

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



***BIOTRANSFORMACIÓN DE CETONAS CÍCLICAS  
EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS EN UN BIORREACTOR DE  
PARTICIÓN***

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.B.I. DANIEL TORRES MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. GERMÁN AROCA ARCAYA

ASESOR

DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

México, D.F., Octubre del 2010

México D.F., Octubre del 2010

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

***BIOTRANSFORMACIÓN DE CETONAS CÍCLICAS EMPLEANDO  
LÍQUIDOS IÓNICOS EN UN BIORREACTOR DE PARTICIÓN***

Que presentó

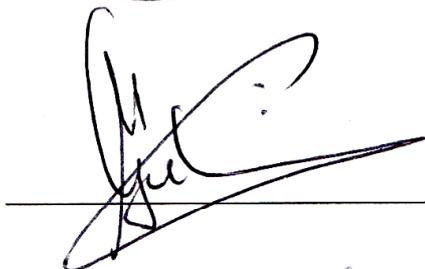
Daniel Torres Martínez

Director de la tesis: Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

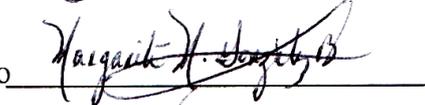


JURADO

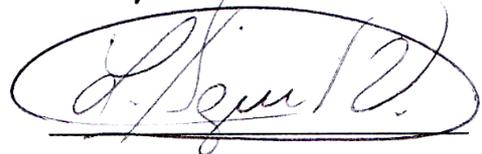
Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Secretario: Dra. Margarita Mercedes González Brambila  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco



Vocal: Dr. Luciano Aguilera Vázquez  
Dirección General de Educación Superior Tecnológica



Vocal: Dr. Sergio Alejandro Medina Moreno  
Universidad Politécnica de Pachuca



## RESUMEN

Se estudió la biocompatibilidad de dos líquidos iónicos, sobre la cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239, la cual expresa la enzima recombinante ciclohexanona monooxigenasa. Se utilizaron dos líquidos iónicos: (Trioctilmetilamonio bis[(trifluorometil)sulfonil] imida [OMA][BTA] y Butilmetilpirrolidinium bis[(trifluorometil)sulfonil]imida) [MeBuPyrr][BTA]. Se encontró que el líquido iónico [OMA][BTA] resultó ser significativamente más biocompatible que el [MeBuPyrr][BTA]. Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica (coeficiente de partición, viscosidad, tensión interfacial) de los líquidos iónicos utilizados.

También, se realizaron estudios de hidrodinámica del sistema trifásico. En estos estudios de hidrodinámica se obtuvieron dos correlaciones matemáticas para expresar el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) y el diámetro promedio de gota *Sauter* ( $d_{32}$ ) en función de las variables de operación (agitación, aireación y fracción de fase dispersa).

Se desarrolló un modelo cinético de reacción para el biocatalizador *E. coli* TOP10 pQR239, este modelo permite predecir la tasa de biotransformación Baeyer-Villiger de la cetona bicíclica ( $\pm$ )-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona. La productividad de la biotransformación se favoreció con la adición de una segunda fase (líquido iónico [OMA][BTA]) empleando un biorreactor de partición de tres fases (acuosa-líquido iónico-aire).

Finalmente se desarrolló un modelo matemático que considera la transferencia de masa, hidrodinámica y la cinética de biotransformación. Este modelo fue capaz de predecir y describir el proceso de biotransformación. Se observó una buena concordancia entre valores calculados y datos experimentales obtenidos en un biorreactor de partición operado en lote.

## ABSTRACT

Ionic liquids biocompatibility on the strain *Escherichia coli* TOP10 pQR239, which expresses the recombinant enzyme cyclohexanone monooxygenase, was studied. Two ionic liquids (Trioctylmetilamonium bis [(trifluoromethyl) sulfonyl] imide, [OMA] [BTA] and Butylmetilpirrolidinium bis [(trifluoromethyl) sulfonyl] imide), [MeBuPyrr] [BTA], were used. [OMA] [BTA] was found to be significantly more biocompatible than [MeBuPyrr] [BTA]. The physicochemical characterization (partition coefficient, viscosity, interfacial tension) of ionic liquids used were carried out.

Hydrodynamic of three-phase system for both ionic liquids was studied. In these studies two mathematical correlation were obtained to express the oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) and the *Sauter* mean drop diameter ( $d_{32}$ ) in terms of operating variables (agitation, aeration and dispersed phase fraction).

A reaction kinetic model for the biocatalyst *E. coli* TOP10 pQR239 was developed, this mathematical model predicts Baeyer-Villiger biotrasformation rate of bicyclic ketone ( $\pm$ )-cis-bicyclo [3.2.0] hept-2-en-6-one. The biotransformation productivity was increased by addition of a second phase (ionic liquid [OMA] [BTA]) using a partitioning bioreactor of three phases (aqueous-ionic liquid-air).

Finally, a mathematical model considering mass transfer, hydrodynamic and the biotransformation kinetic was developed. This model was able to predict and describe the biotransformation process. Good agreement between calculated values and experimental data obtained from a batch partitioning bioreactor was observed.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación Sólida del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Este trabajo fue dirigido por el Dr. Sergio Huerta Ochoa del Departamento de Biotecnología de la UAM-I y por el Dr. Germán Aroca Arcaya de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Con el apoyo del proyecto SEP-CONACYT 2007-80847. Agradezco al CONACYT por la beca de doctorado otorgada.

Una parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Tratamiento de Emisiones Gaseosas de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Con el apoyo económico de la Red Alfa BIOPROAM. No. AML/190901/06/1814/II-0548-FC-FA.

Al Dr. Mariano Gutiérrez por su valiosa aportación en la estructura y desarrollo de la tesis.

Para la Dra. Margarita González, el Dr. Sergio Alejandro Medina, el Dr. Luciano Aguilera y el Dr. Mariano Gutiérrez les expreso un sincero agradecimiento por la revisión de la tesis, por sus comentarios, correcciones y sugerencias.

A Sergio por ser más que mi profesor mi amigo. Al Dr. Ernesto, Dra. Arely y al Dr. Gerardo por su sincera amistad y por participar siempre con sus comentarios y valiosas sugerencias en la tesis. Agradezco a todos mis buenos amigos de la PP4.

A mis hermanos de Chile Caleb, Ricardo, a la familia Silva y a mis amigos de la PUCV.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A Dios por todas sus bendiciones y por su gran amor desde antes de la fundación del mundo.

## **DEDICATORIAS**

**A mi madre por estar siempre a mi lado.**

**A mi Pastor Nicolás Ruiz Bedolla por darme todo el consejo de Dios.**

## CONTENIDO GENERAL

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIAS .....	vi
CONTENIDO GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
I.-INTRODUCCIÓN .....	16
I.1 Reactores de partición de tres fases.....	16
I.1.1Partición de sustratos y productos en un biorreactor de partición tres fases ....	16
I.1.2 Consideraciones para la selección del líquido iónico .....	18
I.1.3 Aplicaciones de los biorreactores de partición.....	20
I.2 Características de los líquidos iónicos.....	21
I.2.1 El uso de los líquidos iónicos en biocatálisis .....	23
I.2.2 Biocompatibilidad de los líquidos iónicos .....	24
I.3 Hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores de partición tipo tanque agitado.....	25
I.3.1 Área interfacial y distribución de tamaño de gotas en sistemas multifásicos ...	26
I.3.2 Transferencia de oxígeno en biorreactores de partición .....	28
I.3.3 Determinación de coeficientes de transferencia de masa mediante el uso de la Celda de Lewis modificada .....	29
I.4 Modelamiento en biorreactores de partición.....	30
I.4.2 Características del biocatalizador empleado en el sistema .....	31
II.- HIPÓTESIS .....	34
III.- OBJETIVO .....	36
III.1 Objetivos particulares: .....	36
IV.-MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
ESTATEGIA EXPERIMENTAL .....	38
IV.1 Reactivos y materiales.....	40

IV.1.1	Reactivos .....	40
IV.1.2	Gases utilizados .....	40
IV.1.3	Líquidos iónicos estudiados.....	41
IV.1.4	Descripción del biorreactor de 1 y 3 L tipo tanque agitado .....	41
IV.2	Producción del biocatalizador <i>E. coli</i> TOP10 pQR239.....	42
IV.2.1	Diseño de medio de cultivo y cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> TOP10 pQR239 .....	43
IV.2.2	Mantenimiento y conservación de <i>E. coli</i> TOP10 pQR239 .....	45
IV.3	Análisis de cetonas y lactonas por Cromatografía de Gases .....	45
IV.4	Biotransformación de cetonas a lactonas en medio acuoso .....	46
IV.4.1	Condiciones de cultivo .....	46
IV.4.2	Cinética de biotransformación en medio acuoso.....	46
IV.5	Método para determinar la viabilidad de <i>E. coli</i> en presencia de líquido iónico ..	48
IV.6	Biotransformación de cetonas a lactonas en un biorreactor de partición tipo tanque agitado.....	49
IV.6.1	Producción del biocatalizador en un biorreactor de 3L.....	49
IV.6.2	Biotransformación de cetonas a lactonas en un biorreactor de partición de 1L .....	50
IV.7	Medición de propiedades fisicoquímicas del sistema bifásico.....	51
IV.7.1	Medición de la solubilidad de los líquidos iónicos [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA] en agua .....	51
IV.7.2	Medición del coeficiente de partición de sustrato y producto en el sistema bifásico agua-líquido iónico .....	51
IV.7.3	Medición de la viscosidad de los líquidos iónicos empleados, anhidros y saturados con agua. ....	52
IV.7.4	Medición de la tensión interfacial de los líquidos iónicos [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA], por el método del anillo .....	52
IV.8	Hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores de partición.....	53

IV.8.1 Medición del consumo de potencia aireada por el método eléctrico .....	53
IV.8.2 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ) por el método dinámico .....	54
IV.8.3 Determinación del coeficiente de transferencia de masa de cetonas y lactonas ( $k_{LS}$ y $k_{LP}$ ) mediante la celda de Lewis modificada.....	54
IV.8.4 Medición del diámetro promedio de gota <i>Sauter</i> $d_{32}$ .....	55
IV.8.5 Diseño experimental de superficie de respuesta .....	56
IV.9 Planteamiento de un modelo matemático .....	57
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>59</b>
V.1 Biocompatibilidad de los líquidos iónicos con <i>E. coli</i> TOP10pQR239.....	59
V.2 Propiedades físico-químicas de los líquidos iónicos empleados: [OMA][BTA] y [MeBuPyrr] [BTA] .....	60
V.3 Hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores de partición .....	62
V.3.1 Potencia consumida, Número de Reynolds, y Número de Weber para sistemas multifásicos.....	63
V.3.2 Efecto de las variables de operación sobre el diámetro <i>Sauter</i> $d_{32}$ para [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA].....	65
V.3.3 Efecto de las variables de operación sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ) .....	70
V.3.4 Medición de los coeficientes de transferencia de masa en la celda de Lewis Modificada.....	75
V.4 Modelado de la cinética de biotransformación tipo Baeyer-Villiger .....	79
V.5 Biotransformación tipo Baeyer-Villiger en un biorreactor de partición de tres fases utilizando [OMA][BTA].....	83
V.6 El modelo matemático .....	86
V.6.1 Suposiciones para el desarrollo del modelo.....	88
V.6.2 Balance de sustrato en la fase acuosa.....	88

V.6.3 Balance de sustrato en la fase líquido iónico .....	90
V.6.4 Balance de producto en la fase acuosa.....	91
V.6.5 Balance de producto en la fase líquido iónico .....	91
V.6.6 Balance de oxígeno en la fase acuosa. ....	92
V.6.7 Estabilidad del biocatalizador .....	93
V.6.8 Análisis adimensional del modelo de biotransformación de cetonas cíclicas en un biorreactor de partición.....	94
V.6.9 Predicciones del modelo para la biotransformación en un biorreactor de partición.....	98
V.10 Análisis de sensibilidad paramétrica. ....	104
VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	107
VI.1 Conclusiones .....	107
VI.2 Recomendaciones .....	109
VII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
VIII. ANEXOS .....	120
Anexo 1. Técnicas analíticas .....	120
Anexo 2. Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en matraces y formulación del medio de cultivo .....	122
Anexo 3. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> TOP10 pQR239 .....	124
Anexo 4. Cálculo de los coeficientes de difusividad .....	126
Anexo 6. Productos de la tesis.....	133
6.1 Congresos .....	133
6.2 Artículo.....	134

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 Estrategia para la selección del líquido iónico para su uso como reservorio de sustrato y solvente de extracción del producto <i>in situ</i> en biocatálisis con células completas (tomado de Pfruender <i>et al.</i> , 2006)	19
Figura I.2 Estructuras típicas de los líquidos iónicos más utilizados para catálisis (modificado de Yang y Pan 2005)	22
Figura I.3 Ejemplos de reacciones enzimáticas realizadas en líquidos iónicos (tomado de van Rantwijk <i>et al.</i> , 2003)	23
Figura I.4 Esquema general de las oxidaciones de cetonas cíclicas y sulfuros orgánicos catalizadas por las monooxigenasas Baeyer-Villiger (tomado de Alphanth <i>et al.</i> , 2003)	32
Figura IV.1 Estrategia experimental global seguida durante toda la tesis	39
Figura IV.2 Estructura de los líquidos iónicos estudiados a) bistrifluorometil sulfonil imida trioctilmetil amonio, [OMA][BTA]; b) bistrifluorometil sulfonil imida butilmetilpirrolidinio, [MeBuPyrr][BTA]	41
Figura IV.3 Estrategia de producción y uso del biocatalizador en la biotransformación	42
Figura IV.4 Esquema de la biotransformación Baeyer-Villiger catalizada por la enzima ciclohexanona monooxigenasa (EC. 1.14.13.22) en la oxidación de ( $\pm$ )-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona produciendo (1S, 5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona y (1R, 5S)-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-en-2-ona.	47
Figura IV.5 Biorreactor utilizado para la biotransformación con control de temperatura, agitación y medición de oxígeno disuelto.	47
Figura IV.6 Tensiómetro de Fisher	53
Figura IV.7 Medidor de Reflectancia Óptica (3D ORM) analizador de partículas (MTS, Messtechnic Schwartz)	56
Figura V.1 Viabilidad de <i>E. coli</i> en diferentes líquidos iónicos	60
Figura V.2 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de $d_{32}$ para [OMA][BTA]	66
Figura V.3 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de $d_{32}$ para [MeBuPyrr][BTA]	67
Figura V.4 Tamaño de gota $d_{32}$ , gráfica de paridad de los valores experimentales & valores calculados de las correlaciones usando los parámetros mostrados en la Tabla V.3 (●) [OMA][BTA] y (○) [MeBuPyrr][BTA]	69
Figura V.5 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de $k_{La}$ para [OMA][BTA]	71

Figura V.6 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de $k_{La}$ para [MeBuPyrr][BTA]	72
Figura V.7 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $k_{La}$ , gráfica de paridad de los valores experimentales & valores calculados de las correlaciones usando los parámetros mostrados en la Tabla V.4 (●) [OMA][BTA] y (○) [MeBuPyrr][BTA]	75
Figura V.8 Valores de $k_L$ experimentales para cetonas (sustrato) a 30 °C usando [OMA][BTA] 180 mL y 180 mL de fase acuosa (fosfatos 50 mM pH7 suplementado con 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol)	77
Figura V.9 Valores de $k_L$ experimentales para producto a 30 °C usando [OMA][BTA] 180 mL y 180 mL de fase acuosa (fosfatos 50 mM pH7 suplementado con 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol)	78
Figura V.10 Cinética de producción de lactonas a 2 g L <sup>-1</sup> de sustrato a 37 °C, en amortiguador de fosfatos pH 7, 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol, usando 1 gdw L <sup>-1</sup> de biocatalizador ( <i>E. coli</i> ), R <sup>2</sup> =0.975	80
Figura V.11 Oxígeno disuelto durante la biotransformación, a 2 g L <sup>-1</sup> de cetona	81
Figura V.12 Efecto de la concentración de cetona sobre la velocidad inicial de producción de lactonas a 37°C, pH 7, 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol	81
Figura V.13 Efecto de la concentración de cetona sobre la velocidad inicial de producción de lactonas (●)Valores experimentales, (— ) modelo cinético de reacción	82
Figura V.14 Velocidades iniciales de biotransformación en una y dos fases líquidas. Fase acuosa: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, con 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol. Fase dispersa [OMA][BTA]20% v/v, sustrato 1 g L <sup>-1</sup> de cetona, biocatalizador 1 gdw L <sup>-1</sup> . Biorreactor de 20 mL con agitación magnética a 30 °C	84
Figura V.15 Cinética de biotransformación en fase acuosa: sustrato 0.4 g L <sup>-1</sup> de cetona en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 suplementado con 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol a una concentración de biocatalizador de 3 gdw L <sup>-1</sup> . Biorreactor de 1L, operado a 700 rpm, 0.5 vvm y 30 °C	84
Figura V.16 Cinética de biotransformación en un sistema de dos fases líquidas (5% [OMA][BTA]): sustrato 0.55 g L <sup>-1</sup> de cetona en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 suplementado con 10 g L <sup>-1</sup> de glicerol a una concentración de biocatalizador de 5 gdw L <sup>-1</sup> . Biorreactor de 1L, operado a 700 RPM, 1 vvm y 30 °C	85
Figura V.17 Esquema de una biotransformación oxidativa en un biorreactor de partición. FLI=fase líquido iónico, FLA=fase líquida acuosa, FG=fase gaseosa (aire)	86
Figura V.18 Fenómenos de transferencia de masa en un biorreactor multifásico, X:biocatalizador	87

- Figura V.19 Medición de consumo de oxígeno por mantenimiento ( $Q_{O_2} \cdot X_0$ ) del biocatalizador previo a la biotransformación, se utilizó una concentración de biocatalizador 3 gdw L<sup>-1</sup>. Biorreactor de 1 L, operado a 700 rpm, 0.5 vvm y 30 °C en amortiguador de fosfatos pH7 50 mM** 100
- Figura V.20 Predicción del modelo en el consumo de sustrato en la fase acuosa (Sac), durante una biotransformación en un biorreactor de 1L, a 700 RPM, 1 vvm, 5% V/V [OMA][BTA], 30°C, concentración de biocatalizador 5 gdw L-1, (▲) valores experimentales, (—) predicción del modelo** 102
- Figura V.21 Predicción del modelo en la aparición de producto en la fase acuosa (Pac) durante una biotransformación en un biorreactor de 1L, a 700 RPM, 1 vvm, 5% V/V [OMA][BTA], 30°C, concentración de biocatalizador 5 gdw L-1 (▲) valores experimentales, (—) predicción del modelo** 103
- Figura V.22 Predicción del modelo en la concentración de oxígeno disuelto ( $C_{O_2}$ ) durante una biotransformación en un biorreactor de 1L, a 700 RPM, 1 vvm, 5% V/V [OMA][BTA], 30°C, concentración de biocatalizador 5 gdw L-1 (▲) valores experimentales, (—) predicción del modelo** 103

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla IV.1 Composición química del medio de cultivo para la producción del biocatalizador</b>	<b>44</b>
<b>Tabla V.1 Propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos empleados</b>	<b>61</b>
<b>Tabla V.2 Condiciones de operación y resultados obtenidos para [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA]</b>	<b>64</b>
<b>Tabla V.3 Parámetros establecidos para la correlación del <math>d_{32}</math></b>	<b>68</b>
<b>Tabla V.4 Parámetros establecidos para la correlación del <math>k_{La}</math></b>	<b>74</b>
<b>Tabla V.5 Balances de masa de sustrato, producto, oxígeno y biocatalizador</b>	<b>94</b>
<b>Tabla V.6 Variables y parámetros empleados para la adimensionalización del modelo de biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas en un biorreactor de partición</b>	<b>95</b>
<b>Tabla V.7 Sistema de ecuaciones adimensionales para el modelado de un biorreactor de partición para la biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas.</b>	<b>97</b>
<b>Tabla V.8 Parámetros experimentales en la resolución del modelo</b>	<b>99</b>
<b>Tabla V.9 Parámetros estimados mediante bibliografía para la resolución del modelo</b>	<b>101</b>
<b>Tabla V.10 Resultados del análisis de sensibilidad paramétrica</b>	<b>104</b>

## Nomenclatura

A continuación se presenta la nomenclatura más importante utilizada a lo largo de la tesis.

$A_{gota}$ : área interfacial de las gotas de líquido iónico por unidad de volumen ( $m^{-1}$ )

$\bar{a}$ : área interfacial en la Celda de Lewis modificada ( $m^{-1}$ )

$C_{O_2}$ : concentración de oxígeno en la fase acuosa ( $g L^{-1}$ )

$C_{O_2}^*$ : concentración de saturación de oxígeno en la fase acuosa ( $g L^{-1}$ )

CHMO: ciclohexanona monooxigenasa

$k_L a$ : coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $h^{-1}$ )

$k_L \bar{a}$ : coeficiente volumétrico de transferencia de sustrato o producto en la Celda de Lewis modificada

$k_{Ls}$ : coeficiente convectivo de sustrato ( $m h^{-1}$ )

$k_{Lp}$ : coeficiente convectivo de producto ( $m h^{-1}$ )

$K_{ps}$ : coeficiente de partición de sustrato (adimensional)

$K_{pp}$ : coeficiente de partición de producto (adimensional)

$K_s$ : constante de afinidad del biocatalizador al sustrato ( $g L^{-1}$ )

$K_i$ : constante de inhibición por sustrato ( $g L^{-1}$ )

$evp$ : evaporación de sustrato en el biorreactor ( $g L^{-1} h^{-1}$ )

$S_{li}$ : concentración de sustrato en la fase líquido iónico ( $g L^{-1}$ )

$S_{li0}$ : concentración inicial de sustrato en el líquido iónico ( $g L^{-1}$ )

$S_{ac}$ : concentración de sustrato en la fase acuosa ( $g L^{-1}$ )

$S_{ac0}$ : concentración inicial de sustrato en la fase acuosa ( $g L^{-1}$ )

$P_{li}$ : concentración de producto en la fase líquido iónico ( $g L^{-1}$ )

$P_{ac}$ : concentración de producto en la fase acuosa ( $\text{g L}^{-1}$ )

$V_T$ : volumen total del sistema (L)

$V_{li}$ : volumen de la fase líquido iónico (L)

$V_{ac}$ : volumen de la fase acuosa (L)

$V_{max}$ : velocidad máxima de producción de lactonas ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

$Y_{\frac{s}{p}}$ : rendimiento estequiométrico de g sustrato consumido por g de producto

$Y_{\frac{O_2}{p}}$ : rendimiento estequiométrico de g oxígeno consumido por g de producto

# **I.INTRODUCCIÓN**

## **I.-INTRODUCCIÓN**

### **I.1 Reactores de partición de tres fases**

Los biorreactores de partición se construyen por la adición de una fase líquida no acuosa (solventes orgánicos) a una fase acuosa que contiene el biocatalizador (células completas o enzimas) responsable de la biotransformación (Muñoz *et al.*, 2007). Los biorreactores de partición permiten el reparto entre dos fases no miscibles de un sustrato o producto de una biotransformación que puede ser afectada por la inhibición de alguno de ellos. Así la selección apropiada de un solvente orgánico es clave para una aplicación exitosa de estos biorreactores en la práctica industrial.

Se ha demostrado que la integración de la biotransformación y la extracción *in situ* del producto, mejoran la productividad del proceso, así como la purificación del producto (Malinowski, 2001). Sin embargo la productividad de bioconversiones oxidativas en un sistema multifásico puede ser limitada por el transporte de masa de sustrato u oxígeno (Torres-Martínez *et al.*, 2009). Las velocidades de transferencia de sustrato y oxígeno dependen de las propiedades físicas del fluido, temperatura, presión, composición del medio, condiciones de agitación, velocidad superficial del gas y de la configuración del biorreactor (Aiba *et al.*, 1973).

#### **I.1.1 Partición de sustratos y productos en un biorreactor de partición tres fases**

La extracción *in situ* (remoción) del producto inhibitorio, en el transcurso de una biotransformación puede tener un impacto positivo en el equilibrio de la reacción y disminuir

la inhibición por producto, por lo que puede hacer que el biorreactor sea mucho más eficiente (Malinowski, 2001). Las biotransformaciones utilizando células completas como biocatalizador pueden ser eficazmente usadas para la producción de compuestos enantioméricamente puros, sin embargo la productividad de estos procesos es baja debido a la toxicidad de sustratos y productos (Pfruender *et al.*, 2006). Los biorreactores de partición pueden ser aplicados para controlar la liberación de un sustrato tóxico disuelto en una fase orgánica (solvente orgánico o líquido iónico) a una fase acuosa que contiene las células. Sin embargo los solventes orgánicos convencionales usados frecuentemente, son tóxicos para las células, explosivos y dañinos para el medio ambiente. Los solventes “verdes” tales como fluidos supercríticos y líquidos iónicos son alternativas prometedoras a los solventes orgánicos (Pfruender *et al.*, 2004).

El líquido iónico [BMIM][PF<sub>6</sub>] ha sido usado efectivamente como reservorio de sustrato y para la extracción *in situ* de producto en la biotransformación de acetiltrimetilsilano (ATMS) a enantiómero (S)-1-trimetilsililetanol (1-TMSE) catalizado por células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto es posible por la biocompatibilidad de [BMIM][PF<sub>6</sub>] al biocatalizador, permitiendo elevar la actividad y estabilidad de las células inmovilizadas. Dorland (2005) definió la biocompatibilidad como la cualidad de carecer de efectos tóxicos o perjudiciales sobre los sistemas biológicos. El [BMIM][PF<sub>6</sub>] resultó ser un buen solvente para ATMS y 1-TMSE (Lou *et al.*, 2006). El uso de líquidos iónicos ([BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][BTA] y [OMA][BTA]) como reservorio de sustrato y como solvente en la extracción *in situ* durante la reducción asimétrica de varias cetonas resultó en un incremento del rendimiento químico de <50% hasta 80-90% en un proceso de operado en batch (Pfruender, *et al.*, 2006).

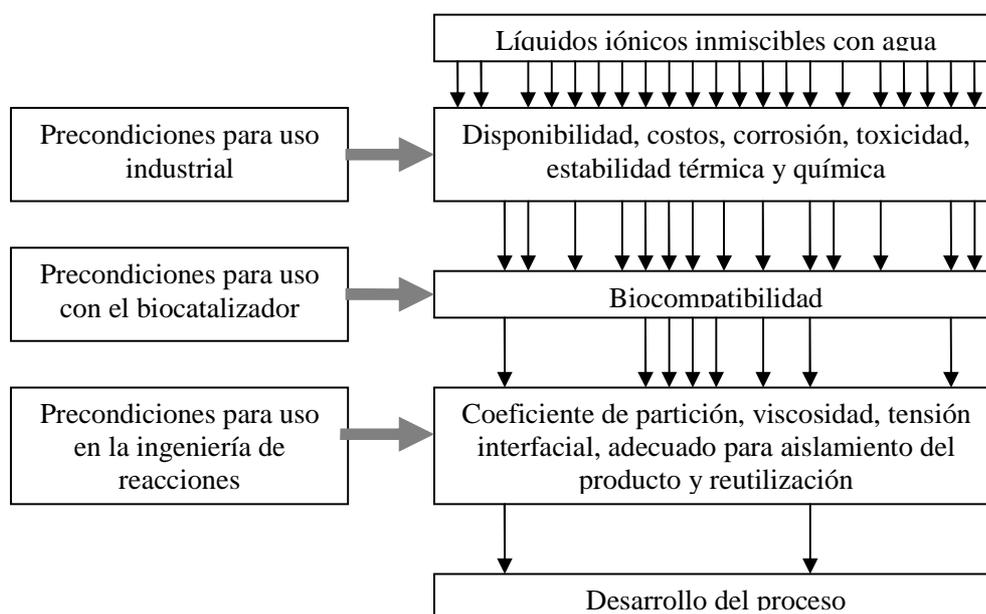
### **I.1.2 Consideraciones para la selección del líquido iónico**

Para un sistema dado de biocatalizador y sustrato/producto la adecuada selección del líquido iónico es de crucial importancia para el desarrollo de una biotransformación extractiva exitosa. La biocompatibilidad del líquido iónico es una de las características más importantes que deben ser tomadas en cuenta en la selección de la fase dispersa en biorreactores de partición (Malinowski, 2001).

Pruender *et al.* (2006) sugieren un procedimiento para la selección de líquidos iónicos para su aplicación en biotransformaciones con células completas (**Figura I.1**). Este tipo de biotransformaciones comúnmente son utilizadas para la obtención de químicos finos, donde el sustrato y/o producto son poco solubles en agua o tóxicos para las células microbianas.

Diferentes características como: disponibilidad, costos, corrosión, toxicidad, estabilidad térmica y química deben ser tomadas en cuenta para la posible aplicación del líquido iónico a nivel industrial. Sin embargo para poder ser usado en biocatálisis un líquido iónico además de las características antes mencionadas, debe ser biocompatible con el biocatalizador, ésta es una de las características más importantes que debe tener un líquido iónico.

Para evaluar la biocompatibilidad de un líquido iónico con células completas, se lleva a cabo un estudio de viabilidad de las células que hayan sido incubadas bajo las condiciones en las cuales se realiza la biotransformación en un sistema bifásico líquido iónico-fase acuosa (Pfruender *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2004; Prpich y Daugulis, 2007).



**Figura I.1 Estrategia para la selección del líquido iónico para su uso como reservorio de sustrato y solvente de extracción del producto *in situ* en biocatálisis con células completas (tomado de Pfruender *et al.*, 2006).**

Muchos intentos se han llevado a cabo para asociar la biocompatibilidad de diferentes solventes a alguna de sus propiedades fisicoquímicas. El parámetro comúnmente usado para clasificar los solventes orgánicos en términos de biocompatibilidad es la polaridad del solvente orgánico. Se ha demostrado que existe una correlación entre la biocompatibilidad y el logaritmo del coeficiente de partición del solvente en el sistema bifásico octanol agua ( $\log P_{\text{oct}}$ ); El  $\log P_{\text{oct}}$  denota hidrofobicidad lo cual no es exactamente polaridad, pero demuestra una mejor correlación con la actividad biológica (León *et al.*, 1998).

En cuanto a la extracción del producto, el líquido iónico debe ser estable térmicamente en caso de realizar la separación por destilación, o bien separar el producto mediante fluidos supercríticos como  $\text{CO}_2$ , para poder reutilizar el líquido iónico. Para su estudio en la ingeniería de reacciones el líquido iónico debe ser caracterizado en cuanto al coeficiente de partición de

sustrato y producto (líquido iónico-fase acuosa), viscosidad y tensión interfacial (Quadros y Baptista, 2003) para poder realizar un estudio adecuado de las diferentes variables que intervendrán en los diferentes fenómenos de transferencia de masa dentro del reactor (**Figura V.18**).

### **I.1.3 Aplicaciones de los biorreactores de partición**

Los biorreactores de partición pueden tener un gran potencial en cuanto a la posibilidad de aumentar la productividad de muchos bioprocesos. La liberación controlada del sustrato de la fase orgánica a la fase acuosa abre un área de aplicación de estos biorreactores en biodegradación de compuestos xenobióticos, tales como fenol (Zhao *et al.*, 2009) o pentaclorofenol (Zilouei *et al.*, 2008). En estos sistemas, la biocompatibilidad y no-biodegradabilidad del solvente son características esenciales que deben ser tomadas en cuenta en la selección del solvente más apropiado.

Los biorreactores de partición permiten la remoción biológica de compuestos orgánicos volátiles de aire contaminado. La presencia de una segunda fase acuosa aumenta la transferencia de sustratos hidrofóbicos (ejemplo: hexano, oxígeno) o reduce la toxicidad de sustancias inhibitorias (ejemplo: benceno, tolueno) a los microorganismos presentes en la fase acuosa. Hasta este momento se han diseñado biorreactores de partición para el tratamiento de efluentes gaseosos a escala de laboratorio, como tanques agitados y biofiltros que contienen una fase no acuosa (Muñoz *et al.*, 2007).

En biocatálisis con células completas se han utilizado biorreactores de partición para evitar la inhibición por sustrato y producto. En la biotransformación de 2-feniletanol a fenilacetaldehído, Çelik *et al.* (2004) utilizaron como biocatalizador células completas de

*Gluconobacter oxidans* B72, e iso-octano como solvente. Para una biotransformación con 10 g L<sup>-1</sup> de 2-feniletanol, estos autores obtuvieron una concentración máxima de producto para el sistema acuoso y para un biorreactor de partición operado en lote alimentado de 0.4 g L<sup>-1</sup> y 7.96 g L<sup>-1</sup> respectivamente.

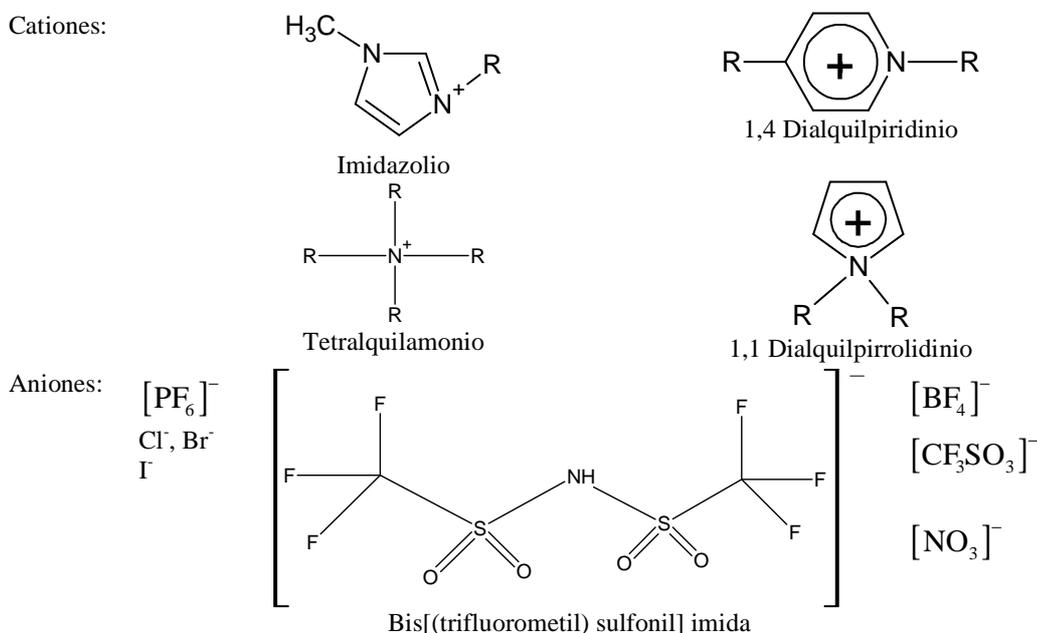
Cuando los sustratos de una biotransformación son volátiles, los biorreactores de partición constituyen una buena estrategia para reducir las pérdidas por evaporación. Prpich y Daugulis (2007) llevaron a cabo la biotransformación de tolueno a 3-metilcatecol (3MC) por *Pseudomonas putida* MC2, utilizando un biorreactor de partición donde se usó como fase orgánica BES (Bis (2-etilhexilo) sebecato) al 50 % v/v. Alcanzaron una productividad volumétrica de 440 mg de 3MC L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la cual fue 4 veces mayor al sistema acuoso, y las pérdidas de sustrato (tolueno) por evaporación fueron reducidas por un factor de 4, comparadas a sistemas previamente usados.

Una aplicación reciente de los biorreactores de partición es en la biodesulfurización de diesel (Yang *et al.*, 2007). El bióxido de azufre liberado a la atmósfera durante la combustión de combustibles fósiles causa serios problemas ambientales, como la lluvia ácida. Utilizando *Rhodococcus globerulus* en un biorreactor de 2 L, 1500 ppm de azufre total fueron removidas de 250 mL de diesel dentro de un periodo de 5 días (Yang *et al.*, 2007).

## **I.2 Características de los líquidos iónicos**

Los líquidos iónicos son sales orgánicas con bajo punto de fusión que son líquidos a temperatura ambiente, éstos son compuestos enteramente iónicos y son considerados solventes altamente polares, **Figura I.2**. Los líquidos iónicos no son inflamables y poseen una insignificante presión de vapor, es decir, no son volátiles, lo cual es una ventaja para la

separación de productos volátiles, dirigiendo el equilibrio de la reacción hacia la formación de producto (Krieger *et al.*, 2004; Hinckley *et al.*, 2002).



**Figura I.2 Estructuras de los líquidos iónicos más utilizados para catálisis (modificado de Yang y Pan 2005).**

La viscosidad de un líquido está dada por los puentes de hidrógeno y las estrechas fuerzas de Vander Walls, las cuales pueden incrementarse o disminuir en función de la temperatura o la acción de co-solventes. Normalmente un líquido iónico con largas cadenas alcalinas sobre el catión y un fuerte anión presenta viscosidades muy altas (Yang y Pan, 2005).

Las propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos (hidrofobicidad, viscosidad, polaridad, inmiscibilidad) pueden ser modificadas por la alteración del catión y/o anión. Esto es importante porque permite diseñar líquidos iónicos para reacciones específicas, como son incrementar la solubilidad del sustrato o modificar la selectividad de la enzima (Yang y Pan, 2005).

### I.2.1 El uso de los líquidos iónicos en biocatálisis

Las ventajas del uso de líquidos iónicos sobre el uso de solventes orgánicos como medio de reacción para biocatálisis también incluye su alta capacidad de disolver una amplia variedad de sustratos, especialmente aquellos altamente polares, y sus propiedades como solvente se pueden modular ampliamente a través de la modificación apropiada de cationes y aniones (Song, 2004).

Cuando células completas son utilizadas como biocatalizadores ha sido demostrado que retienen su actividad biológica en líquidos iónicos (Cull *et al.*, 2000). Recientemente se han hecho estudios de biocompatibilidad en células completas que muestran que el líquido iónico [OMA][BTA] no daña las células microbianas (Pfruender *et al.*, 2006).

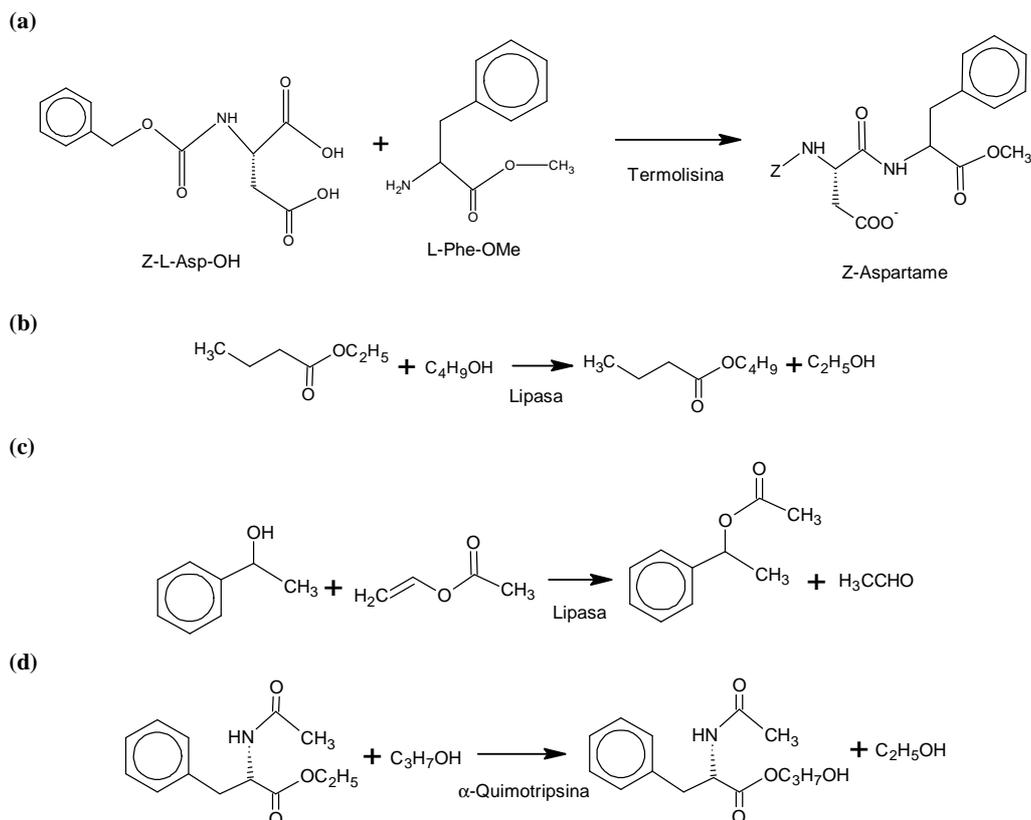


Figura I.3 Ejemplos de reacciones enzimáticas realizadas en líquidos iónicos (tomado de van Rantwijk *et al.*, 2003)

Las enzimas oxidantes conservan su actividad en sistemas de dos fases acuoso-líquido iónico (Hinckley *et al.*, 2002), lo cual permite proponer nuevas reacciones de biotransformación de tipo óxido-reducción en sistemas con líquidos iónicos.

El uso de líquidos iónicos provee muchos beneficios sobre las reacciones en solventes orgánicos convencionales en términos de actividad, enantioselectividad, estabilidad y reutilización de los sistemas catalizador-solvente (Song, 2004). En la **Figura .I.3** se muestran algunos ejemplos de reacciones enzimáticas realizadas en líquidos iónicos.

### **I.2.2 Biocompatibilidad de los líquidos iónicos**

Se considera que los líquidos tienen un uso y comercialización potencial, pero existen poca investigación acerca de su biocompatibilidad y sus riesgos. Investigaciones recientes han mostrado que los líquidos iónicos de imidazolium solamente en pequeñas cantidades son fotodegradables y biodegradables (Stepnowsky y Zaleska, 2005). Se ha encontrado que las cadenas largas n-alcalinas de éstos, presentan gran toxicidad. Por otro lado, la parte imidazolium del líquido iónico afecta la parte regulatoria del crecimiento de las plantas y la parte catiónica produce efectos negativos en el ambiente marino (Latala *et al.*, 2005).

Así también se ha evaluado la toxicidad de la sección 1 alquil 3 metilimidazolium de los líquidos iónicos tipo imidazolium en diferentes tipos de cepas bacterianas. Se encontró que estos líquidos iónicos presentan una buena actividad antimicrobiana contra cepas Gram-positivas y negativas así como antimicótico (Pernak *et al.*, 2003).

De 10 líquidos iónicos estudiados del tipo imidazolium, piridinium y tetraalquil amonio ninguno de ellos resultó ser mutagénico mediante la prueba de Ames (Docherty *et al.*,

2006). Por lo que los líquidos iónicos del tipo tetraalquil amonio son una opción como solventes seguros en biocatálisis, por ejemplo el líquido iónico [OMA][BTA].

### **I.3 Hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores de partición tipo tanque agitado**

El diseño y escalamiento confiable de biorreactores de partición requiere de la predicción de las tasas de reacción y de transferencia de masa. La aproximación de éstas implica conocer el área interfacial disponible para la transferencia de sustrato y producto, la cual es obtenida a través de estudios de hidrodinámica líquido-líquido del sistema, mediante la medición del tamaño promedio y la distribución del tamaño de gota en la dispersión. El tamaño de gota dependerá de las propiedades físicas de las fases, la fracción volumétrica de la fase dispersa y del régimen de agitación. La complejidad del mecanismo de rompimiento y coalescencia de gota, junto con la posibilidad de operar un biorreactor de partición en lote alimentado, justifica la necesidad de estudios futuros sobre la hidrodinámica de sistemas multifásicos (Çelik *et al.*, 2004).

Para bioconversiones oxidativas, el oxígeno es suministrado de manera continua a través de la aireación al biorreactor y da por resultado la formación de un sistema trifásico (gas-líquido-líquido) aumentando la complejidad del sistema estudiado (Torres-Martínez *et al.*, 2009). La productividad de bioconversiones oxidativas en un sistema multifásico puede ser limitada por la transferencia de masa de oxígeno. La tasa de transferencia de oxígeno será dependiente de las propiedades físicas del fluido, temperatura, presión, composición del medio, condiciones de agitación, velocidad superficial del aire y la configuración del biorreactor (Torres-Martínez *et al.*, 2009). Se ha estudiado que en un biorreactor de partición

de dos fases, dependiendo del tipo del hidrocarburo empleado (n-dodecano o n-hexadecano), y de la fracción volumétrica empleada, la fase orgánica puede reducir o aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno (Hassan y Robinson, 1977).

Las tasas de transferencia de masa en un sistema multifásico son funciones dependientes del diámetro promedio de gota *Sauter*  $d_{32}$ , del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ), coeficiente de partición de sustrato y producto, así como de la solubilidad del oxígeno en el medio.

Para un medio y biorreactor de partición determinado, es posible aumentar el área interfacial líquido-líquido y  $k_{La}$ , y por consecuencia las tasas de transferencia de masa, usando una agitación y aireación elevadas. Sin embargo esto ocasiona un consumo de potencia alto y el aumento significativo del costo de operación. Velocidades de agitación altas, también presentan cierta limitación cuando son aplicadas a células sensibles a estrés hidrodinámico y puede promover la formación de emulsiones estables generando problemas en los procesos de separación (Oh *et al.*, 1989; Sowana *et al.*, 2001; Stark *et al.*, 2002; Boswell *et al.*, 2003; Torres-Martínez *et al.*, 2009).

### **I.3.1 Área interfacial y distribución de tamaño de gotas en sistemas multifásicos**

Estudios de hidrodinámica en biorreactores de partición de dos fases líquidas se han enfocado en la determinación del área interfacial disponible para la transferencia de masa, para que el abastecimiento de sustrato (de la fase líquido iónico) no se convierta en el paso limitante del proceso. El área interfacial ha sido correlacionada a la fracción de la fase dispersa (hold-up) y al número de Weber (Quadros y Baptista, 2003).

El área interfacial puede ser calculada con la ec.(I.1) donde  $\phi$  es la fracción volumétrica y  $d_{32}$  es el diámetro promedio de gota *Sauter* de la fase dispersa (Quadros, y Baptista, 2003). Un mejor conocimiento del efecto de las condiciones de operación del biorreactor sobre el  $d_{32}$  es por lo tanto muy importante. Además el conocimiento de  $d_{32}$  puede dar una indicación de la estabilidad de la dispersión formada líquido-líquido.

$$a = \frac{6\phi}{d_{32}} \quad (\text{I.1})$$

Las propiedades fisicoquímicas del medio tienen influencia en el tamaño de gota promedio y en la distribución del tamaño de gota. Cuando la viscosidad de la fase dispersa es pequeña, la fuerza de resistencia al rompimiento proviene únicamente de la tensión interfacial (Nienow, 2004). No obstante, una viscosidad alta de la fase dispersa tiene una influencia importante sobre el tamaño de gota promedio y la distribución del tamaño de gota (Calabrese *et al.*, 1986).

Varios autores (Calderbank, 1958; Calabrese *et al.*, 1986; Nienow, 2004; Nielsen *et al.*, 2007) han correlacionado el diámetro promedio de gota *Sauter* con el número de Weber,  $N_{We}$ , como se observa a continuación:

$$\frac{d_{32}}{D_i} = AN_{We}^{-0.6} \quad (\text{I.2})$$

Donde  $A = f(D_i / D_T, P, \phi)$  y  $N_{We} = \rho_c N^2 D_i^3 / \sigma$ . Calderbank (1958) analizó el tamaño de gota en tanques agitados, utilizando impulsores de 6 paletas, en recipientes similares geoméricamente de diferentes tamaños. Encontró que para dispersiones aireadas líquido-líquido el tamaño de gota promedio está en función de las propiedades fisicoquímicas del sistema y de las condiciones de operación, como se muestra en la ec. (I.3).

$$d_p = 0.224 \left[ \frac{\sigma^{0.6}}{(P/V)^{0.4} \rho_c^{0.2}} \right] \cdot \phi^{0.5} \left( \frac{\mu_d}{\mu_c} \right)^{0.25} \quad (\text{I.3})$$

Donde  $d_p$  es el tamaño promedio de gota,  $(P/V)$  es el consumo de potencia por volumen,  $\sigma$  es la tensión interfacial,  $\rho_c$  es la densidad de la fase continua,  $\phi$  es la fracción volumétrica de la fase dispersa, y  $\mu_c$  y  $\mu_d$  son la viscosidad de la fase continua y de la fase dispersa respectivamente.

A la fecha no hay estudios de hidrodinámica en sistemas multifásicos utilizando líquidos iónicos como fase dispersa.

### **I.3.2 Transferencia de oxígeno en biorreactores de partición**

En biorreactores de partición, la adición de una segunda fase inmisible, en la cual el sustrato y el oxígeno tienen una solubilidad mayor que en el agua, ha sido una estrategia propuesta por diferentes investigadores (Nielsen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2005) como una alternativa para mejorar la tasa de transferencia de masa (oxígeno, sustrato y producto).

Las correlaciones para la predicción del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $k_{LA}$ , son generalmente una función de la potencia gaseada por unidad de volumen y de la velocidad superficial del gas. Con el objetivo de considerar el efecto de la fracción volumétrica de la fase orgánica sobre el  $k_{LA}$  en dispersiones líquido-líquido aireadas, han sido propuestas correlaciones empíricas que suponen que las dos fases líquidas se comportan como una sola fase homogénea (Nielsen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2005).

$$k_L a = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta (1 - \phi)^\gamma \quad (\text{I.4})$$

Donde  $P_g$  es la potencia gaseada consumida,  $V$  es el volumen de trabajo del biorreactor,  $v_s$  es la velocidad superficial del gas a través del biorreactor,  $\phi$  es la fracción volumétrica de la fase dispersa y  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son constantes numéricas particulares de cada sistema.

### **I.3.3 Determinación de coeficientes de transferencia de masa mediante el uso de la Celda de Lewis modificada**

Anteriormente mencionamos que para el diseño confiable de biorreactores de partición es necesario poder predecir las tasas de transferencia de masa. Además de conocer el área interfacial disponible para la transferencia de masa, es necesario conocer los coeficientes de transferencia de sustrato y producto.

La Celda de Lewis es utilizada para la determinación de manera indirecta de los coeficientes individuales de transferencia de masa (Lewis, 1954). La Celda de Lewis modificada permite obtener una interfase líquido-líquido bien definida, claramente delimitada y plana (Woodley *et al.*, 1991). De esta manera es posible analizar por separado el coeficiente de transferencia de masa para sustrato y producto del área interfacial. La agitación que puede haber en la Celda de Lewis no debe de perturbar la interfase, para asegurar una área interfacial conocida a partir de las dimensiones de la Celda de Lewis y de esta manera, separar el coeficiente de transferencia de masa interfacial del área de transferencia.

El cambio de concentración de sustrato o producto en la fase continua debido a la transferencia de masa en una Celda de Lewis fue modelado por Srivastava *et al.* (2000) utilizando la ec. (I.5).

$$V_c \frac{dC}{dt} = k_L a V_c (C^* - C) \quad (\text{I.5})$$

Donde  $V_c$  es el volumen de la fase continua,  $dC/dt$ , es el cambio de la concentración de soluto en la fase continua con respecto al tiempo,  $C^*$  es la concentración en el equilibrio y  $C$  es la concentración de soluto.

#### **I.4 Modelamiento en biorreactores de partición**

Los modelos matemáticos constituyen una manera racional de entender los procesos biológicos, físicos y químicos, entre otros. Los modelos matemáticos tienen la utilidad de organizar la información que se encuentra disponible del proceso a evaluar. Cuando se estudian fenómenos que son descritos por un sistema de muchas variables, las interacciones que tienen las distintas variables pueden ser mejor entendidas utilizando modelos matemáticos, permitiendo hacer predicciones específicas acerca de ciertos aspectos del proceso de interés (Bailey, 1998).

Un punto esencial en el desarrollo de un modelo es la formulación de las ecuaciones de balance de masa, energía y momento (Medina, 2006). Estos modelos consideran los diferentes fenómenos de transferencia de masa junto con la cinética de crecimiento del microorganismo en el sistema multifásico (Cruickshank *et al.*, 2000). Bordel *et al.* (2010), desarrollaron un modelo mecanístico en un sistema abiótico que describe la transferencia de hexano de la fase gas a la fase líquida (acuosa + orgánica) en un biorreactor de partición usando como fase

dispersa aceite de silicón. Este modelo está basado en balances generales de masa y ecuaciones de transporte. El ajuste del modelo mostró un aumento en la fracción máxima de hexano transferido de la fase gas a la fase acuosa al aumentar la velocidad de agitación y de la fracción de aceite de silicón hasta 200 RPM y 20 %, respectivamente.

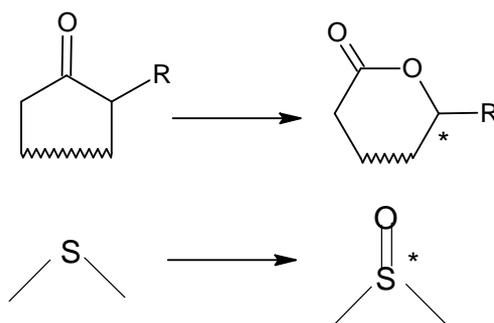
#### **I.4.2 Características del biocatalizador empleado en el sistema**

Una importante conversión química, difícil de alcanzar enantioselectivamente por síntesis química es la oxidación Baeyer-Villiger de cetonas, **Figura I.4**. La oxidación Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas o acíclicas, permite la transformación de una cetona cíclica a su correspondiente lactona por oxidantes tales como peróxido de hidrógeno y ácido peroxibenzoico. Esos oxidantes son frecuentemente inestables, tóxicos y también carecen de enantioselectividad (Alphand *et al.*, 2003)

Las monooxigenasas catalizan la oxigenación nucleofílica de cetonas (oxidación Baeyer-Villiger), como también la oxigenación electrofílica de varios heteroátomos, tales como azufre, selenio, nitrógeno y fósforo. Usando la ciclohexanona monooxigenasa para catalizar la reacción, se producen ésteres puros ópticamente y lactonas con concentraciones elevadas de un solo enantiómero (Alphand *et al.*, 2003).

Las monooxigenasas Baeyer-Villiger son flavoproteínas que pueden llevar a cabo oxigenaciones nucleofílicas con una gran enantioselectividad de un amplio intervalo de cetonas cíclicas o lineares produciendo lactonas o ésteres respectivamente. Todas estas enzimas son dependientes de NADPH y oxígeno para catalizar la reacción tipo Baeyer-Villiger (Doig *et al.*, 2002a). Las monooxigenasas Baeyer-Villiger han sido encontradas en bacterias del género *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Rhodococcus* y *Nocardia*, además en hongos del género *Curvularia*, *Dreschlera*, *Exophilia*, *Cunninghamella* y

*Cylindrocarpon*. En bacterias el rol natural de estas enzimas parece ser catalizar uno o más pasos claves en varias vías catabólicas oxidativas, mientras que en hongos ellas posiblemente participan en el programa de los eventos bioquímicos que acompañan el cambio de metabolismo primario a secundario (Willetts, 1997).



**Figura I.4** Esquema general de las oxidaciones de cetonas cíclicas y sulfuros orgánicos catalizadas por las monooxigenasas Baeyer-Villiger (tomado de Alphand *et al.*, 2003).

El uso de biocatalizadores para las oxidaciones Baeyer-Villiger debería ser desarrollado en paralelo con la necesidad de mejorar la selectividad, seguridad, buen estado y los aspectos ambientales del proceso (Alphand *et al.*, 2003). Un grupo amplio de lactonas son de interés industrial. Los intermediarios como las lactonas ópticamente puras producidas vía ciclohexanona monooxigenasa, pueden ser subsecuentemente usados para la síntesis de una variedad de químicos finos de alto valor agregado y fármacos (Doig *et al.*, 2002a).

La cepa *E.coli* TOP10 pQR239 fue desarrollada con el objetivo de tener una cepa recombinante, no patógena que fuera de fácil crecimiento, libre de lactona hidrolasas, y que pudiera ser utilizada como biocatalizador a nivel industrial, a diferencia de la cepa silvestre *Acetobacter calcoaceticus* que es una cepa patógena que requiere crecer en ciclohexanol (un compuesto tóxico) para expresar la enzima ciclohexanona monooxigenasa (Doig *et al.*, 2001).

## **II. HIPÓTESIS**

## **II.- HIPÓTESIS**

Es posible llevar a cabo la biotransformación Baeyer-Villiger con células completas en un biorreactor de partición empleando líquido iónico como fase dispersa, ya que el sistema multifásico acuoso-líquido iónico-aire permite aliviar la inhibición por sustrato en la biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas, conduciendo con esto a un aumento en la productividad.

### **III.OBJETIVOS**

### **III.- OBJETIVO**

Evaluar el potencial de los biorreactores multifásicos tipo tanque agitado en la biotransformación de cetonas a lactonas, usando como fase dispersa líquidos iónicos.

#### **III.1 Objetivos particulares:**

- Evaluar la transferencia de oxígeno y la hidrodinámica de un medio multifásico acuoso-líquido iónico-aire
- Evaluar la biocompatibilidad de 2 líquidos iónicos con el biocatalizador y seleccionar el más biocompatible.
- Caracterizar la cinética de biotransformación en medio acuoso
- Caracterizar la cinética de biotransformación en medio bifásico acuoso-líquido iónico
- Desarrollar un modelo matemático que describa la biotransformación de cetonas a lactonas utilizando un biorreactor de partición multifásico

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **IV.-MATERIALES Y MÉTODOS**

### **ESTATEGIA EXPERIMENTAL**

En la primera parte de la tesis se estudió la biocompatibilidad de la cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239 al líquido iónico así como las diferentes propiedades físico-químicas del líquido iónico y del medio multifásico, **Figura IV.1.**

Para el modelamiento matemático del biorreactor de partición, se realizaron balances de materia en la fase acuosa y en la fase líquido iónico. Considerando los fenómenos de transferencia de masa, consumo de sustrato y oxígeno y generación de producto. Con todas estas ecuaciones se construyó un modelo para predecir la transferencia de masa dentro del biorreactor, así como una biotransformación del tipo Baeyer-Villiger, **Figura IV.1.**

Para los estudios de transferencia de masa, se calcularon los coeficientes de partición de sustrato y producto que muestran la afinidad de sustrato y producto al líquido iónico. Los coeficientes convectivos de transferencia de masa calculados en la celda de Lewis fueron asociados al biorreactor de partición multifásico usando el área interfacial de las gotas del líquido iónico que se obtuvo de los estudios de hidrodinámica (**Figura IV.1.**)

Para obtener el modelo cinético de reacción sin problemas de transferencia de masa se llevaron a cabo biotransformaciones en medio acuoso. Se compararon las productividades obtenidas para el sistema multifásico y el sistema acuoso. Finalmente, se llevaron a cabo biotransformaciones en un biorreactor de partición tipo tanque agitado y los datos obtenidos experimentalmente se compararon con los datos predichos por el modelo matemático desarrollado **Figura IV.1.**

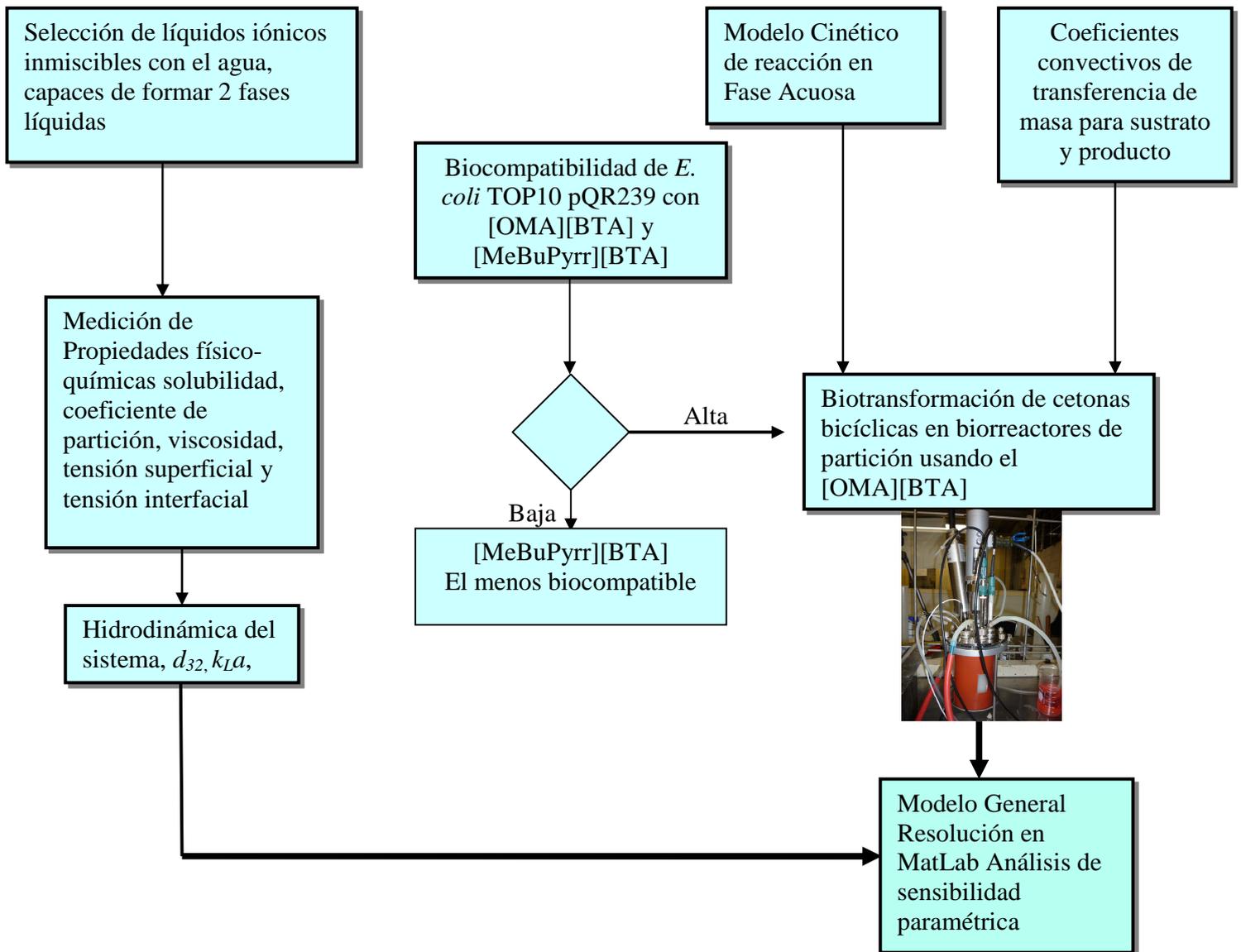


Figura IV.1 Estrategia experimental global seguida durante toda la tesis.

## **IV.1 Reactivos y materiales**

### **IV.1.1 Reactivos**

El sustrato de la biotransformación fue una mezcla racémica de cetonas bicíclicas formada por 2 enantiómeros, ( $\pm$ )-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona (Fluka,  $\geq 98.0\%$ ) y el producto de la biotransformación es una mezcla de enantiómeros: (1S, 5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona (Fluka,  $\geq 99.0\%$ ) y (1R, 5S)-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-en-2-ona). De aquí en adelante se mencionarán las cetonas bicíclicas como “cetonas” (los sustratos de la biotransformación) y los productos de la biotransformación como “lactonas” que corresponde a los dos enantiómeros.

Agar nutritivo, extracto de levadura y caldo nutritivo fueron obtenidos de BD Bioxon, México; la triptona bacto de Dickinson and company, USA. Las sales  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y el glicerol fueron comprados de J.T. Baker, México, todos los reactivos fueron grado reactivo. La ampicilina y la L-Arabinosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich, USA.

### **IV.1.2 Gases utilizados**

Para cuantificar el producto y sustrato de la reacción por cromatografía de gases, se utilizó gas hidrógeno comprimido grado 4.5, aire comprimido extraseco y helio comprimido grado 4.6. La técnica del método dinámico utilizó gas nitrógeno comprimido grado 4.8. Todos los gases fueron proporcionados por Praxair de México.

### IV.1.3 Líquidos iónicos estudiados

Los líquidos iónicos estudiados: Bistrifluorometil sulfonil imida trioctilmetil amonio, [OMA][BTA] (Figura IV.2a) y bistrifluorometil sulfonil imida butilmetilpirrolidinio [MeBuPyrr][BTA] (Figura IV.2b), todos tenían una pureza mayor al 98% y fueron comprados a Solvent Innovation GMBH (Colonia, Alemania).

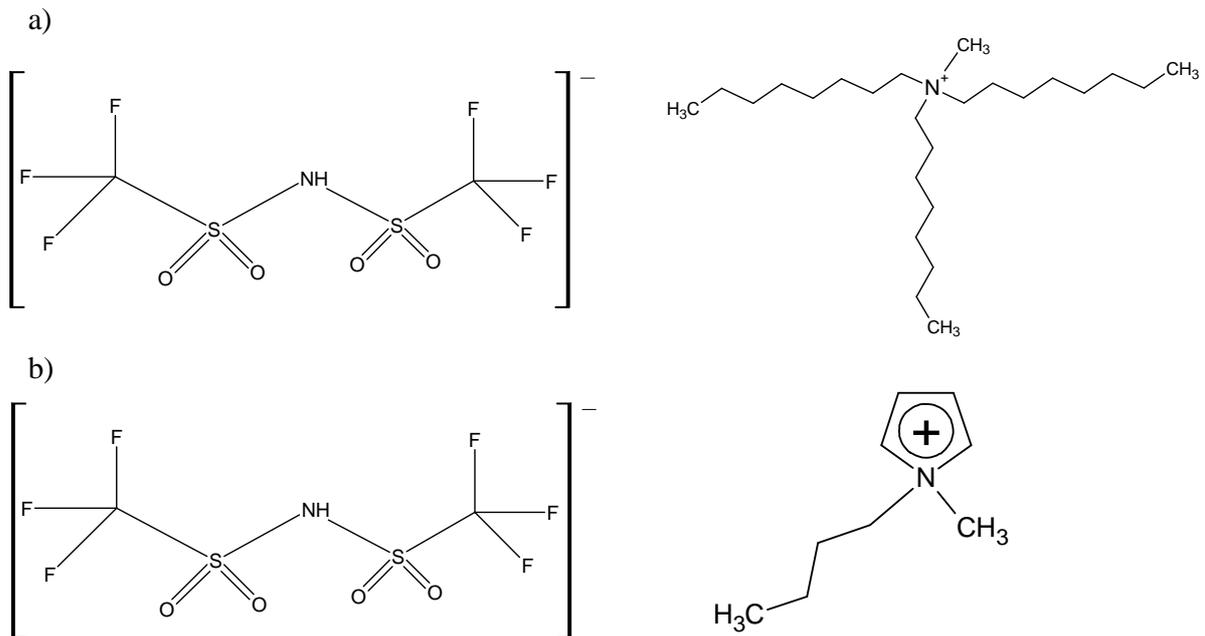


Figura IV.2 Estructura de los líquidos iónicos estudiados a) bistrifluorometil sulfonil imida trioctilmetil amonio, [OMA][BTA]; b) bistrifluorometil sulfonil imida butilmetilpirrolidinio, [MeBuPyrr][BTA]

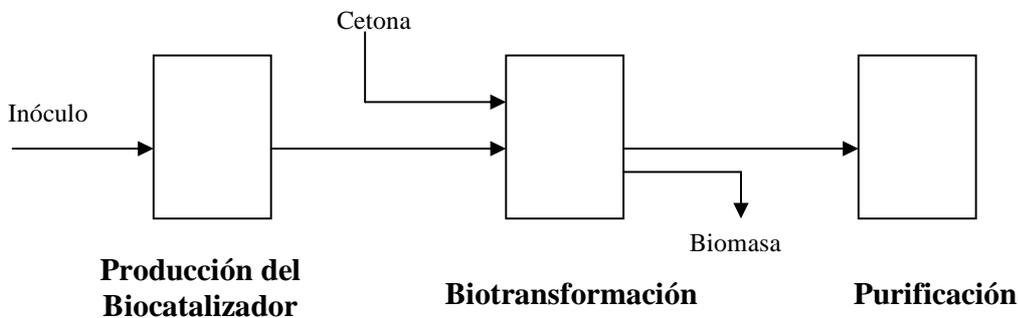
### IV.1.4 Descripción del biorreactor de 1 y 3 L tipo tanque agitado

Para los estudios de hidrodinámica y transferencia de masa en el medio trifásico se empleó un biorreactor de 1L tipo tanque agitado, con una jarra de vidrio (Model ADI 1025, Applikon). El biorreactor tenía un diámetro interno de 9.5 cm y el volumen de operación fue de 0.7 L ( $H_L/D_T=0.96$ ). Como impulsor se utilizó una turbina Rushton de 6 paletas con un diámetro de 4.5 cm ( $D_i/D_T=0.46$ ). El biorreactor fue equipado con 2 mamparas equidistantes de 1 cm.

Para la producción del biocatalizador se empleó un biorreactor de 3 L, instrumentado con un electrodo de pH, un sensor-control de temperatura y un electrodo de oxígeno disuelto (AppLiSens Z010032520, 325 mm de longitud, Applikon). Los electrodos fueron acoplados a un controlador (ADI 1010 Bio controler, Applikon).

## IV.2 Producción del biocatalizador *E. coli* TOP10 pQR239

Durante esta tesis se utilizó una cepa modificada genéticamente que es resistente a ampicilina; el plásmido de resistencia a ampicilina también confiere la capacidad de producir la enzima ciclohexanona monooxigenasa. La cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239 fue proporcionada por el profesor John M. Ward (University College London, Londres, Reino Unido). La estrategia de producción y uso del biocatalizador en la biotransformación se presenta en la **Figura IV.3**.



**Figura IV.3** Estrategia de producción y uso del biocatalizador en la biotransformación

Uno de los inconvenientes que tiene esta cepa es su estabilidad genética, pues después de algunas resiembras en cajas de agar nutritivo, se puede perder el plásmido y por consiguiente la capacidad de producir la enzima ciclohexanona monooxigenasa. Por lo que fue necesario establecer el siguiente procedimiento para su mantenimiento y conservación (ver sección IV.2.2).

#### IV.2.1 Diseño de medio de cultivo y cinética de crecimiento de *E. coli* TOP10 pQR239

Para el uso de células completas en biocatálisis, es necesario establecer un estado metabólico adecuado en el que deben encontrarse las células para llevar a cabo biotransformaciones con altos rendimientos. Por tanto, el conocimiento de la cinética de crecimiento de *E. coli* en un medio definido es importante para mantener el biocatalizador en condiciones adecuadas para la biocatálisis. La cinética de crecimiento es necesaria para entender el comportamiento de la biotransformación y consiste en la medición o estimación de las velocidades de síntesis celulares.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{IV.1})$$

Donde  $\mu$  se define como:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{k_s + s} \quad (\text{IV.2})$$

La cinética de crecimiento de acuerdo al modelo de Monod (ec.(IV. 1)) implica que sólo debe de existir un sustrato limitante. Como consecuencia el crecimiento de *E. coli* debe estar limitado únicamente por glucosa y no por ningún otro nutriente, ni por oxígeno.

Para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en matraces tipo Erlenmeyer se utilizó la siguiente ecuación publicada por Liu *et al.*(2006); ec. (IV.3).

$$k_L a = 0.141 N^{0.88} \left( \frac{v_L}{v_0} \right)^{-0.80} \quad (\text{IV.3})$$

Donde  $k_La$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ( $\text{h}^{-1}$ ),  $N$  son las revoluciones por minuto (RPM),  $v_L$  es el volumen del líquido (mL),  $v_0$  es el volumen del matraz (mL).

Para la preparación del medio de cultivo se calculó un  $k_La$  de  $65.86 \text{ h}^{-1}$  (ver anexo 2), de esta forma el medio de cultivo fue preparado para tener una biomasa en peso seco de  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ , considerando un rendimiento de g de biomasa por g de oxígeno ( $Y_{\frac{gdw}{gO_2}}$ ) de  $1.47 \text{ gdw gO}_2^{-1}$  (Bailey y Ollis, 1986), de esta forma no hay limitaciones de oxígeno (ver anexo 2).

**Tabla IV. 1 Composición química del medio de cultivo (MC1) para la producción del biocatalizador**

Componente	$\text{g L}^{-1}$
Glucosa	2.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.92
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.01
$\text{MgSO}_4$	0.1
$\text{CaCl}_2$	0.03
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4.2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3.3
Ampicilina	0.1

En la **Tabla IV.1**. Se muestran las concentraciones de glucosa y sales para producir  $1 \text{gdw L}^{-1}$  de biomasa, medio de cultivo (MC1) la ampicilina se adicionó al medio para asegurar que la cepa no perdiera el plásmido y para evitar contaminaciones; las sales se añadieron al doble de la concentración calculada teóricamente con el objetivo de que no hubiera ninguna limitación por fuente de nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales (ver Anexo 2), teniendo en cuenta que no se viese afectado el crecimiento por la fuerza iónica del medio.

#### **IV.2.2 Mantenimiento y conservación de *E. coli* TOP10 pQR239**

La cepa *E. coli*, fue propagada en el medio MC1 a pH 7. El medio líquido se esterilizó en una autoclave a 115 °C por 15 minutos, posteriormente el medio fue suplementado con ampicilina a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>. La ampicilina fue previamente esterilizada por filtración con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm. Se inocularon varios matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo. Los matraces fueron puestos a 37°C, a 250 RPM por 24 h.

Cuando se alcanzó una concentración de biomasa de aproximadamente 1gdw L<sup>-1</sup>, se les agregó glicerol estéril hasta alcanzar una concentración de glicerol de 50% v/v, se mezcló cuidadosamente y posteriormente se tomaron alícuotas de 1 mL y fueron puestas en crioviales que fueron almacenados en nitrógeno líquido a -196°C.

Para conservar las células de *E. coli*, se utilizó como método alternativo de conservación, la liofilización, en la que las células después de alcanzar una concentración de 1 gdw L<sup>-1</sup>, se resuspendieron en una solución de leche descremada al 10% p/v previamente estéril. 3 mL de la suspensión de células en leche se agregaron a ampollitas estériles. Estas ampollitas se congelaron con una mezcla de hielo seco-acetona. Posteriormente, las ampollitas se liofilizaron en una Liofilizadora Labconco (model 7522800, Lyph-Lock6) a -50 °C. Las ampollitas liofilizadas se utilizaron como inóculo para un matraz con 100 mL de medio de cultivo definido.

#### **IV.3 Análisis de cetonas y lactonas por Cromatografía de Gases**

Se utilizó una columna capilar de 30 m de longitud, diámetro interno de 0.32 mm y una película de 0.25 µm (modelo Cyclosilb, J&W Científico, USA). Se inyectó 1µL de muestra, el

tiempo de la corrida fue 9 min, la temperatura inicial del horno fue  $100^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , después se aplicó una rampa de temperatura de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta  $150^{\circ}\text{C}$ , cuando el horno llegó a  $150^{\circ}\text{C}$  se mantuvo a temperatura constante por 3 minutos. El flujo de gas acarreador fue  $5\text{ mL min}^{-1}$ , se usó helio como gas acarreador. La temperatura del inyector fue  $250^{\circ}\text{C}$ . Se empleó un detector de ionización de flama, a una temperatura de  $275^{\circ}\text{C}$  con un flujo de hidrógeno en el detector  $45\text{ mL min}^{-1}$  y  $450\text{ mL min}^{-1}$  de aire.

#### **IV.4 Biotransformación de cetonas a lactonas en medio acuoso**

##### **IV.4.1 Condiciones de cultivo**

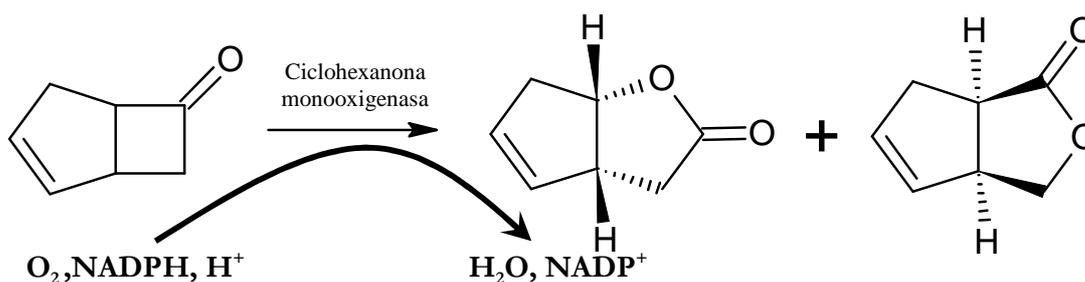
La cepa fue propagada en el medio MC1 **Tabla IV. 1** a pH 7. El medio de cultivo fue esterilizado en una autoclave a  $115^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. El medio fue suplementado con ampicilina a una concentración de  $100\text{ mg L}^{-1}$ , la ampicilina se esterilizó por filtración usando filtros con  $0.25\text{ }\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL agitados sin baffles que fueron llenados al 20 % de su capacidad con medio MC1, después de ser inoculados, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , 250 RPM por 16 horas. *E. coli* expresa la CHMO (ciclohexanona monooxigenasa) bajo el control del promotor araBAD inducible con L-arabinosa. La inducción de la enzima se hizo añadiendo una solución de arabinosa de  $100\text{ g L}^{-1}$  para alcanzar una concentración de  $2\text{ g L}^{-1}$  de arabinosa en los matraces donde crecía la cepa. Después de 3 horas de haber añadido la arabinosa (el inductor) se cosecharon las células de *E. coli* por centrifugación a 10000 RPM por 20 minutos.

##### **IV.4.2 Cinética de biotransformación en medio acuoso**

Las reacciones de biotransformación (**Figura IV.4**) fueron llevadas a cabo en un minibioreactor (una columna con diámetro 3 cm y 16 cm de altura, agitado por un agitador

magnético), con un volumen de reacción de 20 mL como se muestra en la **Figura IV.5**. Este minibiorreactor fue instrumentado con un electrodo de oxígeno disuelto, de esta manera se tuvo un monitoreo y control de oxígeno disuelto durante la biotransformación. Se mantuvo el oxígeno disuelto al  $80\% \pm 7$ . Todas las biotransformaciones se llevaron a  $37^{\circ}\text{C}$ .



**Figura IV.4** Esquema de la biotransformación Baeyer-Villiger catalizada por la enzima ciclohexanona monooxigenasa (EC. 1.14.13.22) en la oxidación de ( $\pm$ )-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona produciendo (1S, 5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona y (1R, 5S)-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-en-2-ona).



**Figura IV.5** Biorreactor utilizado para la biotransformación con control de temperatura, agitación y medición de oxígeno disuelto.

Los experimentos fueron llevados a cabo a una concentración de biocatalizador de 1 gdw L<sup>-1</sup>. El medio de reacción fue una solución de fosfatos 50 mM pH7, con 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol. Se midieron velocidades iniciales de producción de lactonas a diferentes concentraciones de cetonas (de 0.05 a 2 g L<sup>-1</sup>) para proponer un modelo cinético de reacción y evaluar sus parámetros.

#### **IV.5 Método para determinar la viabilidad de *E. coli* en presencia de líquido iónico**

Durante la selección de los líquidos iónicos, una parte importante es la prueba de la biocompatibilidad de estos solventes con el biocatalizador (*E. coli*). Previo a los estudios de compatibilidad fue necesario producir un inóculo de *E. coli*. Este fue cultivado en tubos de vidrio que contenían 10 mL de medio de cultivo nutritivo suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol a pH 7. Este inóculo se incubó de 20 a 24 h a 30 °C.

Para determinar la tolerancia de *E. coli* a el líquido iónico en un sistema bifásico, se prepararon tubos Eppendorf previos a la inoculación con 9% v/v de líquido iónico en 50 mM de solución de fosfatos a pH 7. Después, se tomaron 100 µL del inóculo que fueron adicionados a cada tubo Eppendorf y agitados vigorosamente por 1 minuto e incubados a 30°C por 1 h (se repitió la agitación de 1 minuto cada 30 minutos de incubación).

Después de incubar los tubos Eppendorf, se tomaron muestras de 500 µL y diluidas en serie (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>). Después 0.1 mL de cada dilución fue usada como inóculo para cajas Petri que contenían 10 mL de agar nutritivo que fueron incubadas de 16 a 20 h a 30 °C, la siembra se hizo por extensión. La viabilidad de *E. coli* fue calculada en base a la cuenta de células viables por cuenta de unidades formadoras de colonias por mililitro.

## **IV.6 Biotransformación de cetonas a lactonas en un biorreactor de partición tipo tanque agitado**

### **IV.6.1 Producción del biocatalizador en un biorreactor de 3L**

Las células completas que fueron utilizadas como biocatalizador durante esta parte de la tesis fueron producidas en un biorreactor de 3L operado al 70% de su capacidad (2.1 L), usando el medio MC2 (diez veces MC1), suplementado con ampicilina  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , con el procedimiento que se detalla a continuación:

La propagación de la cepa se inició inoculando un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo con una ampolla de la cepa liofilizada e incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Posteriormente este matraz sirvió de inóculo para otros 3 matraces con 100 mL de medio de cultivo. Finalmente, el biorreactor (tanque agitado, Applikon) de 3L se inoculó con los 3 matraces (aprox.  $0.3 \text{ gdw L}^{-1}$ ) que alcanzaban un volumen total de 400 mL, es decir el tamaño del inóculo fue aproximadamente el 20 % del volumen de trabajo.

Se mantuvo el pH a 7 con la adición de KOH 3M y a  $37^{\circ}\text{C}$ , mediante un algoritmo de control a través del programa BioXpert NT 2.51.109. El biorreactor fue aireado con 1 vvm a través de un difusor sumergido en forma de “L”.

La biomasa fue cuantificada midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 650 nm mediante una curva de calibración (ver Anexo 1). Cuando el biorreactor alcanzó una densidad celular de  $3 \text{ gdw L}^{-1}$  se inició la inducción con L-Arabinosa y se cosecharon las células hasta alcanzar una densidad celular de  $6 \text{ gdw L}^{-1}$ . La biomasa fue cosechada por centrifugación a 10000 RPM durante 10 minutos.

#### **IV.6.2 Biotransformación de cetonas a lactonas en un biorreactor de partición de 1L**

Para la biotransformación se utilizó como fase dispersa el líquido iónico bistrifluorometil sulfonil imida trioctilmetil amonio, [OMA][BTA], éste fue previamente lavado con agua destilada y secado en una estufa a 100 °C por 48 h con el fin de quitar impurezas y trazas de la síntesis del líquido iónico. Como fase acuosa (medio de reacción) se utilizó una solución tampón de fosfatos 50 mM, pH7 suplementada con 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol. Como sustrato de la biotransformación se utilizó una mezcla racémica de cetonas, (±)-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona (Fluka, ≥98.0%) y el producto de la biotransformación fue una mezcla de 2 lactonas: (1S, 5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona (Fluka, ≥99.0%) y (1R, 5S)-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-en-2-ona. El sustrato y producto de la biotransformación fueron analizados por cromatografía de gases.

Antes de añadir el sustrato de la biotransformación, el biocatalizador permaneció por 15 minutos en el medio de reacción a 30 °C. El sustrato de la biotransformación fue añadido como una solución acuosa a la dispersión acuosa-líquido iónico a una concentración de 10 g L<sup>-1</sup> con el objetivo de evitar problemas de toxicidad del sustrato a las células.

En todos los experimentos el biorreactor fue aireado con 1 vvm usando un difusor sumergido en forma de "L". El biorreactor fue operado a 750 RPM, 30°C y se mantuvo a pH 7 usando una solución de fosfatos 50 mM. El porcentaje de oxígeno disuelto en todos los experimentos se mantuvo mayor al 40 %, el oxígeno disuelto fue monitoreado usando un electrodo de oxígeno disuelto (AppLiSens Z010032520, 325 mm de longitud, Applikon). El líquido iónico se añadió al 5% v/v. Se tomaron muestras periódicas para los análisis por cromatografía de gases. La reacción se detuvo bajando la temperatura colocando el Eppendorf

con la muestra en hielo. La concentración de lactonas reportada es la suma de los productos de la reacción ((1S, 5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona) y (1R, 5S-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-en-2-ona).

#### **IV.7 Medición de propiedades fisicoquímicas del sistema bifásico**

La velocidad de transferencia de sustrato, producto y oxígeno durante la biotransformación dependerán en buena manera de las propiedades físicas del fluido, temperatura, presión, composición de medio de cultivo, condiciones de agitación, velocidad superficial de aire y la configuración del biorreactor. Por lo que es importante determinar las propiedades fisicoquímicas de los sistemas bifásicos estudiados.

##### **IV.7.1 Medición de la solubilidad de los líquidos iónicos [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA] en agua**

Debido a la viscosidad de los líquidos iónicos empleados, se determinó la solubilidad pesando una cantidad conocida del líquido iónico estudiado en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se fue añadieron lentamente, cantidades conocidas de agua destilada en condiciones de agitación hasta que no fueron detectadas gotas de líquido iónico usando un medidor de reflectancia óptica (3D ORM; MTS, Messtechnik Schwartz). Todos los ensayos de solubilidad se llevaron a cabo por triplicado a 30 °C. El valor promedio encontrado se empleó como la solubilidad máxima del líquido iónico en agua destilada a 30 °C.

##### **IV.7.2 Medición del coeficiente de partición de sustrato y producto en el sistema bifásico agua-líquido iónico**

Se prepararon soluciones estándar de cetona y lactona a una concentración de 2 g L<sup>-1</sup>. Posteriormente en un tubo Eppendorf se añadió 700µL de líquido iónico y 700µL de la

solución estándar de cetona y lactona. El tubo se agitó vigorosamente por 1 minuto y posteriormente se dejó en reposo por 24 y 48 horas a 30°C, posteriormente se midió la concentración de cetona y lactona en la fase acuosa por cromatografía de gases. Se realizó un balance de masa para calcular la concentración de cetona o lactona en el líquido iónico, y se calculó el coeficiente de partición para los líquidos iónicos estudiados.

#### **IV.7.3 Medición de la viscosidad de los líquidos iónicos empleados, anhidros y saturados con agua.**

La dependencia aparente de la viscosidad al esfuerzo de corte de los líquidos fue medida usando un reómetro modular compacto, modelo Physica MCR 300 (Physica Meßtechnik GMBH, Stuttgart, Germany). Se emplearon muestras de 200  $\mu$ L de líquido iónico anhidro y saturado con agua, colocadas en un sistema de medición de plato-cono (CP-50-2, 50 mm diámetro, 2.0° ángulo, truncamiento 45  $\mu$ m). La temperatura fue controlada con un controlador termoelectrónico Peltier (TEL 150 P-C). Se tomaron medidas por triplicado a 30°C.

#### **IV.7.4 Medición de la tensión interfacial de los líquidos iónicos [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA], por el método del anillo**

La tensión interfacial fue medida usando un tensiómetro de superficie (Fisher, Modelo 20). En un recipiente limpio de vidrio (4 cm de diámetro y 4 cm de altura) se colocaron 20 mL de líquido iónico saturado con agua, cuidadosamente se adicionaron 20 mL de agua destilada previamente saturada con líquido iónico, cuidando de no perturbar la interfase entre los dos líquidos. El anillo de platino se bajó hasta quedar en la interfase. Previamente calibrado el tensiómetro de Fisher, se aplicó lentamente una tensión sobre la cuerda unida al anillo hasta romper la interfase; la fuerza necesaria para romper la interfase y liberar el anillo se tomó

como la tensión interfacial aparente (**Figura IV.5**). Posteriormente se utilizó un factor de corrección (del manual del equipo) para calcular la tensión interfacial correcta. Se tomaron medidas por triplicado a 30 °C. La calibración del equipo fue realizada usando agua destilada como referencia.



**Figura IV.6** Tensiómetro de Fisher

## **IV.8 Hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores de partición**

### **IV.8.1 Medición del consumo de potencia aireada por el método eléctrico**

El consumo de potencia aireada fue medido usando una metodología recientemente reportada (Medina, 2006; Torres-Martínez *et al.*, 2009). El método está basado en mediciones eléctricas tomadas directamente en el motor de la flecha del impulsor del biorreactor, se mide los watts y amperes. Para considerar con mayor precisión las pérdidas que ocurren en el sistema de agitación, previamente se preparó un blanco de las mediciones con el biorreactor vacío. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

#### **IV.8.2 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ) por el método dinámico**

Se utilizó un electrodo de oxígeno disuelto (AppLiSens Z010032520, 325 mm de longitud, Applikon) para la determinación del  $k_{La}$ . El electrodo fue acoplado a un controlador modelo ADI1010 Bio controller de la marca Applikon para monitorear el oxígeno disuelto en la fase líquida. Los datos obtenidos durante el método dinámico fueron tomados cada 5 segundos y el cálculo del coeficiente de transferencia de masa fue de acuerdo a Fuchs y Riu, 1971, donde se considera el tiempo de respuesta del electrodo. Se obtuvo un tiempo de respuesta del electrodo de 22.6 segundos. Se estudió el efecto de las condiciones de operación: agitación (400, 700 y 1000 RPM), aireación (0.5, 0.75 y 1.0 vvm), y fracción de líquido iónico (5, 12.5 y 20 % v/v) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

#### **IV.8.3 Determinación del coeficiente de transferencia de masa de cetonas y lactonas ( $k_{LS}$ y $k_{LP}$ ) mediante la celda de Lewis modificada**

Para determinar el coeficiente de transferencia de masa de cetonas y lactonas se empleó una celda de Lewis modificada, con una área interfacial conocida y constante. Se probaron diferentes velocidades de agitación (80, 110, 140, 170 y 200 RPM) en el impulsor (diámetro 3.4 cm) de la fase acuosa. Como fase acuosa se utilizó agua destilada, la cual fue previamente saturada con el líquido iónico a 30°C.

Para el control de la temperatura se usó un baño con un recirculador a 30 °C, se hizo pasar agua a 30°C a través de la chaqueta de la celda de Lewis modificada antes de los ensayos. La celda fue preparada con volúmenes iguales de líquido iónico y agua destilada saturada con líquido iónico (180 mL). En estos estudios sólo se utilizó el líquido iónico

[OMA][BTA], el cual fue previamente seleccionado por su biocompatibilidad. Primero se colocó el líquido iónico, pues es la fase que tiene mayor densidad y posteriormente se añadió la fase acuosa lentamente cuidando de no perturbar la interfase. También se preparó una solución acuosa de sustrato (cetonas) y producto (lactonas).

Se añadió un pulso de 2 mL de la solución de cetonas y lactonas en la parte superior de la fase acuosa, después se tomaron muestras de 1 mL de la fase acuosa en la parte superior de la celda, desde el tiempo 1 hasta los 25 minutos, para observar el cambio de concentración debida a la transferencia de masa de la fase acuosa a la fase líquido iónico. Posteriormente las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases (ver sección IV.3).

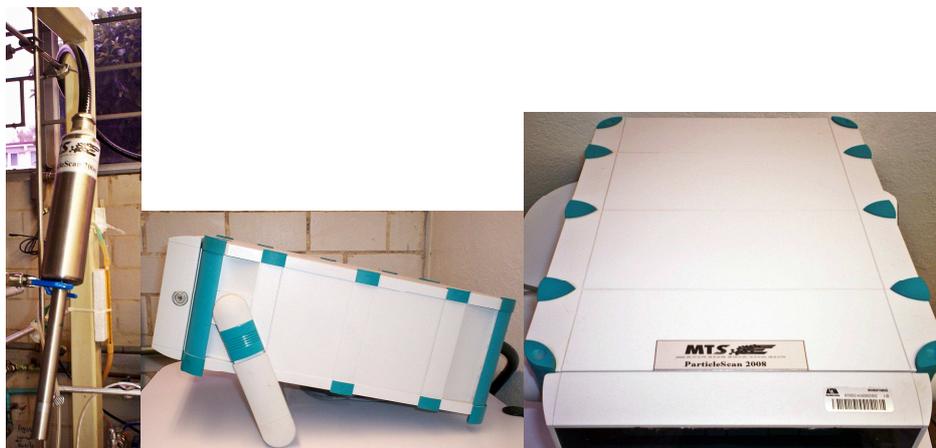
#### **IV.8.4 Medición del diámetro promedio de gota *Sauter* $d_{32}$**

El diámetro promedio de gota *Sauter*  $d_{32}$  fue medido usando un Medidor de Reflectancia Óptica (3D ORM) analizador de partículas (MTS, Messtechnik Schwartz) (**Figura IV. 6**) (Cull *et al.*, 2002; Lovick *et al.*, 2005). La sonda se colocó dentro del reactor ADI 1010 Bio controller Applikon de tal forma que las gotas de líquido iónico pasaran frente a la sonda. Se determinaron 4000 cuentas de diámetro de gota por cada medición, permitiendo calcular el diámetro promedio de gota *Sauter*  $d_{32}$  definido como:

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3 \cdot n_i}{\sum d_i^2 \cdot n_i} \quad (\text{IV.4})$$

El diámetro de gota y la distribución del diámetro de gota del líquido iónico fueron obtenidos *in situ* y *on-line* en todos los experimentos. Debido a que el ORM mide el tamaño de gotas por la reflectancia de un rayo láser y el hecho de que las burbujas de gas no tienen propiedades de reflectancia, se asumió que las burbujas de gas no interfirieron con las medidas

del tamaño de las gotas del líquido iónico. No hay evidencia de ninguna interferencia en ninguno de las distribuciones de tamaño y como consecuencia, las mediciones del tamaño de gota fueron tomadas directamente del sistema trifásico. Las mediciones fueron tomadas al menos 15 minutos después de que se había iniciado la agitación, con el objetivo de que la distribución de tamaño de gotas hubiera alcanzado el equilibrio.



**Figura IV. 7 Medidor de Reflectancia Óptica (3D ORM) analizador de partículas (MTS, Messtechnic Schwartz)**

#### **IV.8.5 Diseño experimental de superficie de respuesta**

Para estudiar el efecto de las tres variables de operación aireación, agitación y fracción de fase dispersa sobre las dos variables de respuesta coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ) y el diámetro de gota promedio (*Sauter*  $d_{32}$ ), se utilizó un diseño central compuesto, con 4 puntos axiales con un  $\alpha=1$ . Se realizaron un total de 32 experimentos para cada líquido iónico, con 3 factores independientes, cada factor en 3 niveles, con 3 puntos centrales y 15 réplicas. Un modelo polinomial de segundo orden proporcionó el mejor ajuste para los datos experimentales. Para la metodología de los experimentos de la superficie de

respuesta (RSM), se usó el software de diseño de experimentos “Fusion Pro” (versión 6.7.0, USA) para el análisis de la regresión y las gráficas de los resultados experimentales.

#### **IV.9 Planteamiento de un modelo matemático**

Con el objetivo de modelar la biotransformación en un biorreactor de partición, se realizaron los balances de sustrato, producto y oxígeno en el sistema propuesto, formando las ecuaciones que podrían predecir el comportamiento de un sistema multifásico durante la biotransformación de cetonas a lactonas. El planteamiento, las consideraciones y el desarrollo del modelo matemático se presentan en la sección V.6.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

### V.1 Biocompatibilidad de los líquidos iónicos con *E. coli* TOP10pQR239

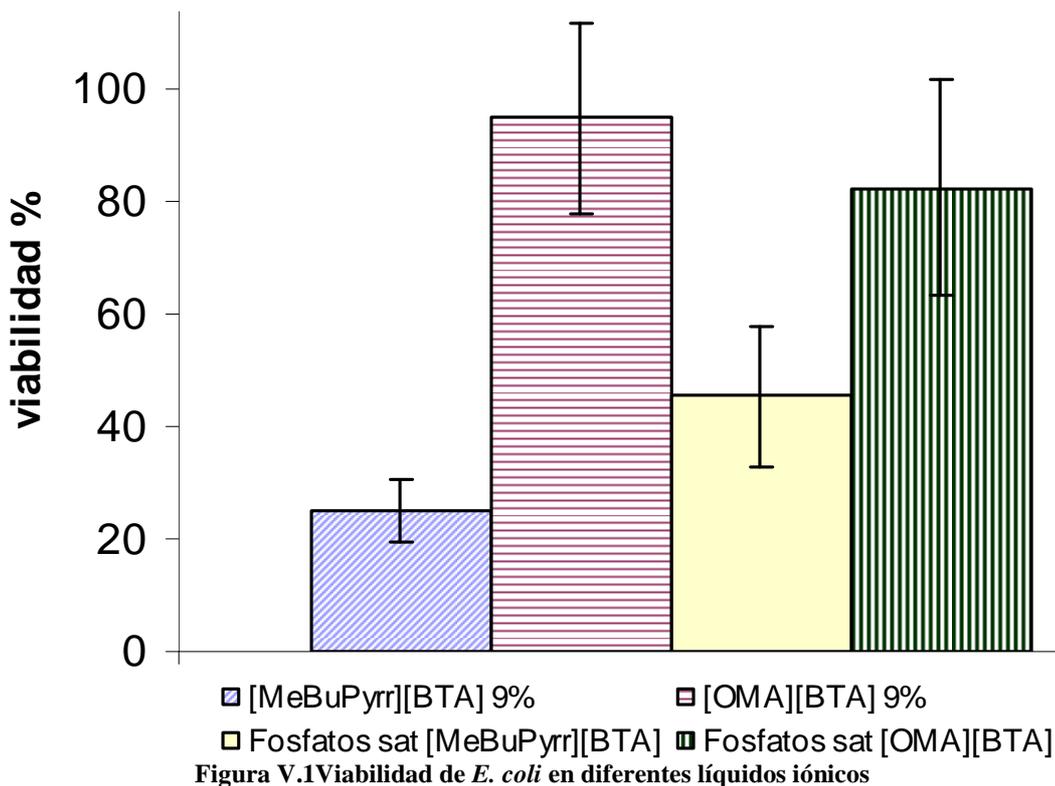
La adición de una segunda fase líquida al sistema de bioconversión, requiere que esta fase tenga ciertas características tales como: formar dos fases y ser biocompatible. Se observó que los líquidos iónicos estudiados no son completamente inmiscibles en agua. Los experimentos de solubilidad mostraron que estos son parcialmente solubles, siendo el líquido iónico [MeBuPyrr][BTA] más soluble ( $5.4 \text{ g L}^{-1}$ ), que el [OMA][BTA] ( $0.02 \text{ g L}^{-1}$ ).

Por otro lado, de los experimentos de viabilidad de *E. coli* en presencia de líquido iónico, se obtuvo que el [MeBuPyrr][BTA] resultó ser el líquido iónico menos biocompatible (ver **Figura V.1**) al reducir la viabilidad de las células hasta un 25% (en el sistema bifásico), a diferencia del [OMA][BTA] que sólo reduce la viabilidad al 94%. Al comparar el efecto de la presencia de una segunda fase líquida con respecto a un sistema de una sola fase, no se observaron diferencias significativas entre la solución de fosfatos saturada con [OMA][BTA] y cuando se tienen el [OMA][BTA] al 9% v/v (sistema bifásico), por lo que posiblemente el mayor efecto en la biocompatibilidad esté relacionado con la biodisponibilidad del líquido iónico. Es decir la mayor solubilidad del [MeBuPyrr][BTA] afecta de manera significativa la viabilidad de las células de *E. coli*.

Las moléculas disueltas del líquido iónico podrían ocasionar inhibición enzimática, desnaturalización de las proteínas y/o modificación de la membrana celular debido a la acumulación del solvente (Matsumoto *et al.*, 2004).

Recientemente, Pfruender *et al.* (2006) estudiaron la biocompatibilidad de los líquidos iónicos [OMA][BTA] y [BMIM][PF<sub>6</sub>] con la cepa *E. coli* K12 (DSM 498). En este estudio los líquidos iónicos estudiados no mostraron un efecto perjudicial sobre la membrana celular de

*E. coli* K12 (DSM 498). El líquido iónico [OMA][BTA] presentó una buena biocompatibilidad (70% de viabilidad de las células, después de un tiempo de exposición de 5 h en un sistema bifásico); sin embargo, no se discutió la importancia de la solubilidad de los líquidos iónicos en agua.



## V.2 Propiedades físico-químicas de los líquidos iónicos empleados: [OMA][BTA] y [MeBuPyrr] [BTA]

Las propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos evaluados en este trabajo se muestran en la **Tabla V.1**. Los valores de viscosidad y tensión interfacial para [OMA][BTA] son en general un orden de magnitud mayor que los reportados para el líquido iónico comúnmente empleado [BMIM][PF<sub>6</sub>] (Torres-Martínez *et al.*, 2009).

**Tabla V.1 Propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos empleados**

	[OMA][BTA]	[MeBuPyrr] [BTA]
Densidad (kg m <sup>-3</sup> ) <sup>(4)</sup>	1,101	1,389
Viscosidad (kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>(3)</sup>	0.30	0.04
Tension Interfacial (kg s <sup>-2</sup> ) <sup>(3)</sup>	0.0197	0.0114
Solubilidad máxima (g L <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	0.02	5.4
Coefficiente de partición del Sustrato (Bicyclo [3.2.0] hept-2-en-6-one) <sup>(3)</sup>	25.5±0.47	25.8±0.47
Coefficiente de partición del Producto (mezcla de lactonas bicíclicas) <sup>(3)</sup>	6.7±0.93	13.3±0.12

(1) Saturado con agua destilada.

(2) Saturado con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 7.

(3) Saturado con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 7 y 10g glicerol L<sup>-1</sup>.

(4) Valores para líquidos iónicos puros tomada de Solvent Innovation (Alemania) hoja de datos.

Una medida de la afinidad del sustrato y producto por la fase líquido iónico es el coeficiente de partición, en este caso el coeficiente de partición se define como la concentración de sustrato o producto en el líquido iónico, entre la concentración de sustrato o producto presente en la fase acuosa cuando se tienen volúmenes iguales de fase líquido iónico y de fase acuosa. En la **Tabla V.1** se observa que el coeficiente de partición de sustrato y producto es mayor a uno en los dos líquidos iónicos estudiados, por lo que el sustrato y producto resultaron ser más afines a la fase líquido iónico que a la fase acuosa. De esta forma los líquidos iónicos estudiados pueden funcionar como reservorio de sustrato, y desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de producto.

El coeficiente de partición es un criterio para la selección de un líquido iónico debido a que está relacionado con la capacidad del líquido iónico de disminuir la concentración de sustrato o producto tóxicos en la fase acuosa (Bräutigam *et al.*, 2009). Se han reportado diferentes valores de coeficientes de partición para sistemas bifásicos líquido iónico-fase acuosa. Lou *et al.* (2005) reportan un coeficiente de partición de 55.1 para acetiltrimetilsilano (sustrato de la biotransformación) y de 8.8 para (S)-1-trimetilsililetanol (producto) en el sistema bifásico [BMIM][PF<sub>6</sub>]/amortiguador en una biotransformación donde usaron células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador. En la biotransformación de 2-octanona a (R)-2-octanol en un sistema bifásico [MeBuPyr][BTA]/amortiguador, se obtuvo un coeficiente de partición para 2-octanona y (R)-2-octanol de 798 y 158, respectivamente (Bräutigam *et al.*, 2009). Para solventes orgánicos se han reportado coeficientes de partición más bajos a los obtenidos en esta tesis, por ejemplo en la biotransformación de tolueno a 3-metilcatecol en un sistema bifásico (bis (2-etilhexil) ftalato)/ fase acuosa), Prpich y Daugulis (2007) obtuvieron un coeficiente de partición de 4.5 para 3-metilcatecol.

### **V.3 Hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores de partición**

Una característica de los biorreactores de partición es promover mayores velocidades de transferencia de masa de acuerdo a la demanda metabólica de las células. Sin embargo, para sistemas multifásicos, particularmente los que operan con líquido iónico hay poca información disponible acerca de la hidrodinámica para sustentar el diseño y operación del biorreactor. El objetivo de esta parte de la tesis fue estudiar la hidrodinámica y las

características de la transferencia de oxígeno de un biorreactor de partición tipo tanque agitado de un sistema trifásico (aire-acuoso-líquido iónico).

Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados a correlaciones empíricas relacionadas con valores de  $d_{32}$  y  $k_L a$  a potencia gaseada y otros parámetros operacionales del biorreactor.

### **V.3.1 Potencia consumida, Número de Reynolds, y Número de Weber para sistemas multifásicos**

Los resultados obtenidos para los experimentos de hidrodinámica usando [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA] se presentan en la **Tabla V.2**. En todos los experimentos estudiados el régimen de flujo fue turbulento basado en los cálculos de los números de Reynolds. Los números de Reynolds calculados fueron basados en la viscosidad de la fase continua y los valores obtenidos fueron entre 13,600 y 34,200.

Tal como se esperaba para las dos dispersiones de líquidos iónicos, se observó un aumento sobre el valor de  $P_g/V$  al incrementarse la agitación. Por otro lado, los valores de  $P_g/V$  disminuyeron al incrementarse la aireación como se ha observado para un sistema de una sola fase líquida y aire (Moo-Young y Blanch, 1981; Bailey y Ollis, 1986). Este efecto puede ser consecuencia de una disminución de la densidad promedio del fluido que es agitado (Bailey y Ollis, 1986).

**Tabla V.2 Condiciones de operación y resultados obtenidos para [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA].**

Condiciones de operación				[OMA][BTA]		[MeBuPyrr][BTA]	
$\phi$	RPM ( $\text{min}^{-1}$ )	vvm ( $\text{min}^{-1}$ )	* $N_{Re}$	$P_g/V$ ( $\text{W m}^{-3}$ )	$N_{We}$	$P_g/V$ ( $\text{W m}^{-3}$ )	$N_{We}$
0.050	400	0.50	13,680	4,650	210	1,629	362
		1.00	13,680	3,066	210	1,098	362
	700	0.75	23,941	7,907	642	5,478	1,110
		1,000	0.50	34,201	15,355	1,311	14,618
0.125	400	0.75	13,680	3,010	210	1,349	362
		0.50	23,941	7,582	642	6,940	1,110
	700	0.75	23,941	7,423	642	5,883	1,110
		1.00	23,941	6,249	642	5,256	1,110
0.200	400	0.75	34,201	14,732	1,311	14,373	2,265
		0.50	13,680	3,890	2100	1,674	362
	700	1.00	13,680	3,282	2100	1,229	362
		0.75	23,941	7,759	642	6,051	1,110
1,000	0.50	34,201	16,145	1,311	17,552	2,265	
	1.00	34,201	15,969	1,311	13,397	2,265	

\* $N_{Re}$  de la fase continua

En el intervalo estudiado, no se observó un efecto de la fracción de fase dispersa sobre  $P_g/V$ . El orden de magnitud de los valores de  $P_g/V$  fue similar a los alcanzados por Nielsen *et al.* (2003) usando un biorreactor de 2-L New Brunswick Bioflo I ( $H_L/D_T=0.96$ ;  $D_i/D_T=0.45$ ) con un volumen de trabajo de 1 L y una dispersión de 2 fases líquidas formadas por agua y n-hexadecano cuando fue agitado por dos turbinas Rushton de 6 paletas.

La relación entre fuerzas inerciales y fuerzas coalescentes, está representada por el número de Weber ( $N_{We}$ ), los valores obtenidos fueron diferentes para los dos líquidos iónicos estudiados debido a sus diferentes valores de la tensión interfacial (**Tabla V.1**):  $200 < N_{we} < 1300$  para [OMA][BTA],  $360 < N_{we} < 2265$  para [MeBuPyrr][BTA]. Las diferencias en tensión interfacial y la viscosidad del líquido iónico probablemente permitieron un balance

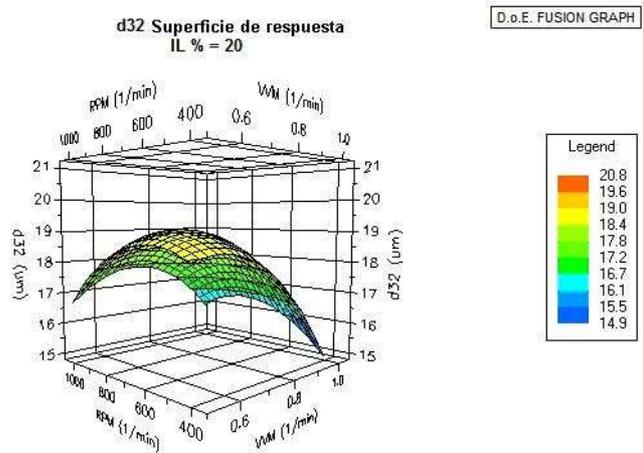
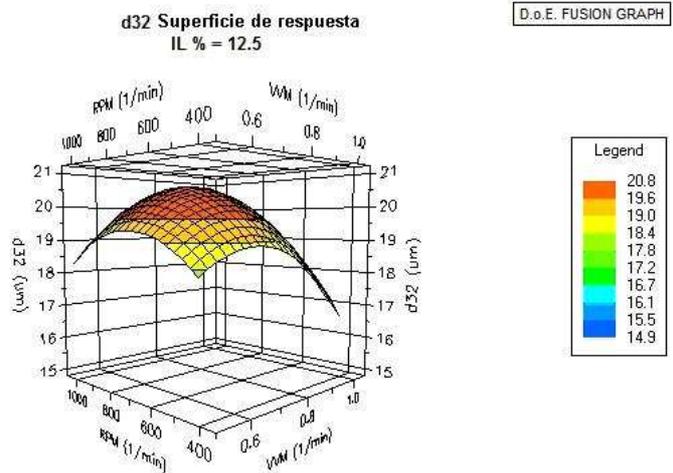
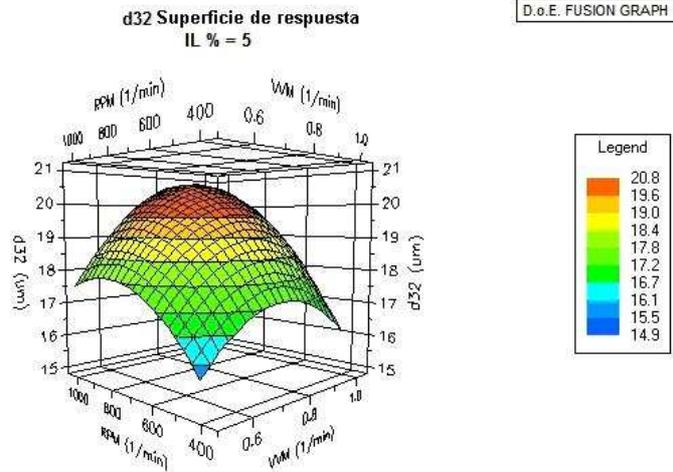
diferente entre rompimiento de gotas y el fenómeno de coalescencia para cada fase dispersa de líquido iónico.

### **V.3.2 Efecto de las variables de operación sobre el diámetro Sauter $d_{32}$ para [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA]**

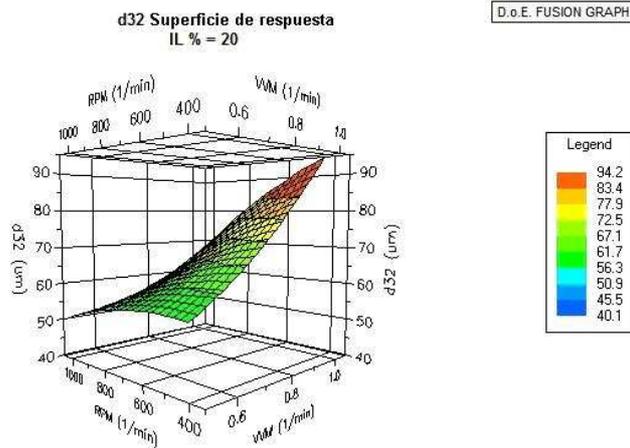
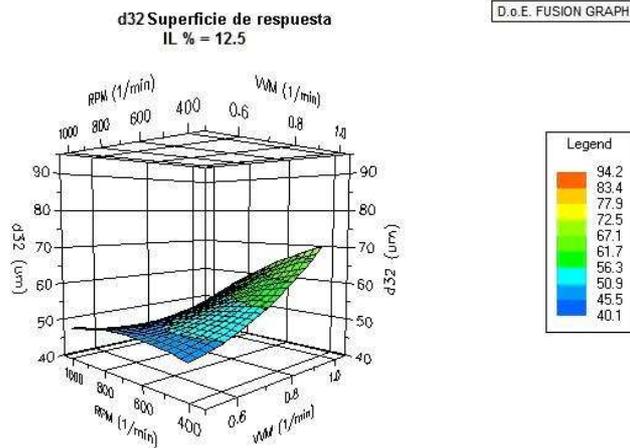
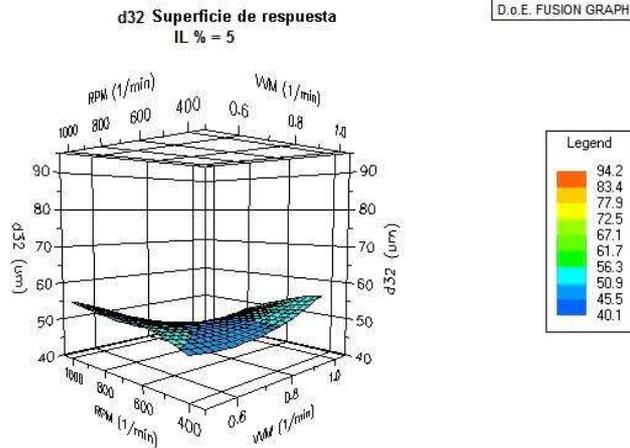
La relación entre los tamaños de gota promedio Sauter  $d_{32}$  obtenidos para cada líquido iónico en función de la velocidad de agitación y aireación se pueden apreciar en la **Figura V.2** y en la **Figura V.3**. El líquido iónico con la mayor viscosidad (un orden de magnitud) y tensión interfacial ([OMA][BTA] véase **Tabla V.1**) generó valores de  $d_{32}$  entre 2 a 5 veces menores que los observados para [MeBuPyrr][BTA]. Las gráficas de superficie de respuesta muestran un máximo en  $d_{32}$ .

La viscosidad de la fase dispersa utilizando solventes orgánicos tiene una profunda influencia sobre el diámetro promedio gota y la distribución de tamaño de gota (Calabrese *et al.*, 1986). Para [OMA][BTA] se observó una disminución generalizada en los valores de  $d_{32}$  con el incremento de la fracción volumétrica de líquido iónico.

Recientemente, Marcelis *et al.* (2003) encontraron que la viscosidad de las diferentes fases oleosas que probaron ser el parámetro más importante que gobierna la velocidad de transferencia de masa en un sistema multifásico de un biorreactor de partición, mientras que la densidad y tensión interfacial resultaron ser de menor importancia. Lo anterior debido probablemente a que la transferencia de masa es directamente proporcional al área de transferencia, es decir, al diámetro de gota.



**Figura V.2 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de  $d_{32}$  para [OMA][BTA]**



**Figura V.3 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de  $d_{32}$  para [MeBuPyrr][BTA]**

Para correlacionar los datos experimentales de  $d_{32}$  con las variables de operación estudiadas para un sistema trifásico se utilizó la ec. (V.1) (Torres-Martínez *et al.*, 2009). Esta ecuación incluye la tensión interfacial y la fracción volumétrica de la fase dispersa.

$$\frac{d_{32}}{D_i} = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta N_{we}^\gamma (1-\phi)^\varepsilon \quad (\text{V.1})$$

Donde  $D_i$  representa el diámetro del impulsor (m),  $P_g$  (W) la potencia consumida del biorreactor aireado,  $V$  (m<sup>3</sup>) volumen del líquido del biorreactor,  $v_s$  (m s<sup>-1</sup>) velocidad superficial del gas a través del biorreactor,  $\phi$  la fracción volumétrica de la fase dispersa, y  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\varepsilon$  son constantes numéricas. Todos los datos experimentales fueron ajustados a ec. (V.1) usando el programa Polymath<sup>TM</sup>. Los valores de los parámetros obtenidos para las constantes del modelo para cada líquido iónico y los coeficientes de correlación son mostrados en la **Tabla V.3**.

**Tabla V.3 Parámetros establecidos para la correlación del  $d_{32}$ .**

Parámetro	[OMA][BTA]	[MeBuPyr] [BTA]
$\delta$	$7.66 \times 10^{-4}$	$7.55 \times 10^{-3}$
$\alpha$	-0.420	-0.338
$\beta$	-0.115	0.213
$\gamma$	0.373	0.319
$\varepsilon$	0.409	-2.191
$r^2$ (*)	0.35	0.62
$\frac{d_{32}}{D_i} = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta N_{we}^\gamma (1-\phi)^\varepsilon$		

(\*)Coeficiente de correlación

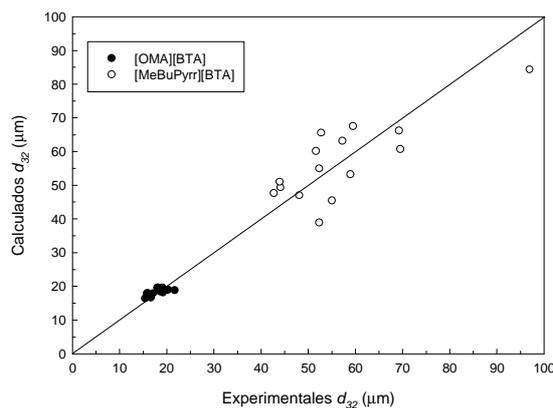
En la **Tabla V.3** se observa que los valores de los parámetros son diferentes para cada líquido iónico, lo cual sugiere su dependencia de las propiedades fisicoquímicas de la fase

dispersa. Cabe señalar que los valores de los exponentes del número de Weber para [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA] fueron muy diferentes a -0.6, valor previamente reportado (Calabrese *et al.*, 1986) para fracciones volumétricas pequeñas considerando correlaciones empíricas similares (ec. V.2). Esta diferencia se debe probablemente a que fue probada en un sistema bifásico y que el coeficiente  $A$  tiene de manera implícita factores geométricos y condiciones de operación los cuales aparecen de manera más explícita en la ec. (V.1).

$$\frac{d_{32}}{D_i} = AN_{We}^{-0.6} \quad (V.2)$$

Donde  $A = f(D_i / D_T, P, \phi)$  y  $N_{we} = \rho_c N^2 D_i^3 / \sigma$ .

El bajo coeficiente de correlación (véase **Tabla V.3**) para [OMA][BTA] probablemente es consecuencia de su alta viscosidad (7.5 veces mayor que [MeBuPyrr][BTA]) y baja solubilidad (270 veces menor que [MeBuPyrr][BTA]). Lo cual sugiere que las variaciones de estas propiedades fisicoquímicas de la fase dispersa afectan el fenómeno de rompimiento-coalescencia de las gotas.



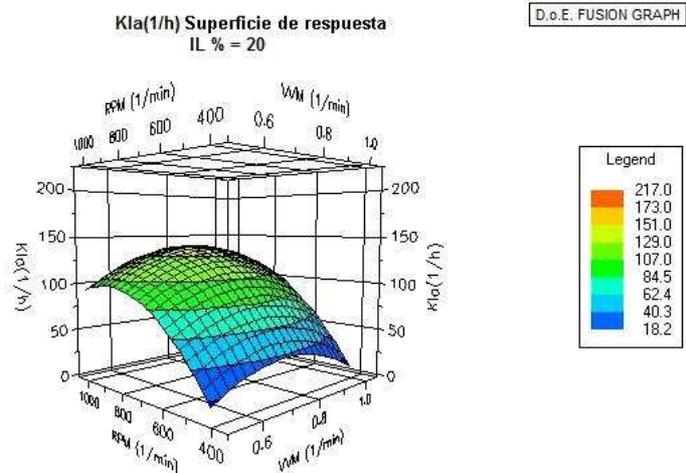
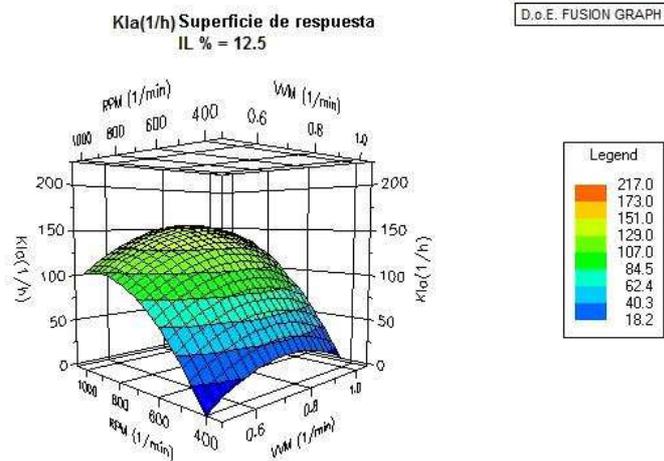
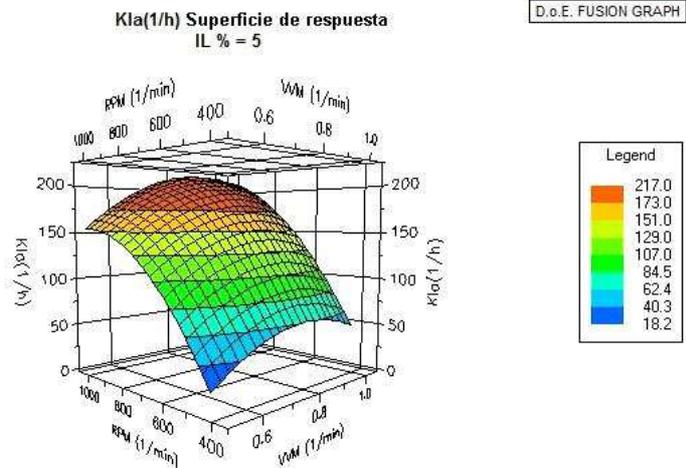
**Figura V.4** Tamaño de gota  $d_{32}$ , gráfica de paridad de los valores experimentales & valores calculados de las correlaciones usando los parámetros mostrados en la **Tabla V.3** (●)[OMA][BTA] y (○)[MeBuPyrr][BTA]

La **Figura V.4** muestra la gráfica de paridad de valores experimentales versus calculados de las correlaciones usando los parámetros calculados para cada líquido iónico. Se observa que la mayoría de los valores predichos parecen no estar bien distribuidos alrededor de los datos experimentales probablemente indicando que para [OMA][BTA] en particular el modelo no representa muy bien el grupo de los datos obtenidos a valores bajos del  $N_{we}$ . Para el líquido iónico [MeBuPyr][BTA] se obtuvo una correlación aceptable para los propósitos del diseño de procesos.

### **V.3.3 Efecto de las variables de operación sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ )**

El efecto de las condiciones de operación del biorreactor y la fracción volumétrica de la fase dispersa sobre los valores experimentales de  $k_La$  para los líquidos iónicos [OMA][BTA] y [MeBuPyr][BTA] se presentan en las **Figuras V.5** y **V.6**, respectivamente.

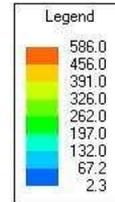
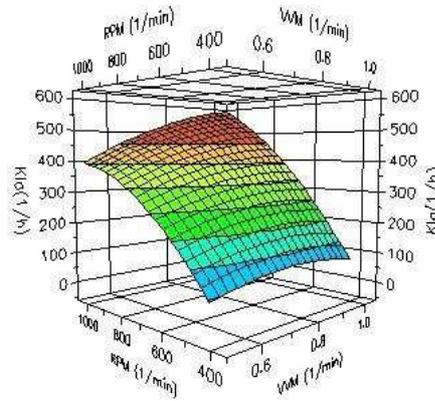
Para los dos líquidos iónicos empleados, los valores de  $k_La$  se incrementan a medida que se aumenta las velocidades de agitación y aireación como sería esperado en la mayoría de los sistemas bifásicos gas-líquido. Los valores de  $k_La$  máximos alcanzados para [OMA][BTA] son alrededor de 200  $h^{-1}$  a una fracción volumétrica del 5%, los cuales resultaron ser 2 veces menores que los medidos en presencia del líquido iónico [MeBuPyr][BTA], para el cual se alcanzaron valores mayores a 500  $h^{-1}$ . La explicación para este comportamiento no es clara, sin embargo podría estar relacionada a las gotas pequeñas formadas por el [OMA][BTA] (**Figura V.2**) comparadas con el [MeBuPyr][BTA] (**Figura V.3**) debido al impacto que tienen las gotas sobre las dispersión líquido-gas (McMillan y Wang, 1990; Aldric *et al.*, 2009) y a la mayor viscosidad del [OMA][BTA].



**Figura V.5 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de  $k_L a$  para [OMA][BTA]**

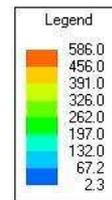
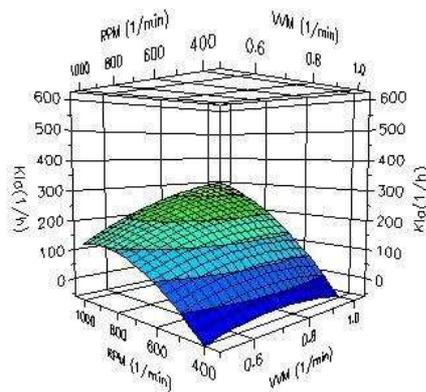
Kla(1/h) Superficie de respuesta  
IL % = 5

D.o.E. FUSION GRAPH



Kla(1/h) Superficie de respuesta  
IL % = 12.5

D.o.E. FUSION GRAPH



Kla(1/h) Superficie de respuesta  
IL % = 20

D.o.E. FUSION GRAPH

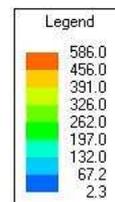
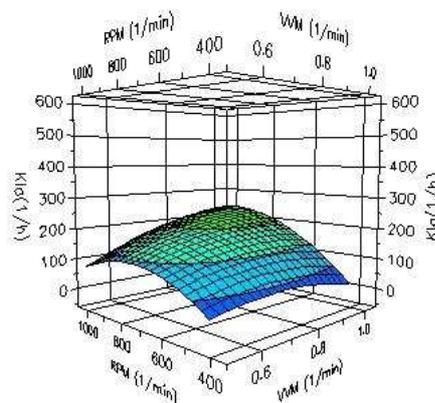


Figura V.6 Efecto de la aireación, agitación y fracción volumétrica de líquido iónico, valores experimentales de  $k_La$  para [MeBuPyrr][BTA]

Para los líquidos iónicos estudiados, se observa una disminución de los valores experimentales de  $k_La$  cuando se incrementa la fracción volumétrica de líquido iónico de 5 al 20%. Para [OMA][BTA] y [MeBuPyrr][BTA], esta disminución en  $k_La$  fue aproximadamente un orden de magnitud bajo las mismas condiciones de operación.

Nielsen *et al.* (2003) examinó el efecto de incrementar la fracción volumétrica sobre el  $k_La$  utilizando n-hexadecano como la segunda fase líquida en un sistema multifásico. En contraste a nuestro estudio, estos autores encontraron que el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno aumenta cuando la fracción volumétrica de la fase orgánica se incrementó. Esto fue atribuido a la adición de una segunda fase inmiscible con una solubilidad de oxígeno mucho mayor comparado con la del agua, incrementando el nivel general de la solubilidad del oxígeno en el sistema.

Nielsen *et al.* (2005) considerando el mismo sistema bifásico acuoso-orgánico, usan un modelo de transferencia de masa en dos fases considerando los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno tanto para la fase acuosa como para la fase orgánica, mostrando claramente el potencial de la adición de una fase orgánica para el incremento de la transferencia de masa de oxígeno, lo cual es una de las motivaciones para emplear una segunda fase líquida en un biorreactor de partición.

Recientemente Gomes *et al.*, 2007, afirman que la presencia de una fase orgánica (ricinoleato de metilo) en el medio incrementa el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ), pero este efecto es contrario cuando el medio contiene un surfactante como el Tween 80.

Usando una correlación para dispersiones multifásicas previamente discutida por diferentes autores (Nielsen *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2007), los valores experimentales de  $k_L a$  obtenidos en este trabajo se ajustaron a la ec. (V.3) usando el software Polymath™.

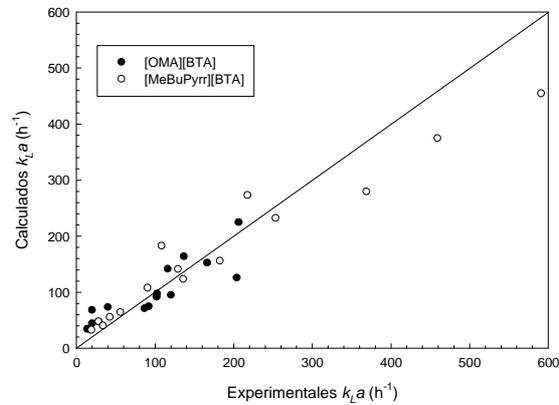
$$k_L a = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)(1-\phi)^\gamma \quad (\text{V.3})$$

Los valores de los parámetros estimados y los coeficientes de la correlación obtenidos para los dos líquidos iónicos se presentan en la **Tabla V.4**. Los valores calculados para  $\alpha$  y  $\beta$  sugieren que hay diferentes mecanismos de coalescencia y rompimiento de burbujas de gas para cada líquido iónico como se observó para los valores experimentales de  $d_{32}$ . Por ejemplo, con [OMA][BTA], los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  (aproximadamente 0.7 y 0.5 respectivamente) podrían indicar un ambiente coalescente en un reactor agitado con una turbina Rushton (turbina de disco de 6 paletas planas) como fue sugerido por Moo-Young y Blanch, 1981. Sin embargo para [MeBuPyrr][BTA] los valores calculados de  $\alpha$  y  $\beta$  no indican si existe un comportamiento coalescente o no coalescente.

**Tabla V.4 Parámetros establecidos para la correlación del  $k_L a$ .**

Parámetro	[OMA][BTA]	[MeBuPyrr] [BTA]
$\delta$	$2.20 \times 10^{-3}$	$6.88 \times 10^{-3}$
$\alpha$	0.741	0.815
$\beta$	0.556	0.636
$\gamma$	3.270	2.651
$r^2$ (*)	0.76	0.94
$k_L a = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta (1-\phi)^\gamma$		

(\*) Coeficiente de correlación



**Figura V.7** Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $k_{La}$ , gráfica de paridad de los valores experimentales & valores calculados de las correlaciones usando los parámetros mostrados en la Tabla V.4 (●)[OMA][BTA] y (○)[MeBuPyr][BTA]

Los valores altos de los coeficientes de correlación indican una buena concordancia entre datos experimentales y las predicciones de la correlación usando los parámetros calculados en la **Tabla V.4**. La **Figura V.7** muestra la gráfica de paridad de valores experimentales versus valores predichos por la correlación. La mayoría de los valores predeterminados parecen estar bien distribuidos alrededor de los datos experimentales, lo cual indica una buena aproximación entre valores de  $k_{La}$  experimentales y los valores calculados por la correlación. La relación entre los valores de  $k_{La}$  predichos por las correlaciones y los valores experimentales presentan una dispersión similar reportada por otros autores (Nielsen *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2007) usando la ec. (V.3).

### V.3.4 Medición de los coeficientes de transferencia de masa en la celda de Lewis Modificada

La celda de Lewis modificada nos permite conocer los coeficientes convectivos de transferencia de masa de sustrato y producto en sistemas bifásicos, en este caso en un sistema

acuoso-líquido iónico, el cual puede ser usado como medio de reacción para las biotransformaciones tipo Baeyer-Villiger. La celda de Lewis cuenta con un área interfacial conocida ( $18.5 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ ) que calculamos a partir del diámetro interno de la celda. Con esto podemos separar el  $k_L$  del  $k_L \bar{a}$ .

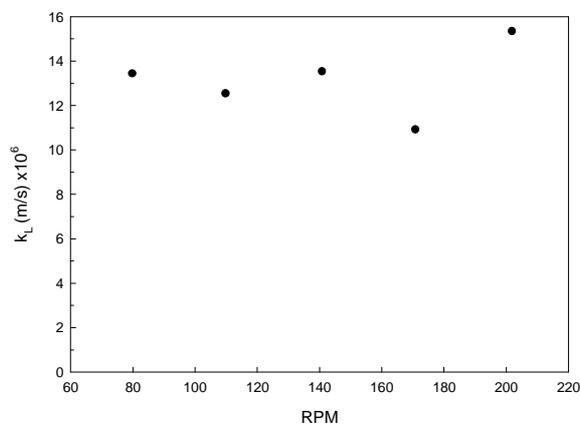
Para poder calcular el  $k_L \bar{a}$  de la celda partimos de la siguiente ecuación diferencial que describe la transferencia de masa en la celda modificada de Lewis.

$$\frac{dC}{dt} = -k_L \bar{a} (C - C_f) \quad (\text{V.4})$$

Donde  $C$  es la concentración en la fase acuosa de la molécula que se transporta a través de la interfase líquido-líquido,  $C_f$  es la concentración de la molécula en la fase acuosa en el equilibrio con la fase líquido iónico, es decir, cuando la transferencia de masa neta es igual a cero, y  $k_L \bar{a}$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa para la Celda modificada de Lewis. Integrando la ec. (V.4) a partir del tiempo inicial y la concentración inicial obtenemos:

$$\ln \frac{(C - C_f)}{(C_0 - C_f)} = -k_L \bar{a} (t - t_0) \quad (\text{V.5})$$

Se probaron diferentes velocidades de agitación (80, 110, 140, 170, 200 RPM) en la fase acuosa, mientras que en la fase líquido iónico no hubo agitación debido a que la interfase fácilmente se deformaba cuando se agitaba el líquido iónico ([OMA][BTA]) esto probablemente sea consecuencia de la alta viscosidad de este líquido iónico,  $0.30 \text{ Kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Los valores de  $k_L$  obtenidos experimentalmente para el sustrato se presentan en función de la velocidad de agitación en la fase acuosa en la **Figura V.8**



**Figura V.8** Valores de  $k_L$  experimentales obtenidos para cetonas (sustrato) a 30 °C usando [OMA][BTA] 180 mL y 180 mL de fase acuosa (fosfatos 50 mM pH7 suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol)

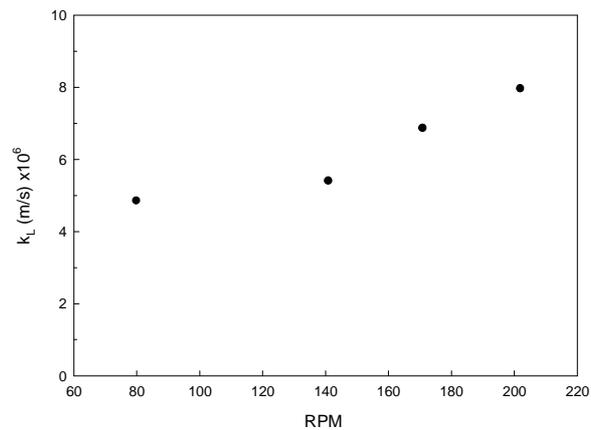
El valor máximo de  $k_L$  experimental obtenido para sustrato fue de  $1.53 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$  a una agitación de 200 RPM. En todos los experimentos se buscó tener una interfase plana bien definida, ésta es la razón por la cual no se probaron velocidades de agitación mayores que pudieran perturbar la interfase. En el intervalo de velocidades de agitación estudiadas no se observa un cambio importante en los valores de  $k_L$  de sustrato, es decir, los coeficientes de transferencia de masa medidos en la Celda modificada de Lewis fueron poco sensibles a la velocidad de agitación en la fase acuosa.

Los valores de  $k_L$  experimentales para producto resultaron ser 2 veces menores que los que se obtuvieron para sustrato (**Figura V.9**), esto probablemente se deba a las diferentes propiedades fisicoquímicas del sustrato y producto, como son: el coeficiente de partición y la difusividad.

Se estimó el coeficiente de difusividad de sustrato y producto utilizando la correlación de Wilke-Chang (Bird *et al.*, 2010), ver Anexo 4.

$$\mathcal{D}_{\text{sustrato, agua}} = 0.7888 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$$

$$\mathcal{D}_{\text{producto, agua}} = 0.7434 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$$



**Figura V.9** Valores de  $k_L$  experimentales obtenidos para producto a 30 °C usando [OMA][BTA] 180 mL y 180 mL de fase acuosa (fosfatos 50 mM pH7 suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol)

Analizando la correlación de Wilke-Chang (Anexo 4) se observa que el tamaño de las moléculas de soluto es inversamente proporcional al coeficiente de difusión, de esta manera el producto al ser una molécula con mayor peso molecular tiene un coeficiente de difusividad menor que el sustrato. Lo cual concuerda con los valores de  $k_L$  obtenidos experimentalmente, es decir, aún estando bajo las mismas condiciones hidrodinámicas hay una diferencia en los valores de  $k_L$  de producto debido a que la diferencia del coeficiente de partición y del coeficiente de difusividad del producto son menores a las del sustrato.

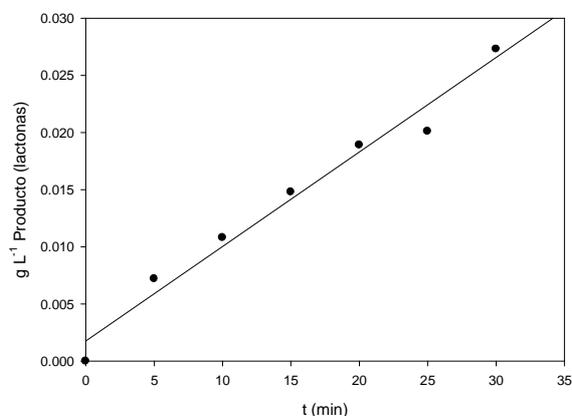
Los valores de  $k_L$  experimentales obtenidos para sustrato ( $10.9 \times 10^{-6}$  a  $15.3 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ ) fueron muy cercanos a los obtenidos por Woodley *et al.* (1991) para acetato de bencilo

( $11.1 \times 10^{-6}$  a  $21.9 \times 10^{-6}$  m s<sup>-1</sup>), en los que utiliza una celda modificada de Lewis utilizando como fase orgánica acetato de bencilo y como fase acuosa amortiguador de fosfatos. Las velocidades de agitación en ambas fases fueron de 260 RPM a 604 RPM. Srivastava *et al.* (2000), reportan valores de  $k_L$  de  $11 \times 10^{-6}$  y  $12 \times 10^{-6}$  m s<sup>-1</sup> para un sistema limoneno/agua/ ácido heptanoico donde el ácido heptanoico era la molécula que se transfería de la fase acuosa a la fase orgánica (limoneno). El valor del coeficiente de difusividad para ácido heptanoico en agua fue de  $0.68 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> calculado mediante la correlación de Wilke-Chang (Wilke *et al.*, 1955). La explicación a esta similitud entre los valores experimentales obtenidos de los coeficientes convectivos de transferencia de masa de sustrato y producto en este trabajo a otros coeficientes convectivos reportados en la literatura parece estar en función del coeficiente de difusividad.

#### **V.4 Modelado de la cinética de biotransformación tipo Baeyer-Villiger**

El objetivo de esta parte de la tesis fue desarrollar un modelo cinético de reacción que permita predecir la velocidad de biotransformación del tipo Baeyer-Villiger de la cetona bicíclica (±)-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona a sus correspondientes lactonas (1S, 5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona; 1R, 5S-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-en-2-ona). En la literatura está reportado el mecanismo de biorreacción Bayer-Villiger (Alphand *et al.*, 2003) y que esta biotransformación presenta inhibición por sustrato y producto (Doig *et al.*, 2002b); sin embargo, no se han reportado modelos cinéticos.

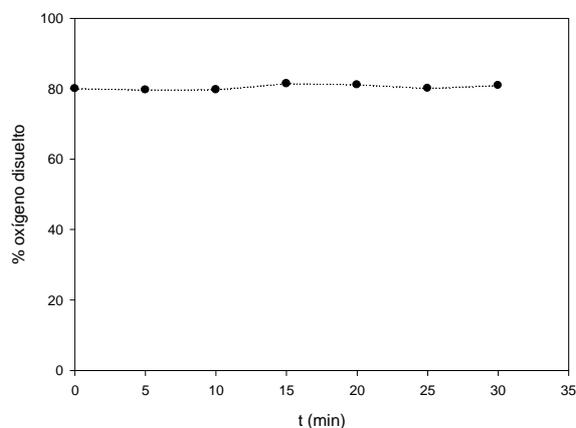
Para calcular la velocidad inicial de producción de lactonas se tomaron muestras del medio de reacción cada 5 minutos, durante el tiempo en que se tomaron las muestras siempre se obtuvo una producción lineal de lactonas, **Figura V.10**.



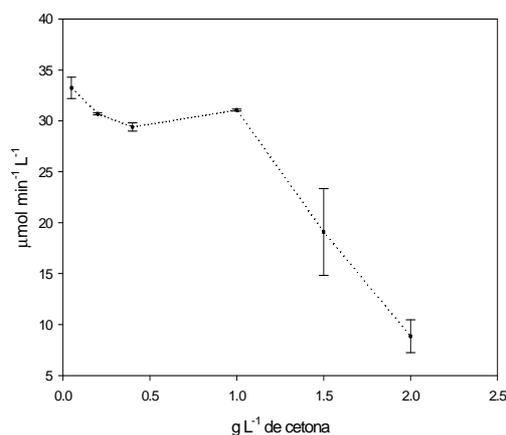
**Figura V.10** Cinética de producción de lactonas a  $2 \text{ g L}^{-1}$  de sustrato a  $37^\circ\text{C}$ , en amortiguador de fosfatos pH 7,  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol, usando  $1 \text{ gdw L}^{-1}$  de biocatalizador (*E. coli*),  $R^2=0.975$

El control de oxígeno disuelto se llevó a cabo modificando la velocidad del agitador magnético, la concentración de oxígeno disuelto se midió *in situ* y *on line* con un electrodo de oxígeno disuelto. Durante todos los experimentos la concentración oxígeno disuelto nunca fue limitante pues se mantuvo aproximadamente al 80 % de oxígeno disuelto (**Figura V.11**).

En la **Figura V.12** se presentan los datos de velocidad inicial de producción de lactonas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato para la reacción Baeyer-Villiger estudiada. Se observó que la biotransformación tiene inhibición por sustrato, alcanzándose el 50% de la mayor velocidad obtenida a la concentración de  $1.6 \text{ g L}^{-1}$ . Este comportamiento también fue reportado por Hilker *et al.* (2006), encontrando que a concentraciones de sustrato mayores a  $1 \text{ g L}^{-1}$  la biotransformación es altamente inhibida.



**Figura V.11** Oxígeno disuelto durante la biotransformación, a 2 g L<sup>-1</sup> de cetona

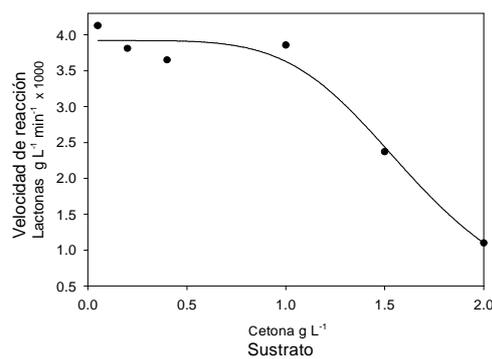


**Figura V.12** Efecto de la concentración de cetona sobre la velocidad inicial de producción de lactonas a 37°C, pH 7, 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes

La expresión cinética del tipo Aiba, (Aiba *et al.*, 1968) donde hay inhibición por sustrato, fue la que presentó mejor ajuste a los resultados experimentales, ec. (V.6). Donde  $V$ = velocidad de producción de lactonas g Producto L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>;  $V_{max}$ =velocidad máxima específica, g Producto gdw<sup>-1</sup>;  $X$ =concentración de biocatalizador gdw L<sup>-1</sup>;  $S$ =concentración de sustrato (cetona) g L<sup>-1</sup>;  $K_s$ =constante de afinidad, g L<sup>-1</sup>;  $K_i$ =constante de inhibición, g L<sup>-1</sup>.

$$V = \left( \frac{X * V_{\max} * S}{K_s + S} \right) * \exp\left( -\frac{S^3}{K_i} \right) \quad (\text{V.6})$$

Para realizar el ajuste no lineal se usó el algoritmo de Levenberg-Marquardt a través del software Sigma Plot 10.0, los valores de los diferentes parámetros del modelo fueron  $V_{\max}=0.004 \text{ g Producto gdw}^{-1}\text{min}^{-1}$ ,  $K_s=2.15 \times 10^{-11} \text{ g L}^{-1}$ ,  $K_i=6.71 \text{ g L}^{-1}$ , con una  $R^2=0.9524$ , **Figura V.13.** Çelik *et al.* (2004) utilizando un modelo de inhibición por sustrato del tipo Haldane obtuvieron un buen ajuste de los datos experimentales de la biotransformación de 2-feniletanol a 2-fenil acetaldehído con *Gluconobacter oxydans*. Sin embargo, el modelo de inhibición por sustrato de Haldane no se ajustó a los datos experimentales obtenidos en esta tesis, probablemente debido a que la reacción Baeyer-Villiger tiene un mecanismo de reacción más complejo que la oxidación de alcoholes. Además la disminución de la actividad podría deberse a una muerte celular por la toxicidad del sustrato (Hilker *et al.*, 2006), ya que la reacción no sólo depende de la presencia de la ciclohexanona monooxigenasa, de sustrato y de oxígeno sino que es necesario que la célula este metabólicamente activa para regenerar el NADP(H).



**Figura V.13** Efecto de la concentración de cetona sobre la velocidad inicial de producción de lactonas (●)Valores experimentales, (—) modelo cinético de reacción

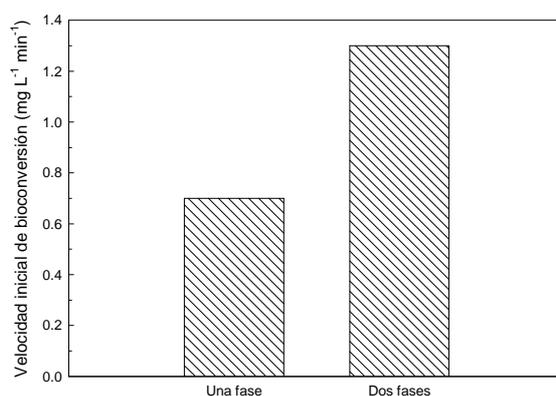
## V.5 Biotransformación tipo Baeyer-Villiger en un biorreactor de partición de tres fases utilizando [OMA][BTA]

Una vez caracterizada la hidrodinámica del sistema multifásico acuoso-líquido iónico-aire, seleccionado el líquido iónico más biocompatible ([OMA][BTA]) y después de haber analizado los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno a diferentes condiciones de operación, así como estimar experimentalmente los coeficientes convectivos de transferencia de sustrato y producto de manera indirecta en la celda de Lewis modificada, el siguiente paso fue llevar a cabo las cinéticas de biotransformación en un biorreactor de partición utilizando como fase dispersa [OMA][BTA], mediante la conjunción de todos estos elementos.

En la **Figura V.14** se muestra la comparación de las velocidades iniciales de biotransformación en una y dos fases líquidas a 30 °C, pH 7 en un biorreactor de 20 mL con agitación magnética. La fase acuosa fue amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol, 1 g L<sup>-1</sup> de cetona, con 1 gdw L<sup>-1</sup> de biocatalizador. Como segunda fase líquida, fase dispersa, se utilizó 20 %(v/v) de [OMA][BTA].

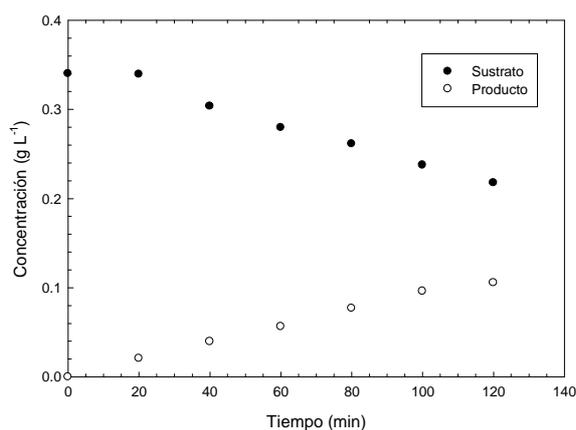
Se puede observar que la velocidad inicial se incrementa 1.86 veces en presencia de una segunda fase líquida. En este trabajo se alcanzó una tasa específica máxima de 0.078 g gdw<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la cual resultó ser 8.33 veces menor a lo reportado por Baldwin y Woodley (2006), que obtuvieron una productividad de 0.65 g gdw<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> con la misma cepa (*E. coli* TOP10 pQR239), probablemente debido a que crecieron la cepa en un medio complejo compuesto de extracto de levadura, glicerol, triptona, y NaCl, lo cual pudo haber incrementado la expresión de la enzima ciclohexanona monooxigenasa. En la **Figura V.15** se presenta la cinética de biotransformación en una fase (acuosa) durante 120 minutos. Los resultados muestran un

consumo de sustrato y generación de producto casi lineal, obteniéndose una productividad de  $0.053 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a las 2 horas de proceso.

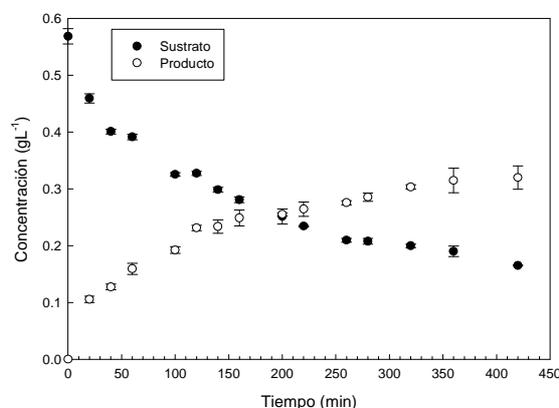


**Figura V.14** Velocidades iniciales de biotransformación en una y dos fases líquidas. Fase acuosa: amortiguador de fosfatos  $50 \text{ mM}$   $\text{pH}$  7, con  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. Fase dispersa [OMA][BTA]20% v/v, sustrato  $1 \text{ g L}^{-1}$  de cetona, biocatalizador  $1 \text{ g dw L}^{-1}$ . Biorreactor de  $20 \text{ mL}$  con agitación magnética a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$

En la **Figura V.16** se presenta la cinética de biotransformación en presencia de una segunda fase líquida (5% v/v). Se alcanzó una productividad de  $0.116 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a las 2 horas del proceso y una conversión del 50% después de 7 horas de biotransformación.



**Figura V.15** Cinética de biotransformación en fase acuosa: sustrato  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  de cetona en amortiguador de fosfatos  $50 \text{ mM}$   $\text{pH}$  7 suplementado con  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol a una concentración de biocatalizador de  $3 \text{ g dw L}^{-1}$ . Biorreactor de  $1\text{L}$ , operado a  $700 \text{ rpm}$ ,  $0.5 \text{ vvm}$  y  $30 \text{ }^\circ\text{C}$



**Figura V.16** Cinética de biotransformación en un sistema de dos fases líquidas (5% [OMA][BTA]): sustrato 0.55 g L<sup>-1</sup> de cetona en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol a una concentración de biocatalizador 5 gdw<sup>-1</sup>. Biorreactor de 1 L, operado a 700 rpm, 1 vvm y 30 °C

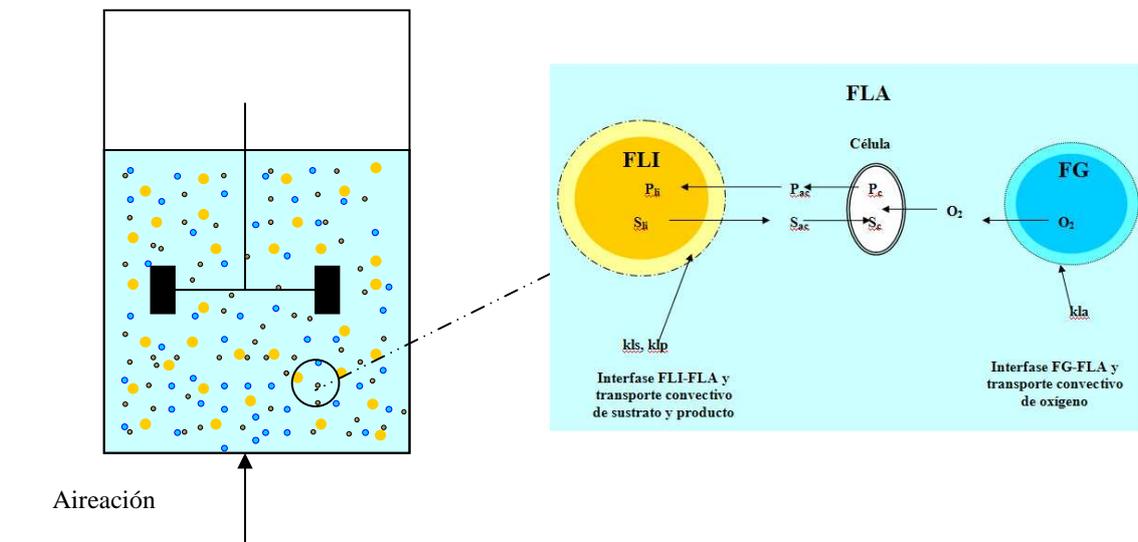
Como se puede apreciar en la **Figura V.16** la producción de lactonas durante las primeras 3 horas de la biotransformación fue mayor que durante las últimas 4 horas. Este cambio en la velocidad de reacción pudiera deberse a que el biocatalizador podría estarse desactivando por la presencia del líquido iónico o al estrés hidrodinámico. Law *et al.* (2006) reportan que en condiciones típicas de reacción (medio acuoso) el biocatalizador (*E. coli* TOP10 pQR239) tiene un tiempo de vida de 7.5 h, es decir, el biocatalizador disminuye su actividad debido a la toxicidad de sustrato y producto.

En el biorreactor de un litro se alcanzaron productividades específicas de 0.0176 y 0.0231 g gdw<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para una fase y dos fases líquidas, respectivamente. Se observa un incremento en la productividad específica del 31 % cuando la biotransformación se lleva a cabo en presencia de una segunda fase. Çelik *et al.* (2004) observaron que la oxidación de 2-feniletanol a 2-fenilacetaldehído utilizando una cepa de *Gluconobacter oxydans* B-72 se duplicaba al emplear iso-octano como fase dispersa.

## V.6 El modelo matemático

En esta sección, se desarrolla un modelo fenomenológico que permite predecir y describir la biotransformación de cetonas bicíclicas a lactonas en un sistema multifásico, acuoso-líquido iónico-aire. Las simulaciones se comparan con los datos experimentales obtenidos en un biorreactor de partición operado en lote.

En la **Figura V.17**, se esquematiza de manera conceptual el proceso de biotransformación en una dispersión que integra una fase líquido iónico (FLI), que a su vez se encuentra inmersa en una fase líquida acuosa (FLA).

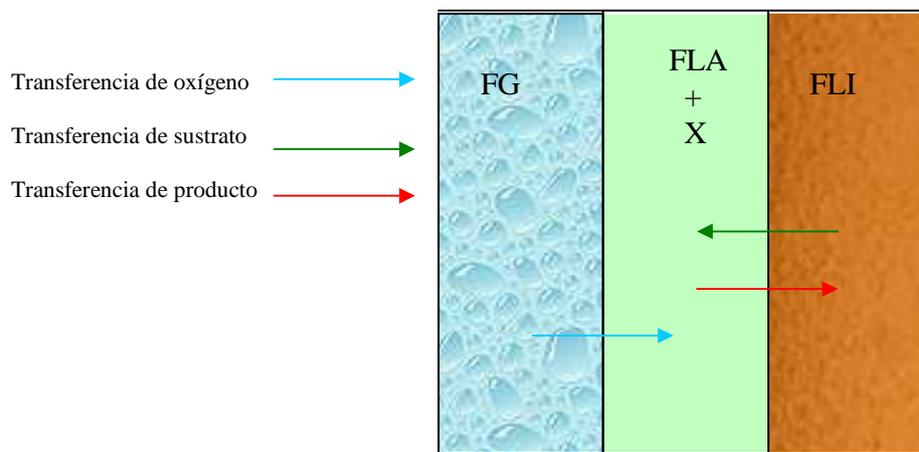


**Figura V.17** Esquema de una biotransformación oxidativa en un biorreactor de partición. FLI=fase líquido iónico, FLA=fase líquida acuosa, FG=fase gaseosa (aire)

De acuerdo con lo anterior, la biotransformación de cetonas se puede resumir en tres etapas: 1) transporte de oxígeno de la fase gas a la fase acuosa, 2) transporte de cetonas de la fase líquido iónico a la fase acuosa, 3) consumo de ambos sustratos por el biocatalizador y 4) el transporte de lactonas de la fase acuosa a la fase líquido iónico. Debido a esto, para determinar la velocidad a la que ocurre cada uno de estos procesos es necesario obtener los

coeficientes de transferencia de masa y los parámetros cinéticos de la biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas.

En la **Figura V.18** se puede observar un esquema de los procesos de transferencia de masa en las tres fases. Una de las ventajas de operar un biorreactor de partición utilizando líquidos iónicos, es que no hay generación de espuma a diferencia de otros sistemas multifásicos (Cruickshank *et al.*, 2000)



**Figura V.18 Fenómenos de transferencia de masa en un biorreactor multifásico, X: biocatalizador**

Para obtener las ecuaciones de los balances de sustrato, producto y oxígeno se toma en cuenta la ecuación general de continuidad para un elemento de volumen de cada una de las fases y que se expresa:

$$\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{acumulación} \\ \text{de la especie} \\ i \end{array} = \begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{entrada de} \\ \text{especie } i \end{array} - \begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de salida} \\ \text{de especie } i \end{array} + / - \begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{consumo/producción} \\ \text{de especie } i \end{array}$$

### V.6.1 Suposiciones para el desarrollo del modelo

- El sistema opera isotérmicamente y en lote.
- El líquido iónico es biocompatible e inmiscible con la fase acuosa.
- No hay pérdida de líquido iónico por consumo de *E. coli* (el líquido iónico no es usado como fuente de carbono).
- Se tiene una dispersión homogénea de las gotas de líquido iónico en agua
- Las concentraciones de sustrato y producto intracelular son iguales a las que se encuentran en la fase líquida acuosa, debido a que la resistencia a la transferencia de materia hacia la célula es despreciable.
- El biocatalizador presenta una cinética de inhibición por sustrato, y la reacción se realiza sólo en la fase acuosa.
- La cantidad de producto formado es estequiométricamente igual al sustrato consumido.
- Durante la biotransformación el glicerol es la única fuente de energía del biocatalizador (células de *E. coli*), la cetona sólo es transformada pero no consumida como fuente de energía.
- La pérdida abiótica de cetona del sistema es por evaporación.
- Se asume que el equilibrio de reparto de sustrato y producto entre la FLI y la FLA es instantáneo, y que la densidad de la FLI como los coeficientes de partición de sustrato y producto son constantes en toda la biotransformación.

### V.6.2 Balance de sustrato en la fase acuosa

El sustrato (la cetona bicíclica) está presente en el líquido iónico y se transporta a la fase acuosa a través de la interfase en función de la demanda metabólica de las células, por lo que es necesario hacer un balance de sustrato en cada una de las fases líquidas.

En la fase acuosa tenemos que la velocidad de cambio de la cantidad de sustrato está dada por:



La transferencia de cetona de la fase líquido iónico (FLI) a la fase acuosa está determinada por el coeficiente de convección  $k_{Ls}$  ( $m\ s^{-1}$ ), el área interfacial (fase acuosa-líquido iónico)  $A_{gota}$  ( $m^2\ m^{-3}$ ) y por el gradiente de concentraciones. A su vez el gradiente de concentraciones estará afectado por el coeficiente de partición de sustrato ( $K_{ps}$ ). La velocidad de transferencia de sustrato (VTS) desde la fase líquido iónico a la fase acuosa está dada por:

$$VTS = k_{Ls} A_{gota} \left( \frac{S_{li}}{K_{ps}} - S_{ac} \right) \quad (V.7)$$

$K_{ps}$  es el coeficiente de partición de sustrato, el cual expresa la razón de concentraciones de sustrato entre dos líquidos inmiscibles en el equilibrio;  $S_{li}$  es la concentración de sustrato en el líquido iónico y  $S_{ac}$  es la concentración de sustrato en la fase acuosa.

$$K_{ps} = \frac{S_{li}}{S_{ac}} \quad (V.8)$$

Lo mismo se puede aplicar para el producto de la reacción, de manera que  $K_{pp}$  es coeficiente de partición para producto;  $P_{li}$  es la concentración de producto en el líquido iónico y  $P_{ac}$  es la concentración de producto en la fase acuosa.

$$K_{pp} = \frac{P_{li}}{P_{ac}} \quad (V.9)$$

El estudio de la biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas, nos muestra que la reacción esta inhibida por sustrato, **Figura V.10**.

$$r_{consumo(s)} = \left( \frac{Y_S}{P} \right) X \left( \frac{V_{max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( - \frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) \quad (V.10)$$

Tomando en consideración la velocidad de transferencia de sustrato, ec. (V.7), y la velocidad de consumo de sustrato en la fase acuosa, ec. (V.10), el balance de masa de sustrato en la fase acuosa queda de la siguiente forma:

$$\frac{dS_{ac}}{dt} = k_{Ls} A_{gota} \left( \frac{S_{li}}{K_{ps}} - S_{ac} \right) - \left( \frac{Y_S}{P} \right) X \left( \frac{V_{max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( - \frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - evp \quad (V.11)$$

En este caso *evp* es el término correspondiente a la pérdida abiótica de la cetona por evaporación,  $0.24 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , éste término fue estimado experimentalmente (ver **Tabla V.8**).

### V.6.3 Balance de sustrato en la fase líquido iónico

La transferencia de sustrato de la fase iónica a la acuosa (TSFI), está dada, por el coeficiente convectivo de sustrato  $k_{Ls}$ , por el área interfacial y por un gradiente de concentración que está en función del coeficiente de partición y el cambio de concentración de sustrato debido a la reacción en la fase acuosa.

$$TSFI = -k_{Ls} A_{gota} \left( \frac{S_{li}}{K_{ps}} - S_{ac} \right) \quad (V.12)$$

No hay entrada de sustrato al biorreactor debido a que es operado en lote, además no existe consumo de sustrato en la fase líquido iónico por que la biotransformación sólo se lleva a cabo en la fase acuosa. De esta forma el balance de sustrato en el líquido iónico queda de la siguiente manera:

$$\frac{dS_{li}}{dt} = -k_{Ls} A_{gota} \left( \frac{S_{li}}{K_{ps}} - S_{ac} \right) \quad (V.13)$$

#### V.6.4 Balance de producto en la fase acuosa

EL consumo de sustrato debe asociarse exclusivamente al incremento de producto en el medio de biotransformación, debido a que *E. coli* TOP10 pQR239 sólo tiene la enzima para oxidar la cetona pero no tiene enzimas para consumir la lactona y usarla como fuente de carbono o energía. De esta manera, la velocidad de formación de producto puede expresarse como:

$$r_{\text{formación}(p)} = X \left( \frac{V_{\text{max}} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( - \frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) \quad (\text{V.14})$$

La transferencia de producto de la fase acuosa a la iónica (TPFA), está en función del coeficiente de partición  $K_{pp}$ , del gradiente de concentración debido a la formación de producto en la fase acuosa, por el coeficiente convectivo de producto  $k_{Lp}$  y por el área interfacial de la dispersión agua-líquido iónico-aire.  $X$  es la concentración de biocatalizador.

$$TPFA = -k_{Lp} A_{\text{gota}} (P_{ac} * K_{pp} - P_{li}) \quad (\text{V.15})$$

Considerando el transporte de producto a la fase líquido iónico y la formación de producto en la fase acuosa tenemos que el balance de producto en la fase acuosa queda de la siguiente manera:

$$\frac{dP_{ac}}{dt} = X \left( \frac{V_{\text{max}} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( - \frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - k_{Lp} A_{\text{gota}} (P_{ac} * K_{pp} - P_{li}) \quad (\text{V.16})$$

#### V.6.5 Balance de producto en la fase líquido iónico

Debido a que la formación de producto está presente únicamente en la fase acuosa, la velocidad de acumulación de producto en el líquido iónico únicamente está dada por la

transferencia convectiva de producto de la fase acuosa a la fase líquido iónico. Esta transferencia de producto de la fase acuosa al líquido iónico está en función del gradiente de concentración de producto de la fase acuosa con respecto a la fase líquido iónico, por el coeficiente convectivo de transferencia de producto y por el coeficiente de partición de producto  $K_{pp}$ .

$$\frac{dP_{li}}{dt} = k_{Lp} A_{gota} (P_{ac} * K_{pp} - P_{li}) \quad (V.17)$$

#### V.6.6 Balance de oxígeno en la fase acuosa.

El balance de oxígeno a considerar, es el correspondiente al del O<sub>2</sub> soluble en la fase acuosa, 7.2 mg L<sup>-1</sup> aproximadamente es la concentración de saturación en la Ciudad de México a 20 °C (Jiménez-Cisneros, 2005). Puesto que el proceso de biotransformación es aerobio, las biorreacciones en la fase acuosa estarán limitadas a la disponibilidad del O<sub>2</sub>.

La transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la acuosa (TOFA), se debe a un gradiente de concentración y un  $k_L a_{O_2}$  de oxígeno.

$$TOFA = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (V.18)$$

El consumo de oxígeno por el biocatalizador se debe a la reacción de biotransformación que utiliza el oxígeno como sustrato y al consumo de las células de *E. coli* por mantenimiento,  $Q_{O_2} X_0$ .

$$r_{consumo(O_2)} = \left( \frac{Y_{O_2}}{P} \right) X \left( \frac{V_{max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( - \frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - Q_{O_2} X_0 \quad (V.19)$$

Considerando el consumo de oxígeno y la transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase acuosa tenemos que el balance de oxígeno en la fase acuosa queda de la siguiente manera:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left( \frac{Y_{O_2}}{P} \right) X \left( \frac{V_{\max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp\left( -\frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - Q_{O_2} X \quad (V.20)$$

### V.6.7 Estabilidad del biocatalizador

Ahora bien es importante considerar que la presencia de líquido iónico en el biorreactor provoca cierta disminución de la actividad de las células de *E. coli* además del estrés dinámico consecuencia de la agitación. Esto se sabe por los estudios de viabilidad de la célula en presencia del líquido iónico y por algunos datos de la literatura (Pernak *et al.*, 2003; Latala *et al.*, 2005; Jastorff *et al.*, 2003)

El cambio de biocatalizador activo va a estar dado por la siguiente ecuación, donde  $k_d$  es la constante de desactivación.

$$\frac{dX}{dt} = -k_d * X \quad (V.21)$$

Finalmente, en la **Tabla V.5** se presenta un resumen de los balances de masa de sustrato, producto, oxígeno y biocatalizador.

**Tabla V.5 Balances de masa de sustrato, producto, oxígeno y biocatalizador**

<b>Compuesto (Fase)</b>	<b>Balances de masa</b>
Sustrato (fase acuosa)	$\frac{dS_{ac}}{dt} = k_{Ls} A_{gota} \left( \frac{S_{li}}{K_{ps}} - S_{ac} \right) - \left( \frac{Y_S}{P} \right) X \left( \frac{V_{max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( -\frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - evp$
Sustrato (fase iónica)	$\frac{dS_{li}}{dt} = -k_{Ls} A_{gota} \left( \frac{S_{li}}{K_{ps}} - S_{ac} \right)$
Producto (fase acuosa)	$\frac{dP_{ac}}{dt} = X \left( \frac{V_{max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( -\frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - k_{Lp} A_{gota} (P_{ac} * K_{pp} - P_{li})$
Producto (fase iónica)	$\frac{dP_{li}}{dt} = k_{Lp} A_{gota} (P_{ac} * K_{pp} - P_{li})$
Oxígeno (fase acuosa)	$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left( \frac{Y_{O_2}}{P} \right) X \left( \frac{V_{max} * S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \right) * \exp \left( -\frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) - Q_{O_2} X$
Biocatalizador Activo (fase acuosa)	$\frac{dX}{dt} = -k_d * X$

### V.6.8 Análisis adimensional del modelo de biotransformación de cetonas cíclicas en un biorreactor de partición

El modelo fue adimensionalizado con el objetivo de normalizar todas las variables dependientes del modelo de biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas en un biorreactor de partición, esto también fue útil para deducir diferentes números adimensionales que permitan analizar los fenómenos que ocurren en el sistema. La **Tabla V.6** muestra las variables que se consideraron.

**Tabla V.6 Variables y parámetros empleados para la adimensionalización del modelo de biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas en un biorreactor de partición**

<b>Variables dimensionales</b>	<b>Símbolo dimensional</b>	<b>Símbolo adimensional</b>	<b>Relación adimensional</b>
Concentración de sustrato fase acuosa	$S_{ac}$	$x_a$	$x_a = \frac{S_{ac}}{S_{ac0}}$
Concentración de sustrato fase iónica	$S_{li}$	$x_b$	$x_b = \frac{S_{li}}{S_{li0}}$
Concentración de producto fase acuosa	$P_{ac}$	$y_a$	$y_a = \frac{P_{ac}}{P_{acmax}}$
Concentración de producto fase iónica	$P_{li}$	$y_b$	$y_b = \frac{P_{li}}{P_{limax}}$
Concentración de oxígeno fase acuosa	$C_{O_2}$	$\xi$	$\xi = \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^*}$
Concentración de biocatalizador activo fase acuosa	$X$	$\omega$	$\omega = \frac{X}{X_0}$
Tiempo	$t$	$\tau$	$\tau = \frac{t}{t_c} = \frac{S_{ac0} \cdot t}{Y_{\frac{s}{p}} \cdot X_0 \cdot V_{max}}$
Constante de afinidad	$K_s$	$\widehat{K}_s$	$\widehat{K}_s = \frac{K_s}{S_{ac0}}$
Constante de inhibición	$K_i$	$\widehat{K}_i$	$\widehat{K}_i = \frac{K_i}{S_{ac0}}$

El tiempo característico se definió como la concentración inicial de sustrato en la fase acuosa sobre la velocidad máxima de catálisis, ec. (V.22).

$$t_c = \frac{S_{ac0}}{Y_{\frac{s}{p}} \cdot X_0 \cdot V_{max}} \quad (V.22)$$

Se eligió esta definición del tiempo característico por la dependencia del proceso global de la velocidad de biotransformación de cetonas cíclicas. Empleando la teoría de la extracción líquido-líquido (Tejeda *et al.*, 1995), se calcularon las concentraciones máximas de producto en el líquido iónico  $P_{limax}$  (ec. (V.23)) y en la fase acuosa  $P_{acmax}$ , al término de la

biotransformación, considerando que todo el sustrato se transforma en producto en base a los rendimientos estequiométricos.

$$P_{\lim ax} = \frac{V_{li} (S_{li0} \cdot Y \frac{P}{S}) + V_{ac} (S_{ac0} \cdot Y \frac{P}{S})}{V_{li} + \frac{V_{ac}}{K_{pp}}} \quad (V.23)$$

$$P_{ac max} = \frac{V_{li} (S_{li0} \cdot Y \frac{P}{S}) + V_{ac} (S_{ac0} \cdot Y \frac{P}{S})}{V_{li} \cdot K_{pp} + V_{ac}} \quad (V.24)$$

Sustituyendo en las ecuaciones del modelo dimensional, las relaciones adimensionales de la última columna de la **Tabla V.6**, se obtiene el sistema adimensionalizado mostrado en la **Tabla V.7**.

En el modelo adimensional de la **Tabla V.7**, aparecen diferentes números y cantidades adimensionales. Medina-Moreno (2006) definió el número de Biodisponibilidad ( $B_n$ ) como el cociente de la tasa máxima de transporte por convección entre la tasa máxima de biorreacción, ec. (V.25), y su magnitud, es indicativo del mecanismo de control en el proceso de biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas en un biorreactor de partición. Así tenemos que, cuando el  $B_n > 1$ , el control es debido a la tasa de biorreacción.

$$B_n = \frac{\mathfrak{R}_{transporte}}{\mathfrak{R}_{biorreaccion}} \quad (V.25)$$

En base a lo anterior se definieron números de biodisponibilidad para el sustrato ( $B_n^S$ ), oxígeno ( $B_n^{O_2}$ ) y producto ( $B_n^P$ ). Como resultado del análisis adimensional estos números se expresan como:

**Tabla V.7 Sistema de ecuaciones adimensionales para el modelado de un biorreactor de partición para la biotransformación de cetonas cíclicas a lactonas.**

Compuesto (Fase)	Ecuaciones diferenciales adimensionales
Sustrato (fase acuosa)	$\frac{dx_a}{d\tau} = B_n^S \left( \frac{x_b \cdot S_{li0}}{K_{ps} \cdot S_{ac0}} - x_a \right) - \left( \frac{\omega \cdot x_a}{\widehat{K}_s + x_a} \right) \cdot \exp \left( - \frac{x_a^3 \cdot S_{ac0}^2}{\widehat{K}_i} \right) - \Psi$
Sustrato (fase iónica)	$\frac{dx_b}{d\tau} = -B_n^S \left( \frac{x_b}{K_{ps}} - \frac{x_a \cdot S_{ac0}}{S_{li0}} \right)$
Producto (fase acuosa)	$\frac{dy_a}{d\tau} = \frac{S_{ac0} \cdot x_a}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot P_{ac\max} \cdot (\widehat{K}_s + x_a)} \cdot \exp \left( - \frac{x_a^3 \cdot S_{ac0}^2}{\widehat{K}_i} \right) - B_n^P \cdot \frac{S_{ac0}}{P_{ac\max} \cdot Y_{\frac{S}{P}}} \left( y_a \cdot K_{pp} - \frac{y_b \cdot P_{limax}}{P_{ac\max}} \right)$
Producto (fase iónica)	$\frac{dy_b}{d\tau} = B_n^P \cdot \frac{S_{ac0}}{Y_{\frac{S}{P}}} \left( \frac{y_a \cdot K_{pp}}{P_{limax}} - \frac{y_b}{P_{ac\max}} \right)$
Oxígeno (fase acuosa)	$\frac{d\xi}{d\tau} = B_n^{O_2} \cdot \frac{(1-\xi) \cdot S_{ac0} \cdot Y_{\frac{O_2}{P}}}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot C_{O_2}^*} - \frac{S_{ac0} \cdot Y_{\frac{O_2}{P}} \cdot \omega \cdot x_a}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot C_{O_2}^* \cdot (\widehat{K}_s + x_a)} \cdot \exp \left( - \frac{x_a^3 \cdot S_{ac0}^2}{\widehat{K}_i} \right) - \frac{S_{ac0} \cdot Q_{O_2} \cdot \omega}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot V_{\max} \cdot C_{O_2}^*}$
Biocatalizador Activo (fase acuosa)	$\frac{d\omega}{d\tau} = - \frac{S_{ac0} \cdot k_d \cdot \omega}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot X_0 \cdot V_{\max}}$

Donde:

$$B_n^S = \frac{S_{ac0} \cdot k_{LS} \cdot A_{gota}}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot X_0 \cdot V_{\max}} \quad (V.26)$$

$$B_n^P = \frac{P_{ac\max} \cdot k_{LP} \cdot A_{gota}}{X_0 \cdot V_{\max}} \quad (V.27)$$

$$B_n^{O_2} = \frac{k_L a \cdot C_{O_2}^*}{Y_{\frac{O_2}{P}} \cdot X_0 \cdot V_{\max}} \quad (V.28)$$

Se calculó el número de biodisponibilidad para sustrato,  $B_n^S = 155$ , es decir, el número de biodisponibilidad fue mucho mayor a 1, por lo que podemos concluir que el proceso está limitado por la biorreacción. Otras cantidades adimensionales que surgen del modelo son: una constante adimensional de pérdidas de sustrato por evaporación, ec. (V.29):

$$\Psi = \frac{evp}{Y_{\frac{S}{P}} \cdot X_0 \cdot V_{\max}} \quad (\text{V.29})$$

Una constante adimensional de afinidad del biocatalizador al sustrato:

$$\widehat{K}_s = \frac{K_s}{S_{ac0}} \quad (\text{V.30})$$

Una constante adimensional de inhibición del biocatalizador al sustrato:

$$\widehat{K}_i = \frac{K_i}{S_{ac0}} \quad (\text{V.31})$$

### V.6.9 Predicciones del modelo para la biotransformación en un biorreactor de partición

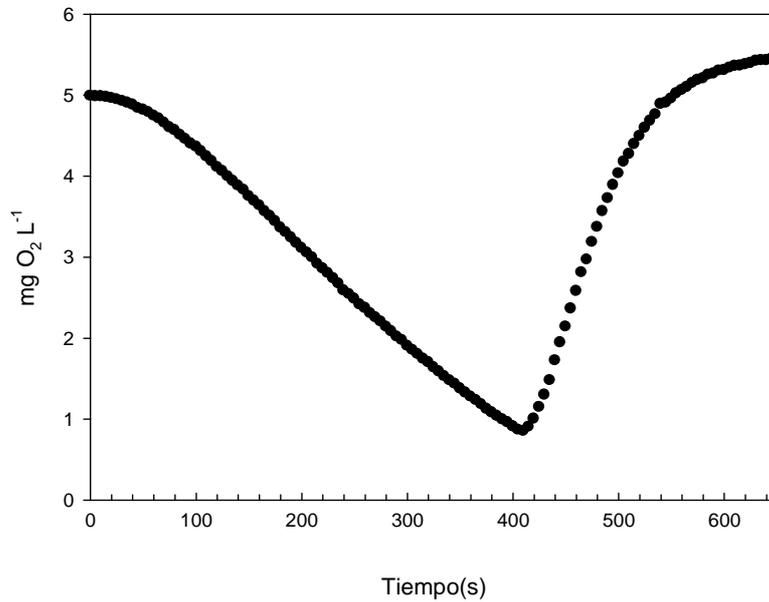
Los parámetros del modelo se obtuvieron de tres fuentes, en forma experimental, de la bibliografía y por ajuste de los datos experimentales al modelo. La **Tabla V.8** muestra los parámetros experimentales utilizados en la resolución del modelo para el biorreactor de partición de tres fases, utilizando como fase dispersa el líquido iónico [OMA][BTA].

En el caso del área interfacial y del  $k_L a$  no solo se midieron valores experimentalmente, además se desarrollaron correlaciones (**Tabla V.3** y **Tabla V.4**), dentro de un intervalo de operación del biorreactor (400-1000 RPM, 0.5–1 vvm y 5-20% v/v de fase dispersa).

En la **Figura V.19** se muestra como disminuye la concentración de oxígeno al suspender la aireación en el biorreactor, de esta manera fue estimado el consumo específico de oxígeno por mantenimiento ( $Q_{O_2}$ ), en ausencia de sustrato o producto de la reacción. Se utilizó la ec. (V.32) reportada por Badino *et al.* (2000), y mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt de regresión no lineal se calculó  $Q_{O_2}$ .

**Tabla V.8 Parámetros experimentales en la resolución del modelo**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Coeficiente de partición de sustrato	25.5±0.47
Coeficiente de partición de producto	6.7±0.93
Area interfacial líquido iónico-fase acuosa ( $A_{gota}$ ) (min-max)	1.62x10 <sup>4</sup> -7.17x10 <sup>4</sup> m <sup>-1</sup>
Coeficiente convectivo de sustrato ( $k_{LS}$ )	0.04832 m h <sup>-1</sup>
Coeficiente convectivo de producto ( $k_{LP}$ )	0.01718 m h <sup>-1</sup>
Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) (min-max)	29.16-223 h <sup>-1</sup>
Consumo de oxígeno por mantenimiento ( $Q_{O_2}$ )	13.611 mg O <sub>2</sub> gdw <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Constante de pérdidas por evaporación ( $evp$ )	0.24 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad máxima específica del biocatalizador ( $V_{max}$ )	0.24 g P gdw <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Constante de afinidad del biocatalizador ( $K_s$ )	2.15x10 <sup>-11</sup> g L <sup>-1</sup>
Constante de inhibición del biocatalizador ( $K_i$ )	6.71 g L <sup>-1</sup>



**Figura V.19** Medición de consumo de oxígeno por mantenimiento ( $Q_{O_2} \cdot X_0$ ) del biocatalizador previo a la biotransformación, se utilizó una concentración de biocatalizador  $3 \text{ gdw L}^{-1}$ . Biorreactor de 1 L, operado a 700 rpm, 0.5 vvm y  $30^\circ \text{C}$  en amortiguador de fosfatos pH7 50 mM

$$C_e = C_{e_s} - Q_{O_2} X \left( t - \frac{1}{k_e} + \frac{e^{-k_e \cdot t}}{k_e} \right) \quad (\text{V.32})$$

Donde  $C_e$ =concentración de oxígeno disuelto en el medio medida por el electrodo,  $C_{e_s}$ =concentración de oxígeno disuelto en el estado cuasi-estacionario,  $Q_{O_2}$ =consumo específico de oxígeno por mantenimiento,  $X$ =biomasa,  $k_e$ =sensibilidad del electrodo.

Los parámetros encontrados en la bibliografía se muestran en la **Tabla V.9**. Los rendimientos  $Y_{\frac{S}{P}}$  y  $Y_{\frac{O_2}{P}}$  fueron estimados en base a la estequiometría de la reacción (Doig *et al.*, 2002a) de biotransformación de cetonas cíclicas y considerando el consumo de oxígeno para la regeneración del  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ .

**Tabla V.9 Parámetros estimados mediante bibliografía para la resolución del modelo**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Rendimiento g de sustrato por g producto ( $Y \frac{S}{P}$ )	0.8711
Rendimiento g de oxígeno por g producto ( $Y \frac{O_2}{P}$ )	0.5155

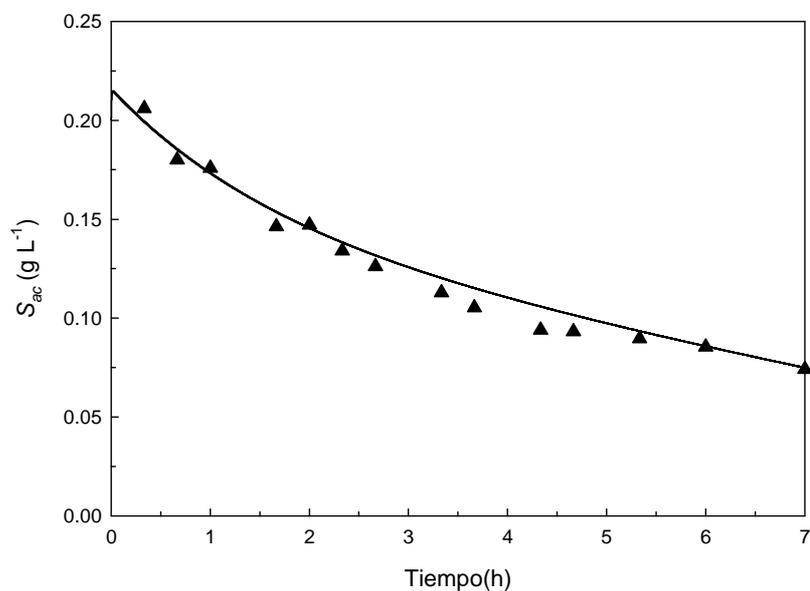
El parámetro estimado por ajuste del modelo fue la constante de desactivación del biocatalizador ( $k_d=0.6 \text{ h}^{-1}$ ) mediante ensayos de prueba y error, tomando como criterio para el ajuste la disminución del error del modelo con datos experimentales.

El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) que integran el modelo, corresponde a un problema de valor inicial. Así en cada simulación que se probó el modelo, se empleó un vector de condiciones iniciales  $\mathbf{VCI}=(S_{a0c}, S_{li0}, P_{ac0}, P_{li}, C_{O_2,0}, X_0)$ . En todos los casos, se supuso que al inicio de la biotransformación, la concentración de producto en la fase acuosa y en la fase líquido iónico fueran cero, mientras que los valores iniciales de la concentración de oxígeno disuelto ( $C_{O_2,0}$ ), sustrato en la fase acuosa ( $S_{ac0}$ ), sustrato en el líquido iónico ( $S_{li0}$ ) y la concentración de biocatalizador ( $X_0$ ) fueron tomados de los determinados experimentalmente.

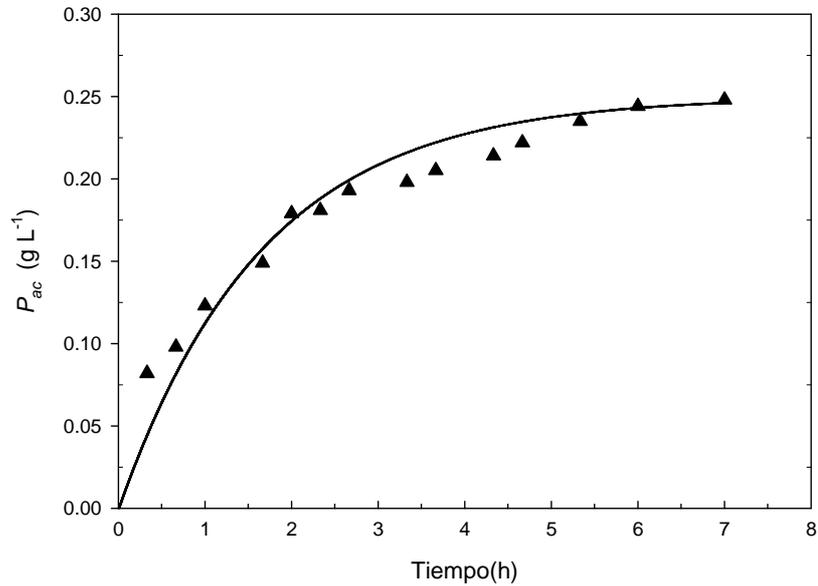
Para la solución numérica del modelo, se utilizó el método corrector-predicor de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF45). El algoritmo para la solución numérica por el método RKF45, fue codificado en 2 programas basados en lenguaje MATLAB (Anexo A5). El primer programa llamado biotrans.m, contiene las EDO que integran al modelo, mientras que un segundo programa denominado GeneralBLA.m, resuelve el sistema, construye tablas, gráficas y almacena datos de la corrida.

El modelo se evaluó, con los datos experimentales de concentración de  $S_{ac}$ ,  $P_{ac}$  y  $C_{O_2}$ , correspondientes a las primeras 7 horas para una biotransformación en lote, y cuyas predicciones se muestran en las **Figuras V.20, V.21 y V.22**. Se presenta la cinética de biotransformación en presencia de [OMA][BTA] 5% v/v.

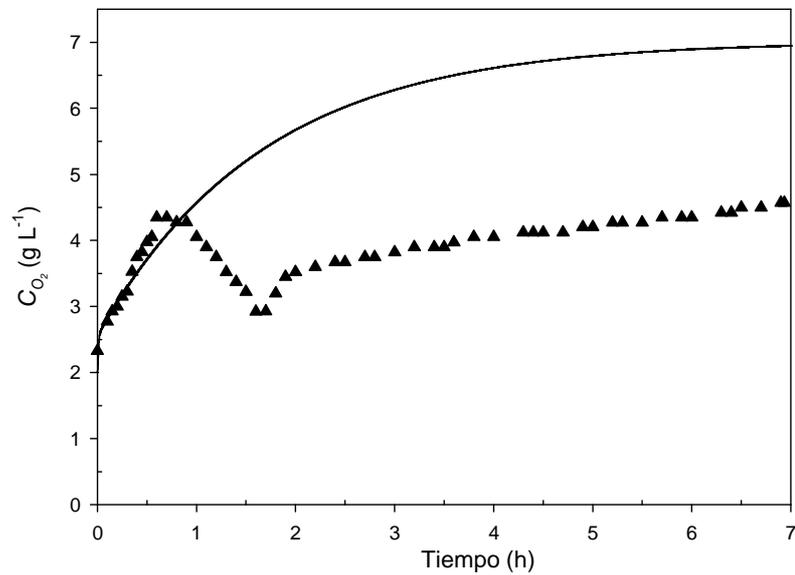
De las tres variables empleadas para valorar el modelo ( $S_{ac}$ ,  $P_{ac}$  y  $C_{O_2}^*$ ), se tuvieron buenas predicciones para  $S_{ac}$  y  $P_{ac}$ , sin embargo para la concentración de oxígeno disuelto ( $C_{O_2}$ ) sólo se tuvo una buena predicción para la primer hora del proceso, esto probablemente se deba a que en el modelo el término de consumo de oxígeno por mantenimiento este subestimado, pues este se midió en solución de fosfatos pH 7 50 mM a 30 °C, pero en ausencia de líquido iónico y sustrato, los cuales podrían ocasionar una situación de estrés en las células provocando un aumento en el consumo de oxígeno, como respuesta SOS en *E. coli* (Serment-Guerrero *et al.*, 2005).



**Figura V.20** Predicción del modelo en el consumo de sustrato en la fase acuosa ( $S_{ac}$ ), durante una biotransformación en un biorreactor de 1L, a 700 RPM, 1 vvm, 5% V/V [OMA][BTA], 30°C, concentración de biocatalizador 5 gdw L<sup>-1</sup>, (▲) valores experimentales, (—) predicción del modelo



**Figura V.21** Predicción del modelo en la aparición de producto en la fase acuosa ( $P_{ac}$ ) durante una biotransformación en un biorreactor de 1L, a 700 RPM, 1 vvm, 5% V/V [OMA][BTA], 30°C, concentración de biocatalizador 5 gdw L<sup>-1</sup> (▲) valores experimentales, (—) predicción del modelo



**Figura V.22** Predicción del modelo en la concentración de oxígeno disuelto ( $C_{O_2}$ ) durante una biotransformación en un biorreactor de 1L, a 700 RPM, 1 vvm, 5% V/V [OMA][BTA], 30°C, concentración de biocatalizador 5 gdw L<sup>-1</sup> (▲) valores experimentales, (—) predicción del modelo

### V.10 Análisis de sensibilidad paramétrica.

Se realizó un análisis de sensibilidad paramétrica para saber cuáles son los parámetros más importantes que influyen en la variable de respuesta, que es la concentración de producto.

$$S = \frac{\frac{V_{\text{respuesta}+10\%} - V_{\text{respuesta}0}}{V_{\text{respuesta}0}}}{\frac{P_{0+10\%} - P_0}{P_0}} \quad (\text{V.33})$$

En la ecuación (V.33)  $S$  es la sensibilidad del parámetro probado, cuando se cambia el valor del parámetro a estudiar en el modelo y se analiza el cambio en la variable de respuesta. Para esto se consideraron parámetros de transferencia de masa y de la biotransformación, **Tabla V.10.** El análisis se realizó incrementando en cada caso por separado 10% cada uno de los parámetros estudiados.

**Tabla V.10 Resultados del análisis de sensibilidad paramétrica**

Parámetro de análisis	Valor del parámetro	Sensibilidad paramétrica
$k_d$ biocatalizador	$0.6 \text{ h}^{-1}$	0.466
$V_{max}$	$0.24 \text{ g P L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	1.004
Coefficiente de partición de sustrato ( $K_{PS}$ )	23	0.002
Coefficiente de partición de producto ( $K_{PP}$ )	7	0.804
Coefficiente de transferencia de sustrato ( $k_{Ls}$ )	$0.04832 \text{ m h}^{-1}$	0.00001
Coefficiente de transferencia de producto ( $k_{Lp}$ )	$0.01718 \text{ m h}^{-1}$	0.00007
$k_{Ls} \cdot A_{gota}$	748	0.00002
$k_{Lp} \cdot A_{gota}$	284	0.00073
$k_L a$	140	0.00016

Si  $S > |1|$  el parámetro influye en la variable de respuesta; si  $S < |1|$  el parámetro no influye en la variable de respuesta.

El análisis de sensibilidad (**Tabla V.10**) muestra que el parámetro más importante que influye en la variable de respuesta es la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ) del biocatalizador, debido a que al incrementarse ésta, la concentración de producto alcanzada en el mismo tiempo de biotransformación es mayor. Logrando un mayor consumo de sustrato antes de que se inactive por completo el biocatalizador. También podemos observar en la **Tabla V.10** que los coeficientes de transferencia de masa resultaron ser poco sensibles.

## **VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### VI.1 Conclusiones

**I.** El líquido iónico [OMA][BTA] resultó ser significativamente ( $\alpha=0.0419$ ) más biocompatible que el [MeBuPyrr][BTA]. El líquido iónico más soluble fue el menos biocompatible, por lo que la biocompatibilidad posiblemente esté relacionada con la solubilidad de los líquidos iónicos.

**II.** Las propiedades fisicoquímicas medidas de los dos líquidos iónicos usados en este trabajo mostraron tener una influencia importante sobre los mecanismos de rompimiento y coalescencia de gotas en dispersiones agitadas. Esto llevó a patrones de comportamiento significativamente diferentes de  $k_L a$  y  $d_{32}$  en función de las condiciones de operación (velocidad de agitación y aireación). Para el líquido iónico [OMA][BTA], los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  (aproximadamente 0.7 y 0.5) de la correlación podrían indicar un ambiente coalescente en un reactor agitado con una turbina Rushton.

**III.** En general incrementando la fracción volumétrica del líquido iónico se tiene un impacto negativo sobre  $k_L a$ . Sin embargo la relación exacta de la fracción volumétrica de líquido iónico para los valores de  $d_{32}$  dependió de cada líquido iónico usado. Las correlaciones empíricas para los valores de  $k_L a$ , y en menor medida a los valores del  $d_{32}$ , con respecto a las condiciones de operación del biorreactor mostraron un buen ajuste entre los valores medidos y los predichos. Estas correlaciones pueden ser usadas para realizar un mejor diseño y operación de los biorreactores de partición trifásicos en los cuales se desarrollen biotransformaciones oxidativas.

**IV.** La biotransformación del tipo Baeyer-Villiger se favorece con la adición de una segunda fase (líquido iónico [OMA][BTA]) empleando un biorreactor de partición de tres fases (acuosa-líquido iónico-aire), permitiendo obtener incrementos tanto en la tasa máxima de reacción como en la productividad específica de biotransformación. Lo anterior permitirá llevar a cabo la biotransformación a concentraciones globales superiores a las concentraciones de inhibición.

**V.** Se desarrolló un modelo de transferencia de masa-biocatálisis-recuperación *in situ* del producto capaz de predecir y describir la biotransformación de cetonas bicíclicas a lactonas para su aplicación en síntesis de nuevos fármacos. El modelo consideró tanto los fenómenos de transferencia de masa (sustrato, producto y oxígeno), hidrodinámica del sistema así como la cinética de biotransformación. Mediante el análisis de los diferentes mecanismos estudiados en el modelamiento (transferencia de masa, hidrodinámica y biorreacción) se determinó que el proceso se encuentra limitado por la biorreacción. El presente modelo se propone como herramienta para el desarrollo tanto de criterios de diseño, como para la determinación de las mejores condiciones de operación para la biotransformación de cetonas a lactonas en biorreactores de partición, mediante biocatálisis.

## VI.2 Recomendaciones

Durante el presente trabajo se utilizó una cepa modificada genéticamente (*E. coli* TOP10 pQR239) con poca estabilidad genética, es recomendable tener cuidado con la conservación de la cepa para que ésta no pierda la capacidad de sintetizar la ciclohexanona monooxigenasa. Otra de las opciones a considerar es el utilizar un biocatalizador diferente pues se ha comprobado que existen cepas con sobre producción de proteínas y que tienen mayor estabilidad genética.

Los líquidos iónicos tienen un gran potencial para ser sustitutos de los solventes orgánicos, sin embargo comercialmente es difícil tener un líquido iónico 100% puro, por lo que es importante lavar los líquidos iónicos y aplicar cualquier otro proceso para retirar las trazas de la síntesis, pues es probable que estas trazas estén teniendo un efecto tóxico o inhibitorio sobre el biocatalizador.

Continuamente se obtienen y producen nuevas variedades de líquidos iónicos que pueden ser más baratos y con mayor biocompatibilidad que los que se usan actualmente sin embargo una de las características primordiales a tener en cuenta en caso de buscar nuevos líquidos iónicos es el coeficiente de partición de los sustratos y productos de la reacción, así como la biocompatibilidad del biocatalizador durante la biotransformación en presencia del líquido iónico que sea seleccionado.

## **VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F.1973. Biochemical Engineering. Segunda Edición. Ed. Academic Press, Inc. Japón
- Aiba S., Shoda M., Nagatani M.1968. Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 10:845-864.
- Alphand V., Carrea G., Wohlgemuth R., Furstoss R., Woodley J.M. 2003. Toward large-scale synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *TRENDS in Biotechnology*, 21:318-323.
- Badino A.C.Jr., Cândida M., Facciotti R., Schmidell W. 2000. Improving  $k_{La}$  determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75:469-474.
- Bailey J.E, 1998. Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. *Biotechnol. Prog*, 14:8-20.
- Bailey J.E, Ollis D.F. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill Inc. Estados Unidos.
- Baldwin C.V.F., Woodley J.M. 2006. On oxygen limitation in a whole cell biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation process. *Biotechnology and Bioengineering*, 95:362-369.
- Bird R.B., Stewart E.W., Lighfoot E.N. 2010. Fenómenos de Transporte. 2<sup>a</sup>. Ed. Limusa Wiley. México. pp. 615-631.
- Bordel S., Hernandez M., Villaverde S. Muñoz R. 2010. Modelling gas-liquid VOCs transport in two-liquid phase partitioning bioreactors. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 53:1139-1145.

- Boswell C.D., Nienow A.W., Gill N.K., Kocharunchitt S., 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. *Trans IChemE*, 81:23-32.
- Bräutigam S., Dennewald D., Schürmann M., Lutje-Spelberg J. 2009. Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, 45:310-316
- Calabrese R.V., Chang T.P.K., Dang P.T. 1986. Drop break-up in turbulent stirred-tank contactors. Part I: Effect of dispersed-phase viscosity. *AIChE J.* 32:657-666.
- Calderbank P.H. 1958. Physical rate processes in industrial fermentation. 1985. Part I. The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 36:443-463.
- Çelik D.; Bayraktar E., Mehmetoğlu Ü. 2004. Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system. *Biochemical Engineering Journal*, 17:5-13.
- Cruickshank S.M., Daugulis A.J., McLellan P.J. 2000. Dynamic Modeling and Optimal Fed-Batch Feeding Strategies for a Two-Phase Partitioning Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 67:224-233.
- Cull S.G., Holbrey J.D., Vargas-Mora V., Seddon R., Lye G.J. 2000. Room-Temperature Ionic Liquids as Replacements for Organic Solvents in Multiphase Bioprocess Operations. *Biotechnology and Bioengineering*, 69:227-233.
- Cull S.G., Lovick J.W., Lye G.J., Angeli P. 2002. Scale-down studies on hydrodynamics of two-liquid phase biocatalytic reactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 25:143-153.

- Docherty K.M., Hebbeler S.Z., Kulpa C.F. An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test. *Green Chemistry*, 8:560-567.
- Doig S.D., Bird J., Lander S., Lye G.J., Woodley J. 2002a. Reactor Operation and Scale-Up of Whole Cell Baeyer-Villiger Catalyzed Lactone Synthesis. *Biotechnol. Prog.*, 18, 1039-1046.
- Doig S.D., Pickering S.C.R., Lye G.J., Woodley J.M. 2002b. The use of microscale processing technologies for quantification of biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 80:42-49.
- Doig S.D., O'Sullivan L.M., Patel S., Ward J.M. 2001. Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:265-274.
- Dorland. 2005. Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. 30<sup>o</sup> Edición, Elsevier España, S.A. Madrid España. pp. 234.
- Fuchs R., Ryu D.D.Y. 1971. Effect of surface aeration on scale-up procedures for fermentation processes. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop.*, 10:190-196.
- Geankoplis C.J. 1995. Procesos de transporte y operaciones unitarias. 2<sup>a</sup>. Ed. Compañía Editorial Continental, México pp. 338-341.
- Gomes N., Aguedo M., Teixeira J., Belo I. 2007. Oxygen mass transfer in a biphasic medium: Influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into  $\gamma$ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical Engineering Journal*, 35:380-386.
- Hassan I.T.M., Robinson C.W., 1977. Oxygen transfer in mechanically agitated aqueous systems containing dispersed hydrocarbon. *Biotechnology and Bioengineering*, 19:661-682.

- Hilker I., Baldwin C., Alphand V., Furstoss R., Woodley J., Wohlgemuth R. 2006. On the influence of oxygen and cell concentration in an SFPR whole cell biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation process. *Biotechnology and Bioengineering*, 93:1138-1144.
- Hinckley G., Mozhaev V.V., Budde C., Khmelnitsky Y.L. 2002. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnology Letters*, 24:2083-2087.
- Jastorff B., Störmann R., Ranke J., Mölter K., Stock F., Oberheitmann B., Hoffmann W., Hoffmann J., Nüchter M., Ondruschka B., Filser J. 2003. How hazardous are ionic liquids? Structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chemistry*, 5:136 – 142.
- Jiménez-Cisneros B. E. 2005. La contaminación ambiental en México, efectos y tecnología apropiada. Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA, México.
- Krieger N., Bhatnagar T., Baratti J.C., Baron A.M., Lima V.M., Mitchell D. 2004. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technol. Biotechnol.*, 42:279-286.
- Latala A., Stepnowski P., Nędzi M., Mroziak W. 2005. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae *Oocystis submarina* and *Cyclotella meneghiniana*. *Aquatic Toxicology*, 73:91–98.
- León R., Fernandes P., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. 1998. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 23:483-500.
- Lewis J.B. The mechanism of mass transfer of solutes across liquid-liquid interfaces. Part I: The determination of individual transfer coefficients for binary systems. *Chemical Engineering Science*, 3:248-259.

- Liu YS, Wu JY, Ho KP. 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 27: 331-335.
- Lou WY, Zong MH, Smith T.J. 2006. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (S)-1-trimethylsilylethanol. *Green Chemistry*, 8:147-155.
- Lovick J., Mouza A.A., Paras S.V., Lye G.J., Angeli P. 2005. Drop size distribution in highly concentrated liquid-liquid dispersions using a light back scattering method. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80:545-552.
- Malinowsky J.J. 2001. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. *Biotechnology Advances*, 19:525-538.
- Marcelis C.L.M., Leeuwen M. van, Polderman H.G., Janssen A.J.H., Lettinga G. 2003. Model description of dibenzothiophene mass transfer in oil/water dispersions with respect to biodesulfurization. *Biochemical Engineering Journal*. 16:253-264.
- Matsumoto M., Mochiduki K., Kondo K. 2004. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98:344-347.
- Medina A. 2006. Estudio y modelamiento matemático de la biodegradación de hidrocarburos en biorreactores heterogéneos. Tesis de Doctorado Biotecnología. UAM-IZTAPALAPA, México D.F.
- Moo-Yung M., Blanch H.W. 1981. Design of biochemical reactors mass transfer criteria for simple and complex systems. *Adv. Biochem. Eng.*, 19:1-69.
- Muñoz R., Villaverde S., Guieysse B., Revah S. 2007. Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds. *Biotechnology Advances*, 25:410-422.

- Nielsen D.R., Daugulis A.J., McLellan P.J. 2003. A Novel Method of Simulating Oxygen Mass Transfer in Two-Phase Partitioning Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 83:735-742.
- Nielsen D.R., Daugulis A.J., McLellan P.J. 2005. A Restructured Framework for Modeling Oxygen Transfer in Two-Phase Partitioning Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 91:773-777.
- Nielsen D.R., Daugulis A.J., McLellan P.J. 2007. Dynamic simulation of benzene vapor treatment by a two-phase partitioning bioscrubber Part II: Model calibration, validation, and predictions. *Biochemical Engineering Journal*, 36: 250-261.
- Nienow A.W. 2004. Break-up, coalescence and catastrophic phase inversion in turbulent contactors. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108:95-103
- Oh S.K.W., Nienow A.W., Al-Rubeai M., Emery A.N. 1989. The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells. *Journal of Biotechnology*, 12: 45-62.
- Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I. 2003. Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chemistry*, 5:52–56.
- Pfruender H., Jones R., Weuster-Botz D. 2006. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 124:182–190.
- Pfruender H., Amidjojo M., Kragl U., Weuster-Botz D. 2004. Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:4529-4531.

- Prpich G.P., Daugulis A.J. 2007. Solvent Selection For Enhanced Bioproduction of 3-methylcatechol in a Two-Phase Partitioning Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:536-543.
- Serment-Guerrero J., Breña-Valle M., Espinosa-Aguirre J. 2005. La respuesta SOS en *Escherichia coli*. *Revista Especializada en Ciencia Químico-Biológicas*, 8:99-105
- Quadros P.A., Baptista C.M.S.G. 2003. Effective interfacial area in agitated liquid-liquid continuous reactors. *Chemical Engineering Science*, 58:3935-3945.
- van Rantwijk F., Lau R.M., Sheldon R.A. 2003. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *TRENDS in Biotechnology*, 21:131-138.
- Song C.E. 2004. Enantioselective chemo- and bio-catalysis in ionic liquids. *Chemical Communications*, 9:1033-1043.
- Sowana D.D., Williams D.R.G., Dunlop E.H., Dally B.B., O'Neill B.K. Fletcher D.F. 2001. Turbulent shear stress effects on plant cell suspension cultures. *Trans IChemE*, 79: 867-875.
- Srivastava P., Hahr O., Buchholz R., Worden R. M. 2000. Enhancement of Mass Transfer Using Colloidal Liquid Aphrons: Measurement of Mass Transfer Coefficients in Liquid-Liquid Extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 70:525-532.
- Stark D., Münch T., Sonnleitner B., Marison I. W., von Stockar U. 2002. Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.*, 18: 514-523.
- Stepnowsky P., Zaleska A. 2005. Comparison of different advanced oxidation processes for the degradation of room temperature ionic liquids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 170:45-50.

- Torres-Martínez D., Melgarejo-Torres R., Gutiérrez-Rojas M., Aguilera-Vázquez L., Micheletti M., Lye G.J., Huerta-Ochoa S. 2009. Hydrodynamic and oxygen mass transfer studies in a three-phase (Air-Water-Ionic liquid) stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 45: 209-217.
- Wilke C.R., Chang P. 1955. Correlation of diffusion coefficients in dilute solution. *AIChE J.*, 1:264-270.
- Willetts A., 1997 Structural studies and synthetic applications of Baeayer-Villiger monooxygenases. *Trends. Biotechnol.*, 15:55-62.
- Woodley J.M., Brazier A.J., Lilly M.D. 1991. Lewis Cell Studies to Determine Reactor Design Data for Two-Liquid-Phase Bacterial and Enzymic Reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 37:133-140.
- Yang J., Hu Y., Zhao D., Wang S., Lau P.C.K., Marison I.W. 2007. Two-layer continuous-process design for the biodesulfurization of diesel oil under bacterial growth conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 37:212-218.
- Yang Z., Pan W. 2005. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:19-28.
- Zhao G., Zhou L., Li Y., Liu X., Ren X., Liu X. 2009. Enhancement of phenol degradation using immobilized microorganisms and organic modified montmorillonite in a two-phase partitioning bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 169:402-410.
- Zilouei H., Guieysse B., Mattiasson B. 2008. Two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of high concentrations of pentachlorophenol using *Sphingobium chlorophenicum* DSM 8671. *Chemosphere*, 72:1788-1794.

## **VIII. ANEXOS**

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Técnicas analíticas

#### Medición de biomasa por densidad óptica

La biomasa fue cuantificada midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 650 nm, se obtuvo una curva de calibración biomasa en peso seco y densidad óptica con un coeficiente de correlación de  $R^2=0.9985$ .

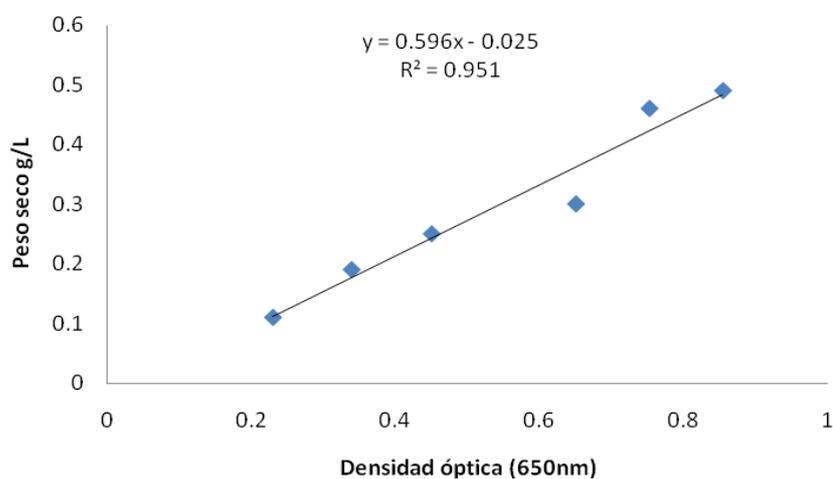
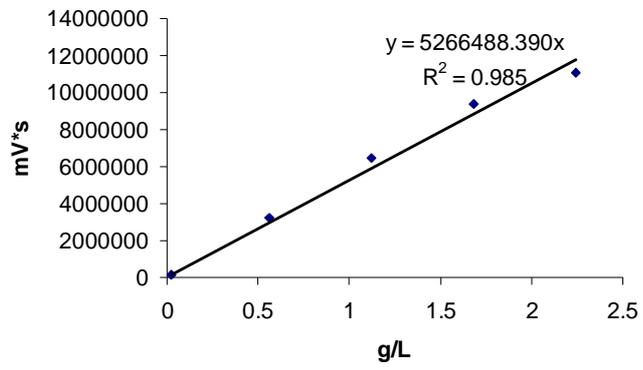


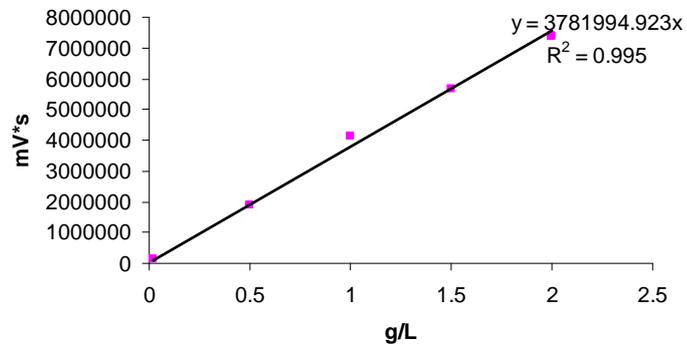
Figura A1 Curva estándar Peso seco vs Densidad óptica

#### Medición de sustrato y producto por CG

La curva de calibrado se llevó a concentraciones de 0 a 2 g/l de cetona y de lactona



**Figura A2 Curva de calibrado de cetona**



**Figura A3 Curva de calibrado de lactona**

**Anexo 2. Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en  
matraces y formulación del medio de cultivo**

Operando un matraz a  $N=250$  rpm,  $v_L=50$  mL, y  $v_0=250$  mL, tenemos que:

$$k_L a_{O_2} = 65.86 h^{-1}$$

De manera que la oferta de oxígeno en el matraz está dado por la ecuación

$$k_L a_{O_2} (C_{O_2}^* - C_{O_2}) = 65.85 h^{-1} \left( 0.007 \frac{gO_2}{L} \right) = 0.46096 \frac{gO_2}{hL}$$

El consumo de oxígeno es dependiente de la velocidad específica de crecimiento, de la cantidad de biomasa presente y del rendimiento de g de biomasa por g de  $O_2$ .

$$Consumo O_2 = (\mu X) \left( Y \frac{x}{O_2} \right)$$

Suponiendo que la velocidad de suministro de oxígeno es igual a la demanda de oxígeno tenemos que:

$$Oferta O_2 = k_L a (C^* - C) = (\mu X_{\max}) \left( Y \frac{x}{O_2} \right) = Consumo O_2$$

La máxima cantidad de biomasa que podemos tener en un matraz sin que se vea limitada por oxígeno es:

$$X_{\max} = \frac{Y \frac{x}{O_2}}{\mu} = \frac{\left( 1.47 \frac{gdw}{gO_2} \right) \left( 0.46095 \frac{gO_2}{hL} \right)}{0.68 h^{-1}} = 0.996 \frac{gdw}{L}$$

Fuente de carbono, glucosa

$$\left( 0.996 \frac{gdw}{L} \right) \left( 0.5 \frac{gC}{gdw} \right) \left( 180 \frac{gglu \cos a - bios}{72 gC} \right) = 1.245 \frac{gglu \cos a - bios}{L}$$

$$\left(1.245 \frac{gglu \cos a - bios}{L}\right) \left(\frac{1gglu \cos a}{0.51gglu \cos a - bios}\right) = 2.5 \frac{gglu \cos a}{L}$$

Fuente de nitrógeno,  $NH_4Cl$

$$\left(1 \frac{gdw}{L}\right) \left(\frac{0.12gP}{1gdw}\right) \left(\frac{53.46gNH_4Cl}{14gN}\right) = 0.46 \frac{gNH_4Cl}{L}$$

Fuente de fósforo,  $KH_2PO_4$

$$\left(1 \frac{gdw}{L}\right) \left(\frac{0.03gP}{1gdw}\right) \left(\frac{136gKH_2PO_4}{30.97gP}\right) = 0.131 \frac{gKH_2PO_4}{L}$$

Fuente de azufre,  $Na_2SO_4$

$$\left(1 \frac{gdw}{L}\right) \left(\frac{0.01gS}{1gdw}\right) \left(\frac{147.07gNa_2SO_4}{32.07gS}\right) = 0.045 \frac{gNa_2SO_4}{L}$$

Fuente de magnesio,  $MgSO_4$

$$\left(1 \frac{gdw}{L}\right) \left(\frac{0.01gMg}{1gdw}\right) \left(\frac{120.38gMgSO_4}{24.31gMg}\right) = 0.05 \frac{gMgSO_4}{L}$$

Fuente de calcio,  $CaCl_2$

$$\left(1 \frac{gdw}{L}\right) \left(\frac{0.005gCa}{1gdw}\right) \left(\frac{110.98gCaCl_2}{40.08gCa}\right) = 0.014 \frac{gCaCl_2}{L}$$

### Anexo 3. Cinética de crecimiento de *E. coli* TOP10 pQR239

La cinética de crecimiento fue establecida para una concentración de glucosa en el medio de 2.5g/L, a 250 rpm y 37°C. Bajo estas condiciones la glucosa es el único sustrato limitante y el oxígeno es suministrado en alta cantidad. Se inocularon 9 matraces, y cada hora se tomaron muestras para leer en el espectrofotómetro y medir el crecimiento.

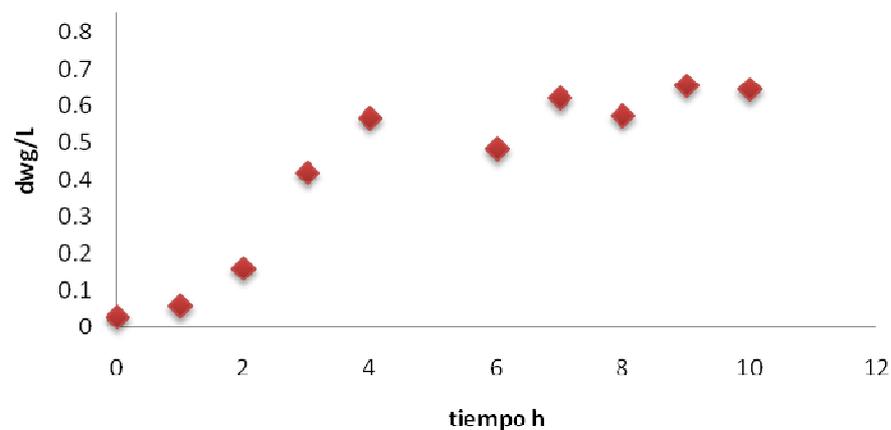


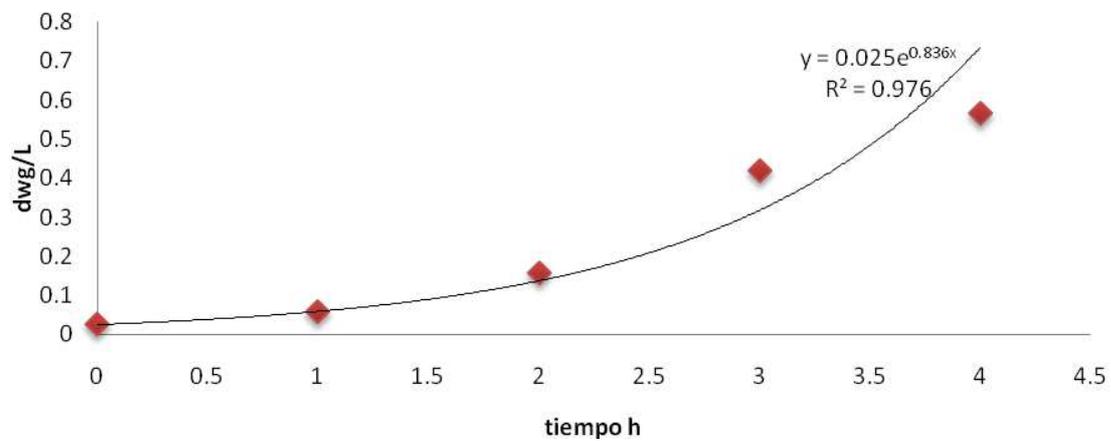
Figura A4 Curva de crecimiento de *E. coli*

$$\frac{dx}{dt} = r_x = \mu X$$

Considerando que tenemos un biorreactor en lote, la solución de la ecuación de crecimiento es:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$



**Figura A5** Cinética de crecimiento de *E. coli* TOP 10 pQR239

Se determinó un constante de crecimiento específica  $\mu=0.836 \text{ h}^{-1}$

#### Anexo 4. Cálculo de los coeficientes de difusividad

La correlación de Wilke-Chang (Bird *et al.*, 2010) nos permite estimar la difusividad de moléculas pequeñas en solventes de bajo peso molecular con un margen de error del 15 al 20%:

$$\mathcal{D} = 7.4 \times 10^{-8} \frac{T(x_a M)^{1/2}}{\mu_f V_m^{0.6}} [=] \frac{cm^2}{s}$$

Donde  $M$ =peso molecular del solvente g/mol,  $V_m$ =volumen molar del soluto como líquido en el punto de ebullición,  $cm^3/g$  mol,  $\mu_f$ = viscosidad del líquido, cP.,  $T$ =la temperatura de operación en grados K. El parámetro  $x_a$  representa el factor de asociación para el solvente en este caso para agua es de 2.6. Para calcular el volumen molar del sustrato (la cetona bicíclica) y la lactona se utilizó la **Tabla 5.3-2** de Geankoplis (1995), para el sustrato la fórmula molecular es  $C_7H_8O$  y para el producto es  $C_7H_8O_2$ . De esta forma tenemos que el volumen molar para sustrato y producto es:

$$V_{molar, sustrato} = 7(14.8) + 8(3.7) + 1(7.4) = 140.6 \frac{cm^3}{gmol}$$

$$V_{molar, producto} = 7(14.8) + 8(3.7) + 2(11.0) = 155.2 \frac{cm^3}{gmol}$$

Calculando el coeficiente de difusión para sustrato y producto, sustituyendo tenemos que:

$$\mathcal{D}_{sustrato, agua} = 7.4 \times 10^{-8} \frac{(303.15K)(2.6 * 18g / mol)^{1/2}}{(1cp) \left( 140.6 \frac{cm^3}{gmol} \right)^{0.6}} = 0.7888 \times 10^{-5} \frac{cm^2}{s}$$

$$\mathcal{D}_{\text{producto, agua}} = 7.4 \times 10^{-8} \frac{(303.15K)(2.6 * 18g / mol)^{1/2}}{(1cp) \left( 155.2 \frac{cm^3}{gmol} \right)^{0.6}} = 0.7434 \times 10^{-5} \frac{cm^2}{s}$$

## Anexo 5. Programas en Matlab para la solución numérica del modelo

Para la resolución numérica de lo modelo, se desarrollaron 2 programas en lenguaje Matlab. El programa “biotrans.m” con tiene los sistemas de EDO’s y sus ecuaciones algebraicas asociadas, mientras que el otro programa “GeneralBLA.m” contiene las diferentes correlaciones para  $k_{la}$ ,  $d_{32}$ , potencia usando las condiciones de operación seleccionadas. Además el programa “GeneralBLA.m” resuelve los sistemas de ecuaciones (mediante Runge-Kutta(4,5) Dormain Pair), almacena datos y construye gráficas.

---

### GeneralBLA.m

```
close all
% clear all
%PARÁMETROS OPERACIONALES

% Temperatura 30°C
% Fase acuosa (solución de fosfatos 50 mM pH7)
% Líquido iónico usado [OMA][BTA]
global V      % Volumen de trabajo del reactor en (m^3)
V=0.0007;
global R      % Velocidad de agitación en (rpm)
R=700;
global VVM    % VVM flujo de aire
VVM=1;
global fi     % Fracción volumétrica de líquido iónico con respecto al
volumen total del sistema (adimensional)
fi=0.05;
global C      % Concentración del biocatalizador(E. coli TOP10pQR239) en
(gdw/L)
C=5;

%PARÁMETROS GEOMÉTRICOS DEL BIORREACTOR
global di     % Diámetro del impulsor (m)
di=0.045;
global Dt    % Diámetro interno del tanque (m)
Dt=0.095;

%PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL SISTEMA MULTIFÁSICO
global rhoc  % Densidad de la fase continua (kg/m^3)
rhoc=1000;
global sigma % Tensión interfacial (kg/s^2)
sigma=0.0197;
```

%PARÁMETROS TRANSFERENCIA DE MASA

```
global kls % Coeficiente convectivo de sustrato (m/h)
kls=0.04832;
global klp % coeficiente convectivo de producto (m/h)
klp=0.01718;
global vs % velocidad superficial del aire (m/s)
vs=(VVM.*V).*(60^-1).*(pi.*(Dt./2)^2)^-1;
global Nwe % Número de Weber (adimensional)
Nwe=rhoc.*((R.*60^-1)^2).*di^3*sigma^-1;
global cal % Constante 1 (delta) del modelo de diámetro de gota sauter d32
para un biorreactor de partición usando [OMA][BTA] como fase dispersa
(adimensional)
cal=7.66.*10^-4;
global ca2 % Constante 2 (alfa) del modelo de diámetro de gota sauter d32
para un biorreactor de partición usando [OMA][BTA] como fase dispersa
(adimensional)
ca2=-0.420;
global ca3 % Constante 3 (beta) del modelo de diámetro de gota sauter d32
para un biorreactor de partición usando [OMA][BTA] como fase dispersa
(adimensional)
ca3=-0.115;
global ca4 % Constante 4 (gamma) del modelo de diámetro de gota sauter d32
para un biorreactor de partición usando [OMA][BTA] como fase dispersa
(adimensional)
ca4=0.373;
global ca5 % Constante 5 (épsilon) del modelo de diámetro de gota sauter
d32 para un biorreactor de partición usando [OMA][BTA] como fase dispersa
(adimensional)
ca5=0.409;
global cp1 % Constante 1 (delta) del modelo de consumo de potencia aireada
(adimensional)
cp1=0.0113054;
global cp2 % Constante 2 (alfa) del modelo de consumo de potencia aireada
(adimensional)
cp2=0.0629011;
global cp3 % Constante 3 (beta) del modelo de consumo de potencia aireada
(adimensional)
cp3=1.7704248;
global cp4 % Constante 4 (gamma) del modelo de consumo de potencia aireada
(adimensional)
cp4=-0.4335552;
global Pg % potencia aireada (W/m^3)
Pg=cp1.*((R.*di)./VVM^cp2)^cp3.*(1-fi)^cp4;
global d32 % diámetro promedio de gota Sauter d32 (m)
d32=di.*cal.*(Pg./V)^ca2.*vs^ca3.*Nwe^ca4.*(1-fi)^ca5;
global Agota % área interfacial de las gotas de líquido iónico por unidad
de volumen( 1/m)
Agota=(6.*(fi))./d32;

global col % constante 1 (delta) del modelo de kla de transferencia de
oxígeno en fase orgánica(líquido iónico[OMA][BTA])
```

```

col=0.0022;
global co2 %constante 2 (alfa) del modelo de kla de transferencia de
oxígeno en fase orgánica (líquido iónico [OMA][BTA])
co2=0.741;
global co3 %constante 3 (beta) del modelo de kla de transferencia de
oxígeno en fase orgánica (líquido iónico [OMA][BTA])
co3=0.556;
global co4 %constante 4 (gamma) del modelo de kla de transferencia de
oxígeno en fase orgánica(líquido iónico [OMA][BTA])
co4=3.270;
global kla % Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (1/h)
kla=(col.*(Pg./V)^co2.*vs^co3.*(1-fi)^co4).*3600;
global Kps % coeficiente de partición de sustrato (adimensional)
Kps=23;
global Kpp % coeficiente de partición de producto (adimensional)
Kpp=7;

% PARAMETROS CINETICOS
global K1 % Rendimiento estequiométrico de g de sustrato por
g de producto generado (adimensional)
K1=0.8711;
global K2 % Rendimiento estequiométrico de g oxígeno
consumido por g de producto generado (adimensional)
K2=0.51;
global Ks1 % Constante de afinidad(g/L)
Ks1=(2.15).*(10^-11);
global QO2 % Consumo de oxígeno por gdw de biocatalizador por
hora(mgO2/gdw*h)
QO2=13.61152;
global KI1 % Constante de inhibicion (g/L)
KI1=6.71;
global Ulmax % Velocidad maxima de producción de lactonas
(g/gdw*h)
Ulmax=0.24;
global kd % Constante de desactivación de la biomasa en
(1/h)
kd=0.6;

% PRESENTACIÓN GRÁFICA DE RESULTADOS
bx=[0.333,0.666,1,1.666,2,2.333,2.666,3.333,3.666,4.333,4.666,5.333,6,7]; %
Datos experimentales, tiempo en horas
bypa=[0.082,0.098,0.123,0.149,0.179,0.181,0.193,0.198,0.205,0.214,0.222,0.2
35,0.244,0.248];% Datos experimentales concentración de producto en la fase
acuosa
bysa=[0.206,0.180,0.17588,0.14624,0.14708,0.13411,0.12620,0.11293,0.10525,0
.09411,0.09327,0.08968,0.08538,0.07419]; % Datos experimentales
concentración de sustrato en la fase acuosa
bxo=[0,0.1,0.15,0.2,0.25,0.3,0.35,0.4,0.45,0.5,0.55,0.6,0.7,0.8,0.9,1,1.1,1
.2,1.3,1.4,1.5,1.6,1.7,1.8,1.9,2,2.2,2.4,2.5,2.7,2.8,3,3.2,3.4,3.5,3.6,3.8,
4,4.3,4.4,4.5,4.7,4.9,5,5.2,5.3,5.5,5.7,5.9,6,6.3,6.4,6.5,6.7,6.9,6.933]; %
Datos experimentales , tiempo en que se hicieron mediciones de oxígeno
disuelto (mg/L)

```

```

byo=[2.325,2.775,2.925,3,3.15,3.225,3.525,3.75,3.825,3.975,4.05,4.35,4.35,4
.275,4.275,4.05,3.9,3.75,3.52,3.37,3.22,2.92,2.925,3.2,3.45,3.52,3.6,3.67,3
.67,3.75,3.75,3.82,3.9,3.9,3.9,3.97,4.05,4.05,4.12,4.12,4.12,4.12,4.2,4.2,4
.27,4.27,4.27,4.35,4.35,4.35,4.42,4.42,4.5,4.5,4.57,4.57];% Datos
experimentales, concentración de oxígeno disuelto en (mg/L)
[t x]=ode45(@biotrans,[0 7],[0.2 5 0.0 0.0 2 C], [] );           %Ecuaciones
diferenciales para el biorreactor de partición

subplot(2,2,1), plot(t,x(:,1),bx,bysa,'*'),xlabel('h'), ylabel('S fase
acuosa g/L'); % concentración de Sustrato en la fase acuosa(g/L)
subplot(2,2,2), plot(t,x(:,2)),xlabel('h'), ylabel('S fase líquido iónico
g/L'); % concentración de sustrato en la fase líquido iónico (g/L)
subplot(2,2,3), plot(t,x(:,3),bx,bypa,'*'),xlabel('h'), ylabel('P fase
acuosa g/L'); % concentración de producto en la fase acuosa (g/L)
subplot(2,2,4), plot(t,x(:,5),bxo,byo,'*'),xlabel('h'), ylabel('oxígeno
mg/L'); % concentración de producto en la fase líquido iónico (g/L)

```

---

### biotrans.m

```

function dx = biotrans(t,x,concentraciones)

dx=zeros(6,1);

global Ks1           % Constante de afinidad (g/L)
global KI1          % Constante de inhibicion (mmol/L)
global Ulmax        % Velocidad maxima de producción de lactonas
(g/L*h)
global kls          % Coeficiente convectivo de transferencia de
sustrato (m/h)
global klp          % coeficiente convectivo de transferencia de
producto (m/h)
global kla          % coeficiente volumétrico de transferencia de
oxígeno fase acuosa (1/h)
global Agota        % Area interfacial de las gotas de líquido iónico
por unidad de volumen(1/m)
global Kps          % Coeficiente de partición de sustrato
adimensional
global Kpp          % Coeficiente de partición de producto
adimensional
global K1           % Rendimiento estequiométrico de g de sustrato por
g de producto generado (adimensional)
global K2           % Rendimiento estequiométrico de g de oxígeno por
g de producto generado (adimensional)
global tsa          % Velocidad de transferencia de sustrato de la
fase líquido iónico a la fase acuosa
global QO2          % Consumo de oxígeno por gdw de biocatalizador por
hora(mgO2/gdw*h)
global C            % Concentración inicial de biocatalizador

```

```

global kd                % Constante de desactivación de la biomasa en
(1/h)
global evp              % Evaporación del sustrato de la fase acuosa
(g/L*h)

evp=0.24;
tsa=kls.*Agota.*((x(2)./Kps)-x(1));                % Velocidad de
transferencia de sustrato de la fase líquido iónico a la fase acuosa
r1=(U1max.*x(1)./(x(1)+Ks1)).*exp(-x(1)^3/KI1);    % Velocidad de
producción de lactonas (g/L*h)
r2=K1.*(U1max.*x(1)./(x(1)+Ks1)).*exp(-x(1)^3/KI1); % Velocidad de
consumo de sustrato (g/L*h)
tpal=klp.*Agota.*(x(3).*Kpp-x(4));                % Velocidad de
transferencia de producto de la fase acuosa ala fase líquido iónico

dx(1)= tsa - r2.*x(6)-evp;                          % Variación
de sustrato en la fase acuosa (g/L*h)
dx(2)=-tsa;                                          % Variación de
sustrato en la fase líquido iónico (g/L*h)
dx(3)=r1.*x(6)-tpal;                                % Variación de
producto en la fase acuosa
dx(4)=tpal;                                          % Variación de
producto en la fase líquido iónico
dx(5)=kla.*(7.5-x(5))-1000.*K2.*r1.*x(6)-QO2.*C;  % Variación de
la concentración de oxígeno en la fase acuosa (mg/L*h)
dx(6)=-kd.*x(6);

```

## **Anexo 6. Productos de la tesis**

### **6.1 Congresos**

#### **XII CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA, MORELIA, MICHOACAN 25-29 JUNIO 2007**

TOLERANCIA DE *E. coli* A DIFERENTES TIPOS DE LÍQUIDOS IÓNICOS PARA SU APLICACIÓN EN BIORREACTORES DE PARTICIÓN.

#### **NSF PASI ON SUSTAINABILITY & GREEN CHEMISTRY MAY 29- JUNE 10, 2007 MEXICO CITY**

OXYGEN TRANSFER STUDIES IN BIOCATALYSIS MEDIA USING IONIC LIQUIDS

#### **XIII CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA, VII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES Y LEVADURAS ACAPULCO, GUERRERO 21-26 JUNIO 2009**

MODELADO DE LA CINÉTICA DE BIOTRANSFORMACIÓN TIPO BAEYER-VILLIGER MEDIANTE EL USO DE *E. coli* TOP10 pQR239.

#### **XXXI ENCUESTRO NACIONAL AMIDIQ, HUATULCO, OAXACA 4-7 DE MAYO 2010**

BIOTRANSFROMACIÓN TIPO BAEYER-VILLIGER EN UN BIORREACTOR DE PARTICIÓN DE TRES FASES UTILIZANDO LÍQUIDOS IÓNICOS

## 6.2 Artículo

# HYDRODYNAMIC AND OXYGEN MASS TRANSFER STUDIES IN A THREE-PHASE (AIR-WATER-IONIC LIQUID) STIRRED TANK BIOREACTOR.

**Torres-Martínez, D.<sup>1</sup>, Melgarejo-Torres, R.<sup>1</sup>, Gutiérrez-Rojas, M.<sup>1</sup>,  
Aguilera-Vázquez, L.<sup>2</sup>, Micheletti, M.<sup>3</sup>, Lye, G.J.<sup>3</sup>, Huerta-Ochoa, S.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México D.F. MEXICO

<sup>2</sup> Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca - Cd. Sahagún km 20, Rancho Luna, Ex – Hacienda de Sta. Bárbara, Zempoala, Hidalgo: MEXICO

<sup>3</sup> The Advanced Centre for Biochemical Engineering, Department of Biochemical Engineering, University College London, London, WC1E 7JE, UNITED KINGDOM

\* Corresponding author: Fax: [52 55] 58044712

*Biochemical Engineering Journal* (2009), 45: 209-217.



## Hydrodynamic and oxygen mass transfer studies in a three-phase (air–water–ionic liquid) stirred tank bioreactor

D. Torres-Martínez<sup>a</sup>, R. Melgarejo-Torres<sup>a</sup>, M. Gutiérrez-Rojas<sup>a</sup>, L. Aguilera-Vázquez<sup>b</sup>, M. Micheletti<sup>c</sup>, G.J. Lye<sup>c</sup>, S. Huerta-Ochoa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca - Cd. Sahagún km 20, Rancho Luna, Ex - Hacienda de Sta. Bárbara, Zempoala, Hidalgo, Mexico

<sup>c</sup> The Advanced Centre for Biochemical Engineering, Department of Biochemical Engineering, University College London, London, WC1E 7JE, United Kingdom

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 October 2008

Received in revised form 27 February 2009

Accepted 31 March 2009

#### Keywords:

Partitioning bioreactors

Hydrodynamics

Oxygen mass transfer

Multiphase systems

Ionic liquids

### ABSTRACT

Recently, room temperature ionic liquids have been investigated as organic solvent replacements in multiphase partitioning bioreactors. They could prove particularly useful for oxidative bioconversions due to their non-volatile and non-flammable nature. In order to promote high mass transfer rates stirred tank bioreactors are normally used. However, for multiphase systems, particularly those featuring ionic liquids, there is little hydrodynamic information available to underpin bioreactor design and operation. The aim of this work was to study the hydrodynamic and oxygen mass transfer characteristics of a three-phase (gas–water–ionic liquid) stirred tank partitioning bioreactor. A central composite experimental design was used to investigate the interaction of three operational factors, agitation (400, 700, 1000 rpm) and aeration rates (0.5, 0.75, 1.0 vvm), and ionic liquid volume fraction (5, 12.5, 20%), on two response variables, the Sauter mean droplet diameter ( $d_{32}$ ) and the volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ). Three different ionic liquids with a range of physicochemical properties were also investigated. The experimental data obtained were fitted to empirical correlations relating  $d_{32}$  and  $k_L a$  values to the measured gassed power input and other bioreactor operating parameters. In all cases the measured values of  $k_L a$  (and in most cases  $d_{32}$  values) decreased as ionic liquid volume fraction increased as is the case when using conventional organic solvents. It was shown that different physicochemical properties of the ionic liquid tested gave important differences in the drop size behaviour as a function of agitation conditions. Both of the correlations established for describing the variation of  $k_L a$  and  $d_{32}$  with bioreactor operating conditions gave reliable predictions of the measured values. These correlations will be useful for ongoing studies on the design and operation of partitioning bioreactors for oxidative bioconversions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Two-phase partitioning bioreactors have demonstrated significant potential for enhancing the productivity of many bioprocesses by overcoming issues of poor substrate solubility and toxicity [1]. The majority of studies have used organic solvents as the second phase however these pose additional toxicity and flammability problems. Recently, the use of room temperature ionic liquids as replacements for volatile organic solvents has been reported as a safe alternative for the bioconversion of pharmaceutical and agrochemical chiral intermediates [2,3]. The reliable design and scale-up of partitioning bioreactors requires prediction of the reaction and solute mass transfer rates. Accurate prediction of these rates presupposes knowledge of the interfacial area avail-

able for solute transfer and is obtained through studies of the liquid–liquid hydrodynamics. For oxidative bioconversions, oxygen is also required necessitating aeration of the bioreactor and formation of a three-phase system (i.e. gas–liquid–liquid). The mean size and size distribution of the drops and bubbles created will depend on the physical properties of the phases, the volume fraction of the dispersed phase, aeration rate and agitation regime. The complexity of the drop break-up and coalescence mechanism, together with the possibility of operating partitioning bioreactors in a fed-batch mode [4], justifies the need for further studies on the hydrodynamics of multiphase systems. Currently the amount of data available in the literature is limited especially in the case of ionic liquid phases.

The productivity of oxidative bioconversions [5] in a multiphase system can be limited by mass transport of either substrate and/or oxygen. Substrate and oxygen transfer rates will also depend on the fluid physical properties, temperature, pressure, media composition, agitation conditions, oxygen superficial gas velocity and the configuration of the bioreactor. Mass transfer rates in a multi-

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 58044999; fax: +52 55 58044712.

E-mail address: [sho@xanum.uam.mx](mailto:sho@xanum.uam.mx) (S. Huerta-Ochoa).

phase system are functions depending on the *Sauter* mean drop size diameter ( $d_{32}$ ), oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $k_L a$ ), substrate partition coefficient, and the oxygen solubility into the medium. For a specific partitioning bioreactor and medium, it is normally possible to increase the liquid–liquid interfacial area and  $k_L a$ , and consequently mass transfer rates, using high agitation and aeration rates. However, this causes high power consumption and significantly increasing operation costs. High stirring rates also present a limitation when applied to cells sensitive to hydrodynamic stress and can promote stable emulsion formation leading to downstream processing problems. For partitioning bioreactors, the addition of a second, water-immiscible phase, in which substrate and oxygen has a higher solubility than in water, has been proposed by several authors [6,7] as an alternative approach to mass transfer rate improvement.

Hydrodynamic studies in two-phase partitioning bioreactors have focused on elucidation of the interfacial area available for mass transfer in order that substrate supply (normally from the non-aqueous phase) does not become the rate limiting step of the process. The interfacial area has previously been correlated to the dispersed phase hold-up fraction and the Weber number [8]. The interfacial area available for mass transfer ( $a$ ) is given by:

$$a = \frac{6\phi}{d_{32}} \quad (1)$$

where  $d_{32}$  is the *Sauter* mean drop diameter and  $\phi$  is the volume fraction of the dispersed phase. Accurate knowledge of the effect of bioreactor operating conditions on  $d_{32}$  is therefore very important. Besides, knowledge of  $d_{32}$  can give an early indication of the stability of the liquid–liquid dispersion created. The physicochemical properties of the media can influence both mean drop size and drop size distribution. If dispersed-phase viscosity,  $\mu_d$ , is low, the force resisting drop break-up comes only from surface tension [9]. However, high dispersed-phase viscosity, as is the case for ionic liquids, can present an important influence on both mean drop size and drop size distribution [10].

Several authors have correlated the *Sauter* mean drop size to the Weber number,  $N_{We}$ , as shown below:

$$\frac{d_{32}}{D_i} = AN_{We}^{-0.6} \quad (2)$$

where  $A = f(D_i/D_T, P, \phi)$  and  $N_{We} = \rho_c N^2 D_i^3 / \sigma$ . Calderbank [11] carried out measurements of drop sizes in stirred tanks using six blade turbine impellers in geometrically similar vessels of a range of sizes. He found for aerated liquid–liquid dispersions that:

$$d_p = 0.224 \left[ \frac{\sigma^{0.6}}{(P/V)^{0.4} \rho_c^{0.2}} \right] H^{0.5} \left( \frac{\mu_d}{\mu_c} \right)^{0.25} \quad (3)$$

where  $d_p$  is the mean drop size,  $(P/V)$  is the power input per volume,  $\sigma$  is the interfacial tension,  $\rho_c$  is the density of the continuous phase,  $H$  is the mean volume fraction of the dispersed phase, and  $\mu_d$  and  $\mu_c$  are the viscosity of the dispersed and continuous phases, respectively.

Correlations for prediction of the oxygen mass transfer coefficient,  $k_L a$ , are generally a function of the gassed power per unit volume and the superficial gas velocity. In order to take into account the effect of the organic phase and the organic phase volume fraction on  $k_L a$  in aerated liquid–liquid dispersions, empirical correlations (Eq. (4)) have been proposed [6,12] assuming that the two liquid phases behave as a single homogeneous phase:

$$k_L a = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta (1 - \phi)^\gamma \quad (4)$$

where  $P_g$  represents the power input of the aerated bioreactor,  $V$  the bioreactor working volume,  $v_s$  the superficial gas velocity through

the bioreactor,  $\phi$  the volume fraction of the dispersed liquid phase, and  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  are numerical constants.

The aim of this work is to study the hydrodynamic and oxygen mass transfer characteristics of a three-phase gas–water–ionic liquid dispersion. Given the absence of such data in the literature for ionic liquid dispersions, empirical correlations are proposed and tested for both  $k_L a$  and  $d_{32}$ , for a selected range of ionic liquids with different physicochemical properties. The correlations established will be useful for the purposes of bioreactor design and scale-up and will inform our ongoing studies of oxidative bioconversions in multiphase ionic liquid systems.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Phase systems studied

The continuous aqueous phase used in all experiments was a potassium phosphate buffer solution 50 mM at pH 7 supplemented with 10 g glycerol L<sup>-1</sup>. The density and viscosity were taken to be 1000 kg m<sup>-3</sup> and 0.01 kg m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectively. The dispersed ionic liquid phases used for hydrodynamic and oxygen mass transfer studies were: 1-butyl-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate [BMIM][PF<sub>6</sub>], trioctylmethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide [OMA][BTA], and butylmethylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide [MeBuPyr][BTA]. All had a purity of >98% and were purchased from Solvent Innovation GmbH (Köln, Germany). The dispersed gas phase was atmospheric air, filtered (0.25 μm) prior to bioreactor aeration, which was dispersed into the two-liquid phases with a “L”-shaped perforated pipe sparger comprising of seven holes of 1.0 mm of diameter each.

### 2.2. Maximum ionic liquid solubility determination

Due to the high viscosity of the pure ionic liquids it was not easy to accurately pipette them. Consequently a weighed amount of the ionic liquid under investigation was first placed in a 500 mL Erlenmeyer flask and known additions of distilled water were made under agitation until no drops of the ionic liquid using the ORM equipment were observed. This point was taken to represent the maximum solubility of the ionic liquid in distilled water. All solubility assays were carried out in triplicate at 30 °C.

### 2.3. Viscosity measurement

The apparent viscosity dependency on shear rate of the ionic liquids was measured using a Physica MCR 300 (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany) modular compact rheometer. Samples of 200 μL were placed in a cone–plate measuring system (CP-50-2, 50 mm diam, 2.0° angle, truncation 45 μm). Temperature was controlled with a Peltier (TEK 150 P-C) and measurements were carried out in triplicate at 30 °C. Shear rate was varied from 0.01 to 100 s<sup>-1</sup> using a log ramp.

### 2.4. Interfacial tension measurement

Interfacial tension was measured using a surface tensiometer (Fisher, Model 20). 20 mL of ionic liquid, pre-equilibrated with water was placed into a clean glass dish (4 cm diameter and 4 cm height), and over the ionic liquid 20 mL of distilled water, pre-saturated with ionic liquid, was carefully pipetted taking care not to disturb the interface between the two liquids. Then, the platinum ring (0.6 mm diameter) was lowered down below the interface. The ring was then pulled up at a constant rate until a thin film was formed; data from the tensiometer was taken up until the point

**Table 1**  
Physicochemical properties and biochemical characteristic of the ionic liquids used in this study.

	[OMA][BTA]	[MeBuPyrr][BTA]	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]
Density (kg m <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	1101	1389	1190
Viscosity (kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0.30	0.04	0.03
Interfacial tension (kg s <sup>-2</sup> ) <sup>b</sup>	0.0197	0.0114	0.0075
Maximum solubility (g L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	0.02	5.4	18.6
Substrate (Bicyclo [3.2.0] hept-2-en-6-one) partition coefficient <sup>b</sup>	25.5	25.8	27.8
Viability of <i>E. coli</i> in 9%, v/v ionic liquid; 1 h at 30 °C (%) <sup>d</sup>	85	45	20

<sup>a</sup> Values for pure ionic liquids taken from Solvent Innovation (Germany) data sheet.

<sup>b</sup> Saturated with phosphate buffer solution 50 mM at pH 7 and 10 g glycerol L<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> Saturated with distilled water.

<sup>d</sup> Saturated with phosphate buffer solution 50 mM at pH 7.

before the thin film was broken. Measurements were taken by triplicate at 30 °C. Equipment calibration was done using distilled water as a reference.

### 2.5. Stirred tank bioreactor description

A glass 1-L stirred tank bioreactor (Model ADI 1025, Applikon) was used for all hydrodynamic and mass transfer studies. The bioreactor had an internal diameter of 9.5 cm and the operating volume was 0.7 L ( $H_L/D_T = 0.96$ ). The bioreactor was fitted with a single 6 flat blade Rushton turbine,  $D_i = 4.53$  cm ( $D_i/D_T = 0.46$ ), located 4.53 cm from the flat base of the vessel. The bioreactor was equipped with 2 equidistant baffles of 1.0 cm width to enhance liquid–liquid mixing.

### 2.6. Aerated power consumption ( $P_g$ ) measurement

Aerated power consumption was measured using the methodology recently discussed by Ascanio et al. [13]. Basically, the method is based on electrical measurements performed directly in the bioreactor stirrer shaft motor by watt meters and ammeters. To take into account losses occurring in the agitation system, a blank of the measurements was first performed with an empty bioreactor. All measurements were made in triplicate.

### 2.7. Oxygen mass transfer coefficient ( $k_La$ ) determination

A dissolved oxygen electrode (AppliSens Z010032520, 3250 mm length, Applikon) was used for  $k_La$  determination. The oxygen electrode was coupled to an ADI 1010 Bio controller (Applikon). Dissolved oxygen concentration data obtained during dynamic gassing out experiments were obtained every 5 s and the mass transfer coefficient calculated according to Koizumi and Aiba [14]. The effect of operation conditions: agitation (400, 700 and 1000 rpm) and aeration (0.5, 0.75, and 1.0 vvm) rates, and ionic liquid volume fraction (5, 12.5, and 20%, v/v) on oxygen mass transfer coefficient was studied.

### 2.8. Sauter mean drop diameter ( $d_{32}$ ) measurement

The Sauter mean drop diameter ( $d_{32}$ ) was measured using an Optical Reflectance Measurement (3D ORM) particle size analyser (MTS, Messtechnik Schwartz) [15,16]. Two thousand automatic droplet diameter ( $d_i$ ) determinations were performed for each measurement allowing calculation of a Sauter mean drop diameter ( $d_{32}$ ), as defined in Eq. (5):

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3 \cdot n_i}{\sum d_i^2 \cdot n_i} \quad (5)$$

Ionic liquid drop size diameter and drop size distribution were obtained *in situ* and on-line in all experiments. Due to the ORM measuring drop size by reflectance of a laser beam and the fact that gas bubbles do not have reflectance properties, it was assumed that

gas bubbles do not interfere with the liquid drop size measurements. There was no evidence of any such interference in any of the initial recorded size distributions and therefore, ORM drop size measurements were recorded directly for the three-phase system. Measurements were recorded at least 15 min after mixing was initiated in order to ensure an equilibrium drop size distribution had been established.

### 2.9. Response surface experimental design

To study the effect of three operational variables (aeration and agitation rates and dispersed phase volume fraction) on two responses, oxygen mass transfer coefficient ( $k_La$ ) and the Sauter mean drop size diameter ( $d_{32}$ ), a full face-centred central composite experimental design was used [17]. Experiments of the three independent factors, each one at three levels with 3 centre points and 15 replicates, were performed requiring 32 experiments for each ionic liquid. A second order polynomial model provided the best fit to the experimental data obtained. For response surface methodology (RSM) experiments, the “Fusion Pro” experiment design software (Version 6.7.0, USA) was used for regression and graphical analysis of the experimental results.

### 2.10. Cell viability determination method

The strain *Escherichia coli* TOP10 pQR239 was kindly provided by Professor John M. Ward (University College London, London, United Kingdom), and is referred to hereafter as *E. coli*. To prepare the inoculum, *E. coli* cells were cultured in glass tubes containing 10 mL of nutritive broth (Bioxon, Mexico) supplemented with 10 g L<sup>-1</sup> glycerol at pH 7 and incubated during 20–24 h at 30 °C. In order to determine the tolerance of *E. coli* to the ionic liquid in a two liquid phase system, Eppendorf tubes prior to inoculation were prepared to reach a final concentration of 9% (v/v) of ionic liquid in 50 mM phosphate solution at pH 7. Then, 100 μL of the inoculum described above was added to each Eppendorf and shaken vigorously for 1 min and incubated at 30 °C for 1 h (1 min agitation was repeated after 30 min). After incubation, samples of 500 μL were taken and serially diluted (10<sup>-1</sup>–10<sup>-6</sup>). Then, 0.1 mL of each dilution was used to inoculate Petri dishes containing 10 mL of nutritive agar which was incubated for 16–20 h at 30 °C. The *E. coli* viability was calculated on the basis of viable cell counts by counting colony-forming units mL<sup>-1</sup>.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Ionic liquid properties and biocompatibility

The physicochemical properties and biochemical characteristic of the three ionic liquids evaluated in this work ([OMA][BTA], [MeBuPyrr][BTA] and [BMIM][PF<sub>6</sub>]) are shown in Table 1. The measured viscosity and interfacial tension values for [OMA][BTA] are in

**Table 2**  
Operational variables and experimental results obtained for [OMA][BTA].

$\phi$	rpm ( $\text{min}^{-1}$ )	vvm ( $\text{min}^{-1}$ )	$P_g/V$ ( $\text{W m}^{-3}$ )	$N_{Re}$	$N_{We}$
0.050	400	0.50	4650	13680	210
		1.00	3066	13680	210
	700	0.75	7907	23941	642
		1000	0.50	15355	34201
0.125	400	0.75	3010	13680	210
		1.00	7582	23941	642
	700	0.50	7423	23941	642
		1.00	6249	23941	642
0.200	400	0.75	14732	34201	1311
		1.00	3890	13680	2100
	700	1.00	3282	13680	2100
		1000	0.75	7759	23941
1000	0.50	16145	34201	1311	
	1.00	15969	34201	1311	

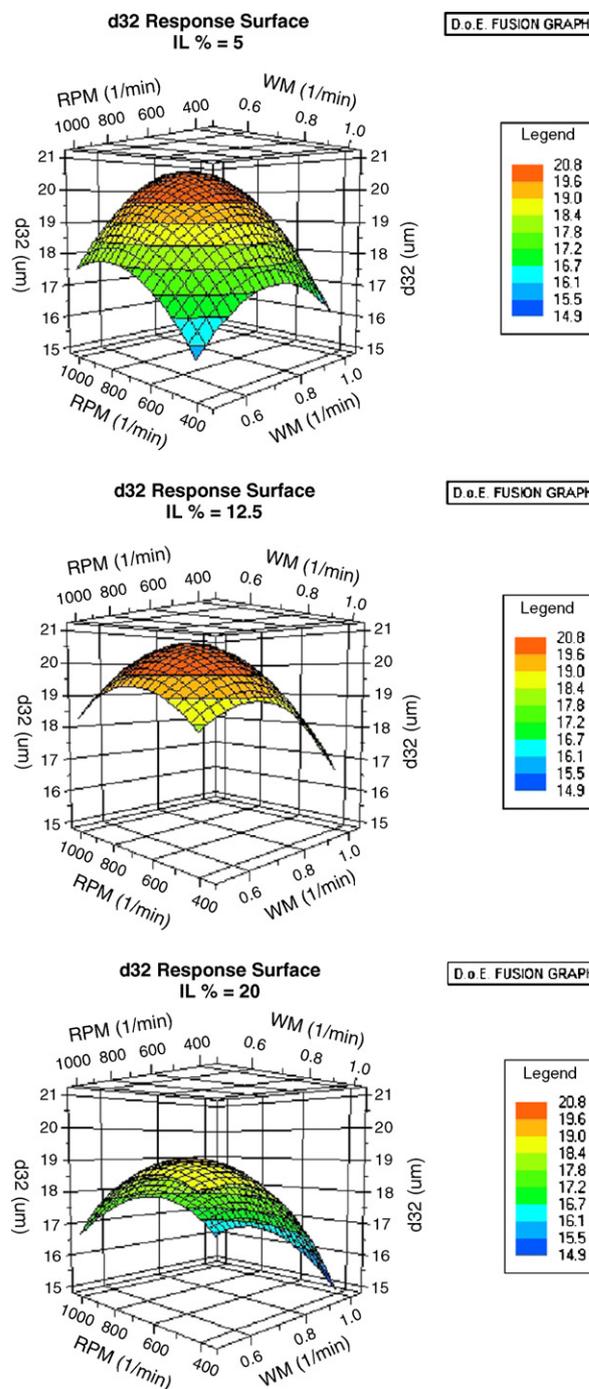
**Table 3**  
Operational variables and experimental results obtained for [MeBuPyrri][BTA].

$\phi$	rpm ( $\text{min}^{-1}$ )	vvm ( $\text{min}^{-1}$ )	$P_g/V$ ( $\text{W m}^{-3}$ )	$N_{Re}$	$N_{We}$
0.050	400	0.50	1629	13680	362
		1.00	1098	13680	362
	700	0.75	5478	23941	1110
		1000	0.50	14618	34201
0.125	400	0.75	1349	13680	362
		1.00	6940	23941	1110
	700	0.50	5883	23941	1110
		1.00	5256	23941	1110
0.200	400	0.75	14373	34201	2265
		1.00	1674	13680	362
	700	1.00	1229	13680	362
		1000	0.75	6051	23941
1000	0.50	17552	34201	2265	
	1.00	13397	34201	2265	

general one order of magnitude greater than for the commonly used ionic liquid [BMIM][PF<sub>6</sub>]. Viability experiments with the three ionic liquids on *E. coli*, a widely used host for whole cell bioconversions, have shown that [OMA][BTA] was the most biocompatible (see Table 1). This is probably related to the solubility of the ionic liquids in water since [OMA][BTA] was by far the least aqueous soluble of the three ionic liquid tested. Recently Pfruender et al. [18] have also reported on the biocompatibility of the ionic liquids [OMA][BTA] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] with the strain *E. coli* K12 (DSM 498) however the significance of the aqueous solubility on biocompatibility was not discussed.

**Table 4**  
Operational variables and experimental results obtained for [BMIM][PF<sub>6</sub>].

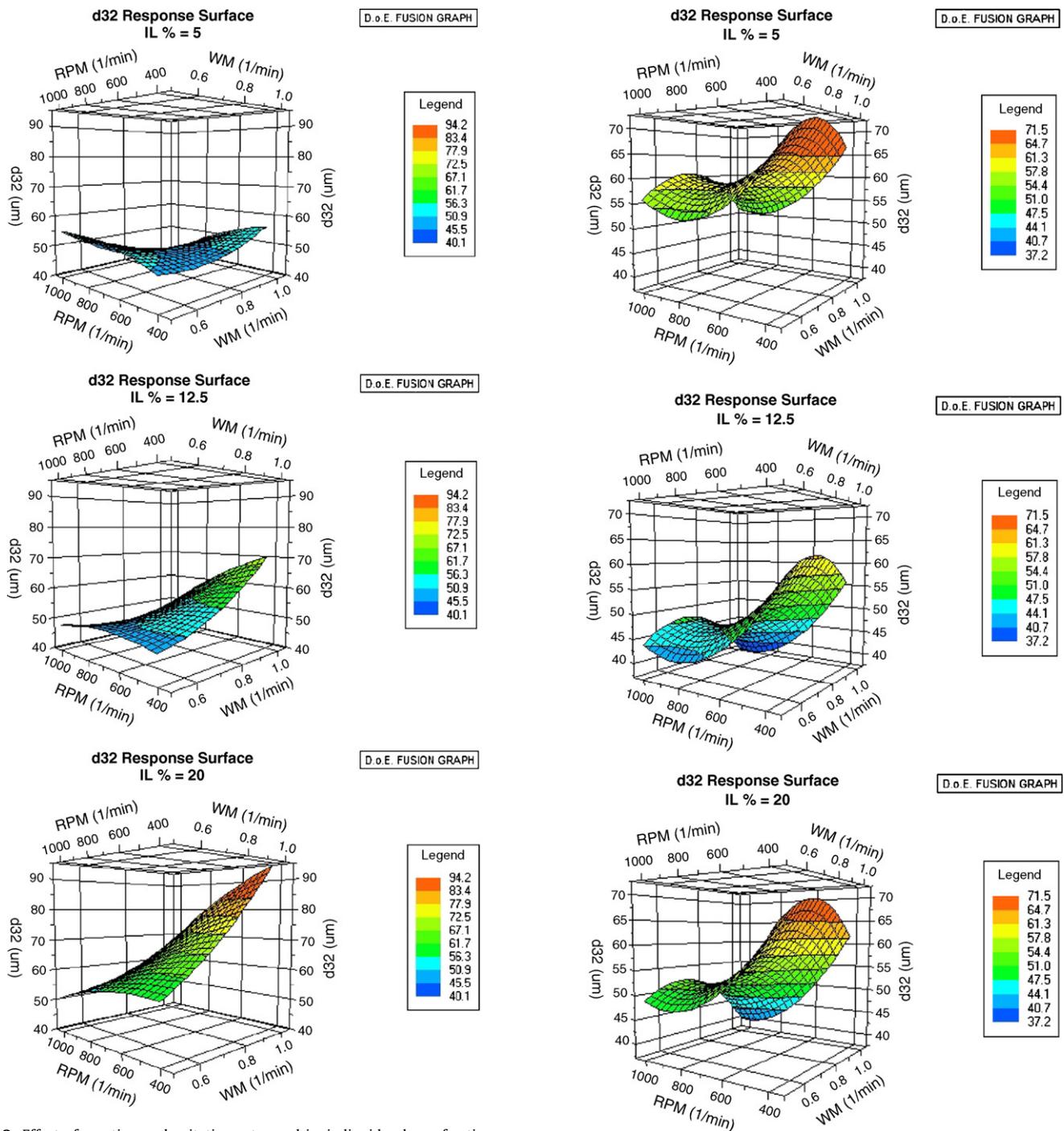
$\phi$	rpm ( $\text{min}^{-1}$ )	vvm ( $\text{min}^{-1}$ )	$P_g/V$ ( $\text{W m}^{-3}$ )	$N_{Re}$	$N_{We}$
0.050	400	0.50	2992	13680	548
		1.00	5947	13680	548
	700	0.75	10998	23941	1678
		1000	0.50	13641	34201
0.125	400	0.75	17574	34201	3425
		1.00	2026	13680	548
	700	0.50	8371	23941	1678
		1.00	5542	23941	1678
0.200	400	0.75	9244	23941	1678
		1.00	17485	34201	3425
	700	0.75	3398	13680	548
		1.00	3140	13680	548
1000	0.75	7615	23941	1678	
	1.00	16347	34201	3424	
1000	0.50	15136	34201	3424	



**Fig. 1.** Effect of aeration and agitation rates and ionic liquid volume fraction on measured  $d_{32}$  values for [OMA][BTA].

### 3.2. Power consumption and Sauter mean drop diameter ( $d_{32}$ ) correlation

The results obtained for the hydrodynamic experiments using [OMA][BTA], [MeBuPyrri][BTA], and [BMIM][PF<sub>6</sub>] are shown in Tables 2–4, respectively. All experiments studied were considered to be within the turbulent flow regime based on the calculated Reynolds numbers and visual observation of the fluid flow. The Reynolds numbers calculated were based on the viscosity of the continuous phase and ranged between 13,600 and 34,200. For the three dispersed ionic liquids, a positive effect of increasing agitation rate on  $P_g/V$  value was observed as expected. On the other hand,  $P_g/V$



**Fig. 2.** Effect of aeration and agitation rates and ionic liquid volume fraction on measured  $d_{32}$  values for [MeBuPyr][BTA].

**Fig. 3.** Effect of aeration and agitation rates and ionic liquid volume fraction on measured  $d_{32}$  values for [BMIM][PF<sub>6</sub>].

values decreased as aeration rates increased as would be expected for a single liquid phase. In the range studied, a clear effect of dispersed volume fraction on  $P_g/V$  values was not observed. Despite these similar patterns for the three dispersed ionic liquid phases, it was observed that experimental  $P_g/V$  values were affected by the physicochemical properties of the ionic liquid used (Tables 2–4). The order of magnitude of  $P_g/V$  values was similar to those obtained by Nielsen et al. [6] using a 2-L New Brunswick Bioflo I bioreactor ( $H_L/D_T = 0.96$ ;  $D_i/D_T = 0.45$ ) with a working volume of 1 L and two-phase liquid dispersions comprising water and *n*-hexadecane when agitated with two six-blade Rushton turbine impellers.

The relationship between inertial forces and cohesion forces, as represented by the Weber number ( $N_{We}$ ), was different for the

three ionic liquids due to their different interfacial tension values (Table 1):  $200 < N_{We} < 1300$  for [OMA][BTA],  $360 < N_{We} < 2265$  for [MeBuPyr][BTA], and  $540 < N_{We} < 3420$  for [BMIM][PF<sub>6</sub>]. The differences in  $\sigma$  and ionic liquid viscosity probably led to a different balance in droplet break up and coalescence phenomena for each dispersed ionic liquid phase. The relationships between the measured  $d_{32}$  values for each ionic liquid as a function of agitation and aeration rate are shown in Figs. 1–3. Surprisingly, the one order of magnitude higher viscosity and interfacial tension values for ([OMA][BTA]) led to the measured  $d_{32}$  values being 2- to 5-fold lower than for the other two ionic liquids. The response surface plots also show a marked transition from having a clear

**Table 5**  
Parameters established for  $d_{32}$  correlation.

Parameter	[OMA][BTA]	[MeBuPyr][BTA]	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]
$\delta$	$7.66 \times 10^{-4}$	$7.55 \times 10^{-3}$	$2.85 \times 10^{-3}$
$\alpha$	-0.420	-0.338	0.046
$\beta$	-0.115	0.213	-0.037
$\gamma$	0.373	0.319	-0.199
$\varepsilon$	0.409	-2.191	0.699
$r^{2a}$	0.35	0.62	0.58

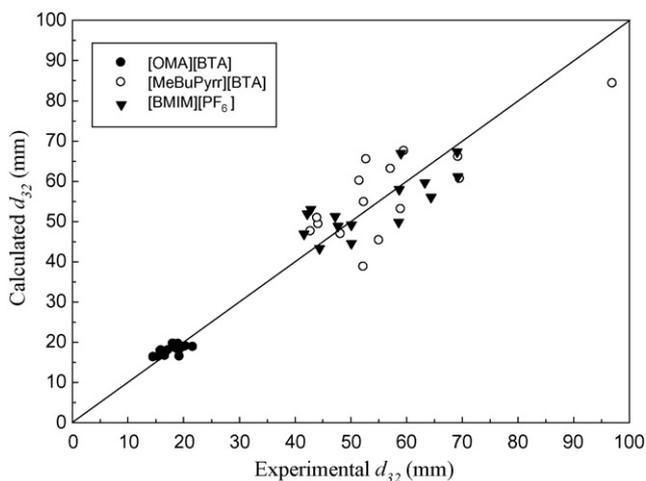
<sup>a</sup> Correlation coefficient.

maximum in  $d_{32}$  values (for [OMA][BTA]; Fig. 1) to a more complex saddle-type surface (for [BMIM][PF<sub>6</sub>]; Fig. 3). For both [OMA][BTA] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] a general decrease in  $d_{32}$  values is observed with increasing dispersed phase volume fraction. Dispersed-phase viscosity has a profound influence on both mean drop size and drop size distribution [10]. Recently, Marcellis et al. [19] found that the viscosity of the various oil phases they tested appeared to be the most critical physical parameter governing dibenzothiophene mass transfer rate in a multiphase bioreactor system, while density and interfacial tension were found to be of minor importance.

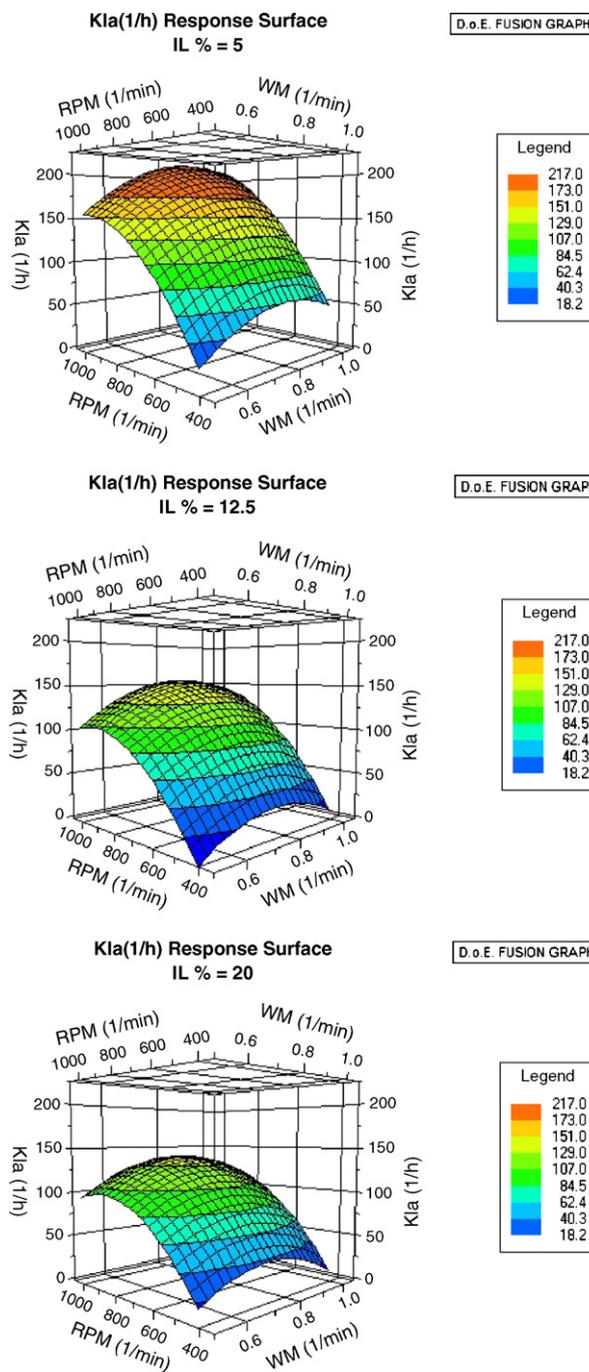
To correlate the experimental  $d_{32}$  data with the operational variables studied here for a three-phase system an expression similar in form to Eq. (4) was derived. This was obtained by dimensionless analysis including the interfacial tension and the phase volume fraction, and yielded Eq. (6):

$$\frac{d_{32}}{D_i} = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (\nu_s)^\beta N_{We}^\gamma (1 - \phi)^\varepsilon \quad (6)$$

where  $D_i$  represents the impeller diameter (m),  $P_g$  (W) the power input of the aerated bioreactor,  $V$  (m<sup>3</sup>) the bioreactor total liquid volume,  $\nu_s$  (m s<sup>-1</sup>) the superficial gas velocity through the bioreactor,  $\phi$  the volume fraction of the dispersed phase, and  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\varepsilon$  are numerical constants. All the experimental  $d_{32}$  data were fitted to Eq. (6) using Polymath™ software. Parameter values obtained for the model constants for each ionic liquid and the correlation coefficients are shown in Table 5. The first thing to note is that the parameter values are different for each ionic liquid which suggests they depend on the physicochemical properties of the dispersed phase. Second, the exponent values of the Weber number for [OMA][BTA] and [MeBuPyr][BTA] were quite different to the -0.6 value reported elsewhere at low phase ratio and considering empirical equations similar to Eq. (2). For [BMIM][PF<sub>6</sub>] the expo-



**Fig. 4.** Drop size,  $d_{32}$ , parity plots of experimental versus predicted values from the correlation using the calculated parameters shown in Table 5. (●) [OMA][BTA], (○) [MeBuPyr][BTA], and (▼) [BMIM][PF<sub>6</sub>].



**Fig. 5.** Effect of aeration and agitation rates and ionic liquid volume fraction on measured  $k_{La}$  values for [OMA][BTA].

nent value was -0.2; Desnoyer et al. [20] found that this exponent is a decreasing function of the phase ratio at high void fractions (up to 60%, v/v), revealing the existence of a more complex breakup mechanism with high phase ratio. The low correlation coefficient seen in Table 5 for [OMA][BTA] probably is a consequence of its high viscosity (between 7.5 and 10 times higher than the others) and its low maximum water solubility (between 270 and 930 times lower than the others), suggesting that variations of these physicochemical properties of the dispersed phase modified the relationship of inertial and cohesion forces which controls break up of the droplets.

Fig. 4 shows parity plot of experimental versus predicted  $d_{32}$  values from the correlation using the calculated parameter values. It is observed that most of the predicted values appeared to be not

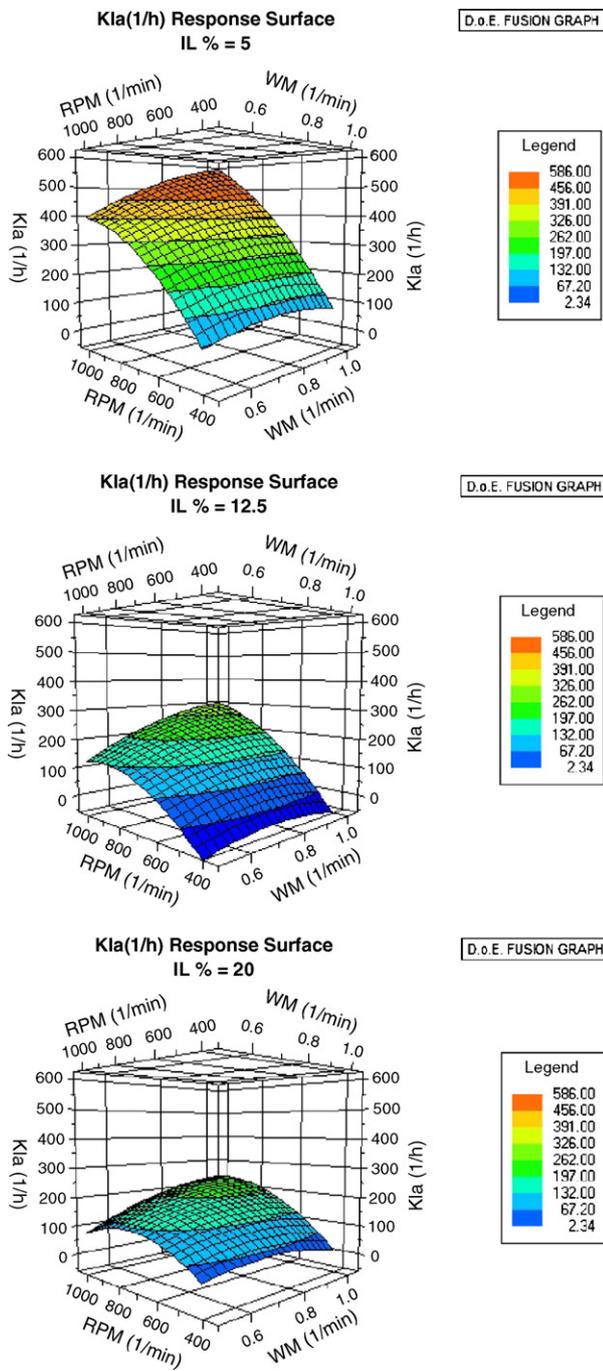


Fig. 6. Effect of aeration and agitation rates and ionic liquid volume fraction on measured  $k_La$  values for [MeBuPyrr][BTA].

well distributed about the experimental data probably indicating that for [OMA][BTA] in particular the model did not represent the group of data obtained at low  $N_{We}$  values very well. For the two other ionic liquids however, acceptable correlations were obtained for the purposes of early stage process design.

### 3.3. Power consumption and oxygen mass transfer coefficient ( $k_La$ ) correlation

The effect of bioreactor operating conditions and dispersed phase volume fraction on experimentally determined  $k_La$  values for the three ionic liquids [OMA][BTA], [MeBuPyrr][BTA] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] is shown in Figs. 5–7, respectively. For all three ionic

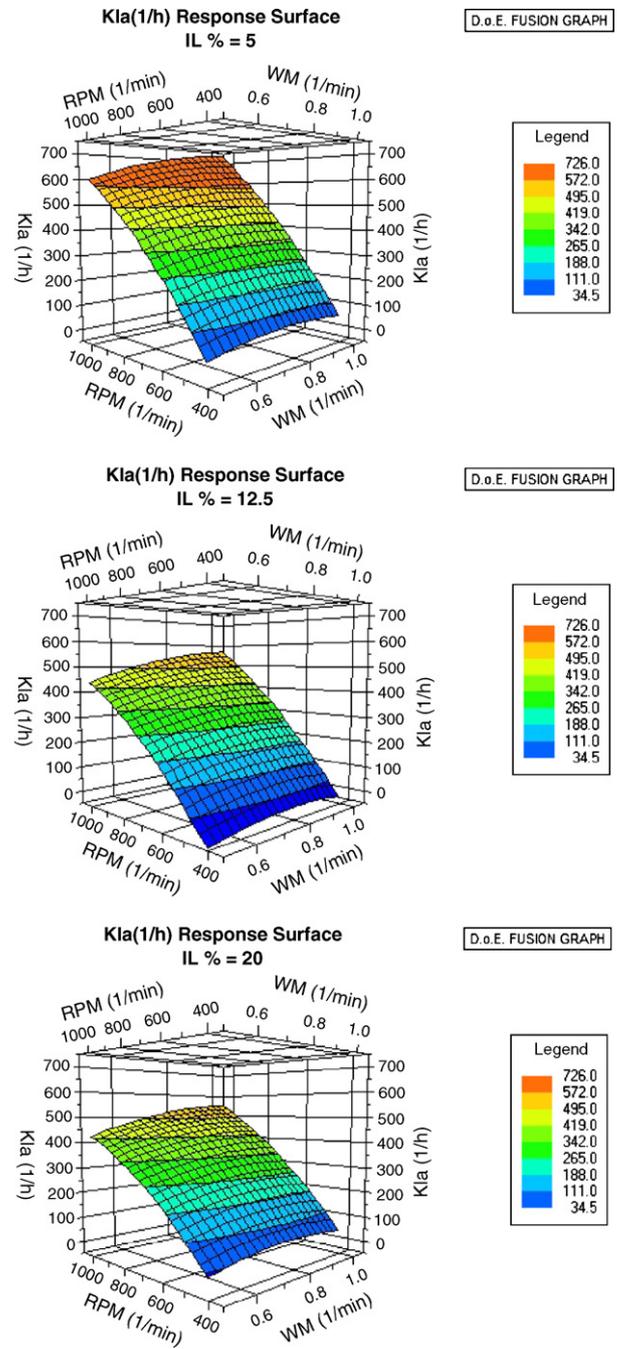


Fig. 7. Effect of aeration and agitation rates and ionic liquid volume fraction on measured  $k_La$  values for [BMIM][PF<sub>6</sub>].

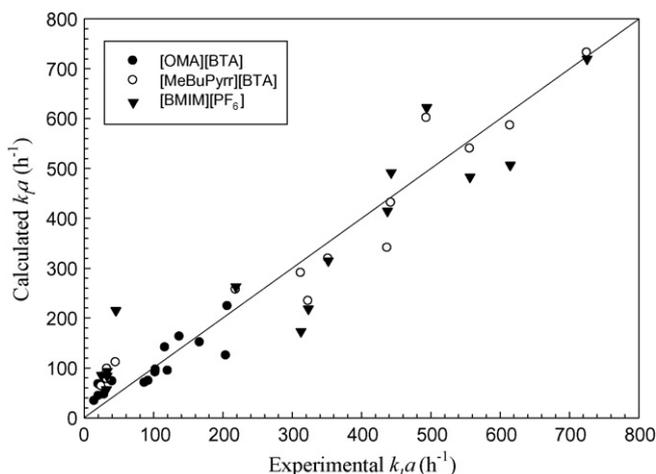
liquids  $k_La$  values generally increased as agitation and aeration rates increased as would be expected from more conventional biphasic gas–liquid system studies. The maximum  $k_La$  values obtained for [OMA][BTA] of around  $200\text{ h}^{-1}$  at a dispersed phase volume fraction of 5% are significantly lower than the highest  $k_La$  values measured in the presence of the two other ionic liquids which were both  $>500\text{ h}^{-1}$ . The reason for this is unclear but may be related to the significantly smaller droplets formed with this ionic liquid (Fig. 1) compared to the other two (Figs. 2 and 3) and the impact the droplets have on gas–liquid dispersion.

For all three ionic liquids, the measured  $k_La$  values are observed to decrease as the ionic liquid volume fraction increases from 5 to 20%. For [OMA][BTA] and [MeBuPyrr][BTA], these decreases in  $k_La$  were by up to one order of magnitude under the same operat-

**Table 6**  
Parameters established for  $k_L a$  correlation.

Parameter	[OMA][BTA]	[MeBuPyr][BTA]	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]
$\delta$	$2.20 \times 10^{-3}$	$6.88 \times 10^{-3}$	$7.49 \times 10^{-6}$
$\alpha$	0.741	0.815	1.114
$\beta$	0.556	0.636	0.098
$\gamma$	3.270	2.651	1.350
$r^{2a}$	0.76	0.94	0.86
$k_L a = \delta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta (1 - \phi)^\gamma$			

<sup>a</sup> Correlation coefficient.



**Fig. 8.** Oxygen transfer coefficient,  $k_L a$ , parity plot of experimental versus predicted values from the correlation using the calculated parameters shown in Table 6. (●) [OMA][BTA], (○) [MeBuPyr][BTA], and (▼) [BMIM][PF<sub>6</sub>].

ing conditions. Nielsen et al. [6] examined the effect of increasing volume fraction on  $k_L a$  using *n*-hexadecane as the second liquid phase. In contrast to this study, these authors found that oxygen mass transfer rates actually increased when the organic phase volume fraction was increased. This was attributed to the addition of a second immiscible phase with a much higher solubility of oxygen compared to water, increasing the general level of oxygen solubility of the system. In a revised approach [7] considering the same aqueous-organic phase system, the authors using a more fundamental two-phase mass transfer model more clearly demonstrate the potential for oxygen mass transfer enhancement by organic phase addition which is one of the motivations for employing a distinct second phase in a partitioning bioreactor. Recently, Gomes et al. [12] claimed that the presence of oil in the medium increases the overall  $k_L a$  value of the system, but this effect is opposite when the medium contains surfactant (Tween 80).

Using a correlation of the form previously described for multi-phase dispersions [6,12] the experimental  $k_L a$  values obtained here were fitted to Eq. (4) using Polymath™ software. Estimated parameter values and the correlation coefficients obtained for the three ionic liquids are shown in Table 6. The calculated values for  $\alpha$  and  $\beta$  again suggest that there are different gas bubble break up and coalescence mechanisms for each ionic liquid as was found for the measured  $d_{32}$  values. For instance with [OMA][BTA],  $\alpha$  and  $\beta$  values (around 0.7 and 0.5, respectively) could indicate a coalescing environment in a stirred reactor with a six flat-bladed disk turbine as suggested by Moo-Young and Blanch [21]. However, for [MeBuPyr][BTA] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] the calculated  $\alpha$  and  $\beta$  values are not indicative of either coalescing or non-coalescing behaviour. The high values of the correlation coefficients indicate good agreement between experimental data and correlation predictions using the parameters calculated in Table 6.

Fig. 8 shows the parity plot of experimental versus predicted values from the correlation using calculated parameters. Most of the predicted values appeared to be well distributed about the experimental data, which indicates a good approximation between experimental  $k_L a$  values and the values calculated by the correlation. The relation between the  $k_L a$  values predicted by the correlations and the experimental values presents a similar dispersion reported elsewhere [6,12] using Eq. (4).

## 4. Conclusions

The measured physicochemical properties of the three ionic liquids used in this work showed an important influence on droplet break up and coalescence mechanisms in stirred dispersions. These led to significantly different patterns for the variation of both  $k_L a$  and  $d_{32}$  as a function of bioreactor operational conditions (agitation and aeration rates). In general increasing ionic liquid volume fraction had a negative impact on  $k_L a$  and to some extent on the measured  $d_{32}$  though the exact relationship for  $d_{32}$  values depended on the particular ionic liquid used. Empirical correlations relating  $k_L a$ , and to a lesser extent  $d_{32}$ , values to bioreactor operating conditions showed good agreement between measured and predicted values. These correlations can now be used to inform the better design and operation of three-phase partitioning bioreactors particularly those in our laboratories in which oxidative whole cell bioconversions are being performed.

## Nomenclature

### Symbols

$D_i$	impeller diameter (m)
$D_T$	bioreactor diameter (m)
$d_i, d_p$	drop size (m)
$d_{32}$	Sauter mean drop diameter (m)
$H$	mean volume fraction of the dispersed phase
$H_L$	liquid height (m)
$k_L a$	oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $s^{-1}$ )
$P/V$	power input per volume ( $W m^{-3}$ )
$P$	power input (W)
$P_g$	power input of the aerated bioreactor (W)
$V$	bioreactor working volume ( $m^{-3}$ )

### Greek letters

$\alpha$	numerical constant
$\beta$	numerical constant
$\gamma$	numerical constant
$\delta$	numerical constant
$\sigma$	interfacial tension ( $kg s^{-2}$ )
$\rho_c$	density of the continuous phase ( $kg m^{-3}$ )
$\phi$	volume fraction of the dispersed phase
$v_s$	superficial gas velocity through the bioreactor ( $m s^{-1}$ )
$\mu_c$	viscosity of the continuous phase ( $kg m^{-1} s^{-1}$ )
$\mu_d$	viscosity of the dispersed phase ( $kg m^{-1} s^{-1}$ )

## Acknowledgements

We are grateful to the National Council of Science and Technology (Conacyt México) for financial support. M.M. and G.J.L. would like to thank the UK Engineering and Physical Sciences Research Council (EPSRC) for support of the multidisciplinary UCL Biocatalysis Integrated with Chemistry and Engineering (BiCE) programme (GR/S62505/01). Financial support from the 13 industrial partners supporting the BiCE programme is also acknowledged.

## References

- [1] J.J. Malinowski, Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology, *Biotechnol. Adv.* 19 (2001) 525–538.
- [2] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131–138.
- [3] S.G. Cull, J.D. Holbrey, V. Vargas-Mora, K.R. Seddon, G.J. Lye, Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 227–233.
- [4] D. Çelik, E. Bayraktar, Ü. Mehmetoğlu, Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system, *Biochem. Eng. J.* 17 (2004) 5–13.
- [5] S.D. Doig, P.J. Avenell, P.A. Bird, P. Gallati, K.S. Lander, G.J. Lye, R. Wohlgemuth, J.M. Woodley, Reactor operation and scale-up of whole cell Baeyer–Villiger catalyzed lactone synthesis, *Biotechnol. Progr.* 18 (2002) 1039–1046.
- [6] D.R. Nielsen, A.J. Daugulis, P.J. McLellan, A novel method of simulating oxygen mass transfer in two-phase partitioning bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 735–742.
- [7] D.R. Nielsen, J. Daugulis, J. McLellan, A restructured framework for modeling oxygen transfer in two-phase partitioning bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 91 (2005) 773–777.
- [8] P.A. Quadros, C.M.S.G. Baptista, Effective interfacial area in agitated liquid–liquid continuous reactors, *Chem. Eng. Sci.* 58 (2003) 3935–3945.
- [9] A.W. Nienow, Break-up, coalescence and catastrophic phase inversion in turbulent contactors, *Adv. Colloid Interface* 108–109 (2004) 95–103.
- [10] R.V. Calabrese, T.P.K. Chang, P.T. Dang, Drop break-up in turbulent stirred-tank contactors. Part I. Effect of dispersed-phase viscosity, *AIChE J.* 32 (1986) 657–666.
- [11] P.H. Calderbank, Physical rate processes in industrial fermentation. Part I. The interfacial area in gas–liquid contacting with mechanical agitation, *Trans. Inst. Chem. Eng.* 36 (1958) 443–463.
- [12] N. Gomes, M. Aguedo, J. Teixeira, I. Belo, Oxygen mass transfer in a biphasic medium: influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into  $\gamma$ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochem. Eng. J.* 35 (2007) 380–386.
- [13] G. Ascanio, B. Castro, E. Galindo, Measurement of power consumption in stirred vessels: a review, *Trans IChemE, Part A: Chem. Eng. Res. Des.* 82 (2004) 1282–1290.
- [14] J. Koizumi, S. Aiba, Reassessment of the dynamic  $k_La$  method, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 1131–1133.
- [15] S.G. Cull, J.W. Lovick, G.J. Lye, P. Angeli, Scale-down studies on the hydrodynamics of two-liquid-phase biocatalytic reactors, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 25 (2002) 143–153.
- [16] J. Lovick, A.A. Mouza, S.V. Paras, G.J. Lye, P. Angeli, Drop size distribution in highly concentrated liquid–liquid systems in stirred tanks using a light back scattering method, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 545–552.
- [17] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, sixth edition, John Wiley & Sons, 2005.
- [18] H. Pfruender, R. Jones, D. Weuster-Botz, Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis, *J. Biotechnol.* 124 (2006) 182–190.
- [19] C.L.M. Marcelis, M. van Leeuwen, H.G. Polderman, A.J.H. Janssen, G. Lettinga, Model description of dibenzothiophene mass transfer in oil/water dispersion with respect to biodesulfurization, *Biochem. Eng. J.* 16 (2003) 253–264.
- [20] C. Desnoyer, O. Masbernat, C. Gourdon, Experimental study of drop size distributions at high phase ratio in liquid–liquid dispersions, *Chem. Eng. Sci.* 58 (2003) 1353–1363.
- [21] M. Moo-Young, H.W. Blanch, Design of biochemical reactors: mass transfer criteria for simple and complex systems, *Adv. Biochem. Eng.* 19 (1981) 1–69.