 mL de medio PAM y se incubaron durante otras 24 horas. Las células de las botellas de suero en fase exponencial media se utilizaron para inocular el fermentador a una DO_{600nm} inicial de 0,3. El proceso se realizó con un fermentador BIOSTAT® A de 1 L. El fermentador estaba equipado con sondas y sensores standards que permitieron medir y controlar el pH, el oxígeno disuelto, la temperatura y la agitación. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 300 rpm. El pH se controló a 6,4 con una solución 10 M de NaOH. La temperatura del cultivo se mantuvo a 32 °C con una manta calefactora eléctrica y un enfriador con agua de recirculación. El condensador de gases de escape se mantuvo al 20 % para evitar evaporación del medio. Antes de la inoculación, se introdujo N₂ en el fermentador durante al menos 15 minutos. Se mantuvo un flujo de N₂ constante durante toda la fermentación a un caudal de 300 ccm con un factor de corrección para el controlador de flujo másico del 0,992.

1.3. Métodos analíticos

La densidad óptica del cultivo se midió a 600 nm con un espectrómetro Biochrom Libra S12 UV/Vis. Los ácidos orgánicos y carbohidratos se cuantificaron mediante cromatografía iónica de exclusión con un sistema HPLC Agilent 1200 y una columna Agilent Hplex H (300 × 7,7 mm, PL1170-6830) con precolumna (SecurityGuard Carbo-H, Phenomenex PN: AJO-4490). Los azúcares se monitorearon con un detector de índice de refracción (Agilent RID, G1362A) ajustado en polaridad positiva y una unidad óptica de temperatura a 40 °C, mientras que los ácidos orgánicos se monitorearon a 210 nm (Agilent MWD, G1365B). Se inyectaron 30 µL de la muestra en la columna con un inyector automático (Agilent HiP-ALS, G1367B) y se mantuvo la temperatura de la misma a 65 °C [70 °C] con un termostato externo (Agilent TCC, G1316A). Los analitos se eluyeron isocráticamente con 4 mM H₂SO₄ a 0,6 mL/min durante 26 min. Los cromatogramas se integraron con ChemStation (Rev B.03.02[341]).

2. Resultados

El *P. acidipropionici* produce ácidos orgánicos que generan fuertes cambios de pH que se debe controlar. En la Figura 1 se muestran los parámetros de control en el biorreactor BIOSTAT® A. Como se ilustra, el pH se mantuvo constante mediante la adición de la cantidad necesaria de base (10 M de NaOH) con la bomba peristáltica integrada. Los parámetros de control PID se ajustaron en P: 300 %, I: 0 % y D: 0 %. Se suministró continuamente N₂ para mantener el entorno anaeróbico en el fermentador. La temperatura y agitación también se controlaron y monitorearon continuamente.

En la Figura 2 se muestran los perfiles de la cinética del crecimiento de *P. acidipropionici*. El AP fue el principal producto de fermentación, junto con cantidades menores de ácido acético y ácido succínico. Como puede observarse en la figura, el crecimiento se detuvo a las 40 h. Sin embargo, la producción de AP continuó hasta el final de la fermentación, lo que resultó en un incremento en la adición de NaOH hasta la 96.^a hora.

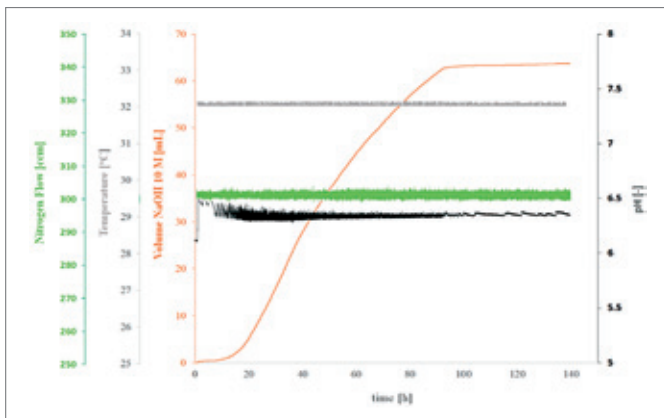
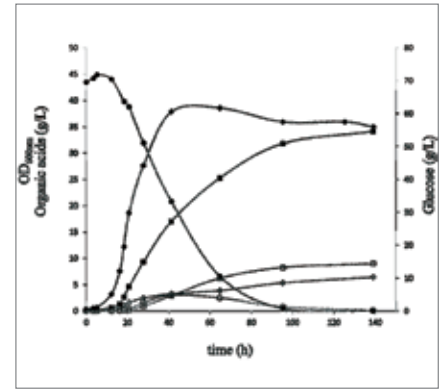


Figura 1: Parámetros de control del BIOPHAT® A durante la fermentación de *P. acidipropionici*. Se muestra el flujo de nitrógeno, la temperatura, el pH y el volumen de la solución NaOH 10 M.



(a)



(b)

Figura 2: Cinética del crecimiento de *P. acidipropionici* en un BIOPHAT® A.

(a) Equipo BIOPHAT® A.

(b) Cinética del crecimiento y la producción.

Densidad óptica: línea negra y ◆;

Ácido propiónico: línea negra y ■;

Glucosa: línea negra y ●;

Ácido succínico: línea gris y □;

Ácido acético: línea gris y ◇;

Piruvato: línea gris y ○.

3. Conclusión

La fermentación de *P. acidipropionici* para la producción de AP se puede realizar en un BIOPHAT® A. El parámetro más importante a controlar fue el pH, que se controló cambiando el PID. En conclusión, el BIOPHAT® A se puede utilizar exitosamente para fermentar microorganismos anaeróbicos como *P. acidipropionici* y obtener una producción de más de 30 g/L de ácido propiónico.

Bibliografía

- Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G., & Chen, J. (2012). Microbial production of propionic acid from propionibacteria: current state, challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 374–81. doi:10.3109/07388551.2011.651428
- Parizzi, L. P., Grassi, M. C. B., Llerena, L. a, Carazzolle, M. F., Queiroz, V. L., Lunardi, I., ... Pereira, G. a G. (2012). The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC Genomics*, 13, 562. doi:10.1186/1471-2164-13-562
- Stowers, C. C., Cox, B. M., & Rodriguez, B. a. (2014). Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(5), 837–52. doi:10.1007/s10295-014-1423-6

Sales and Service Contacts

For further contacts, visit www.sartorius-stedim.com

Europe

Germany

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen

Phone +49.551.308.0
Fax +49.551.308.3289

Sartorius Stedim Systems GmbH
Robert-Bosch-Strasse 5 – 7
34302 Guxhagen

Phone +49.5665.407.0
Fax +49.5665.407.2200

France

Sartorius Stedim FMT S.A.S.
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 91051
13781 Aubagne Cedex

Phone +33.442.845600
Fax +33.442.845619

Sartorius Stedim France SAS
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 71058
13781 Aubagne Cedex

Phone +33.442.845600
Fax +33.442.846545

Austria

Sartorius Stedim Austria GmbH
Modcenterstrasse 22
1030 Vienna

Phone +43.1.7965763.18
Fax +43.1.796576344

Belgium

Sartorius Stedim Belgium N.V.
Rue Colonel Bourg 105
1030 Bruxelles

Phone +32.2.756.06.80
Fax +32.2.756.06.81

Hungary

Sartorius Stedim Hungária Kft.
Kagyló u. 5
2092 Budakeszi

Phone +36.23.457.227
Fax +36.23.457.147

Italy

Sartorius Stedim Italy S.p.A.
Via dell'Antella, 76/A
50012 Antella-Bagno a Ripoli (FI)

Phone +39.055.63.40.41
Fax +39.055.63.40.526

Netherlands

Sartorius Stedim Netherlands B.V.

Phone +31.30.60.25.080
Fax +31.30.60.25.099

filtratie.nederland@sartorius-stedim.com

Poland

Sartorius Stedim Poland Sp. z o.o.
ul. Wrzesinska 70
62-025 Kostrzyn

Phone +48.61.647.38.40
Fax +48.61.879.25.04

Russian Federation

LLC "Sartorius Stedim RUS"
Uralskaya str. 4, Lit. B
199155 St. Petersburg

Phone +7.812.327.53.27
Fax +7.812.327.53.23

Spain

Sartorius Stedim Spain, S.A.U.
Avda. de la Industria, 32
Edificio PAYMA
28108 Alcobendas (Madrid)

Phone +34.913.586.098
Fax +34.913.589.623

Switzerland

Sartorius Stedim Switzerland AG
Ringstrasse 24 a
8317 Tagelswangen

Phone +41.52.354.36.36
Fax +41.52.354.36.46

U.K.

Sartorius Stedim UK Ltd.
Longmead Business Centre
Blenheim Road, Epsom
Surrey KT19 9 QQ

Phone +44.1372.737159
Fax +44.1372.726171

Ukraine

LLS "Sartorius RUS"
Post Box 440 "B"
01001 Kiev, Ukraine

Phone +380.44.411.4918
Fax +380.50.623.3162

Americas

USA

Sartorius Stedim North America Inc.
5 Orville Drive, Suite 200
Bohemia, NY 11716

Toll-Free +1.800.368.7178
Fax +1.631.254.4253

Argentina

Sartorius Argentina S.A.
Int. A. Ávalos 4251
B1605ECS Munro
Buenos Aires

Phone +54.11.4721.0505
Fax +54.11.4762.2333

Brazil

Sartorius do Brasil Ltda
Avenida Senador Vergueiro 2962
São Bernardo do Campo
CEP 09600-000 - SP- Brasil

Phone +55.11.4362.8900
Fax +55.11.4362.8901

Mexico

Sartorius de México, S.A. de C.V.
Libramiento Norte de Tepotzotlan s/n,
Colonia Barrio Tlacateco,
Municipio de Tepotzotlan,
Estado de México,
C.P. 54605

Phone +52.55.5562.1102
Fax +52.55.5562.2942

leadsmex@sartorius.com

Peru

Sartorius Peru S.A.C.
Av. Emilio Cavenecia 264 San Isidro
15073 Lima, Perú

Phone +51.1.441 0158
Fax +51.1.422 6100

Asia | Pacific

Australia

Sartorius Stedim Australia Pty. Ltd.
Unit 5, 7-11 Rodeo Drive
Dandenong South Vic 3175

Phone +61.3.8762.1800
Fax +61.3.8762.1828

China

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
No. 33 Yu'an Road
Airport Industrial Park Zone B
Shunyi District, Beijing 101300

Phone +86.10.80426516
Fax +86.10.80426580

Sartorius Stedim (Shanghai)
Trading Co., Ltd.
3rd Floor, North Wing, Tower 1
No. 4560 Jinke Road
Zhangjiang Hi-Tech Park
Pudong District
Shanghai 201210, P.R. China

Phone +86.21.6878.2300
Fax +86.21.6878.2882

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
Guangzhou Representative Office
Unit K, Building 23
Huihua Commerce & Trade Building
No. 80 Xianlie Middle Road
Guangzhou 510070

Phone +86.20.37618687 | 37618651
Fax +86.20.37619051

India

Sartorius Stedim India Pvt. Ltd.
#69/2-69/3, NH 48, Jakkasandra
Nelamangala Tq
562 123 Bangalore, India

Phone +91.80.4350.5250
Fax +91.80.4350.5253

Japan

Sartorius Stedim Japan K.K.
4th Fl., Daiwa Shinagawa North Bldg.
8-11, Kita-Shinagawa 1-chome
Shinagawa-ku, Tokyo, 140-0001 Japan

Phone +81.3.4331.4300
Fax +81.3.4331.4301

Malaysia

Sartorius Stedim Malaysia Sdn. Bhd.
Lot L3-E-3B, Enterprise 4
Technology Park Malaysia
Bukit Jalil
57000 Kuala Lumpur, Malaysia

Phone +60.3.8996.0622
Fax +60.3.8996.0755

Singapore

Sartorius Stedim Singapore Pte. Ltd.
1 Science Park Road,
The Capricorn, #05-08A,
Singapore Science Park II
Singapore 117528

Phone +65.6872.3966
Fax +65.6778.2494

South Korea

Sartorius Korea Biotech Co., Ltd.
8th Floor, Solid Space B/D,
PanGyoYeok-Ro 220, BunDang-Gu
SeongNam-Si, GyeongGi-Do, 463-400

Phone +82.31.622.5700
Fax +82.31.622.5799



▶ www.sartorius-stedim.com