

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Unidad Iztapalapa

Ciencias Biológicas y de la Salud

Análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases mediante la determinación de tiempos característicos

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.Bto. Rodrigo Melgarejo Torres

Director de Tesis:

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Asesores:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Dr. Adrián Gómez de Jesús

México, D.F., Septiembre del 2010

La maestría en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo con número de registro 0471-O.

Este trabajo forma parte del proyecto “Estrategias de escalamiento descendente (*scale down*) para biorreactores de partición” financiado por el CONACYT con número de registro SEP-CONACyT-2007-80847.

México D. F. a 2 de Septiembre del 2010.

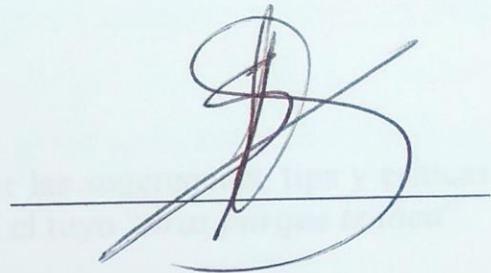
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

ANÁLISIS DE RÉGIMEN DE UN BIORREACTOR DE PARTICIÓN DE TRES FASES MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE TIEMPOS CARACTERÍSTICOS

Que presentó

Rodrigo Melgarejo Torres

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

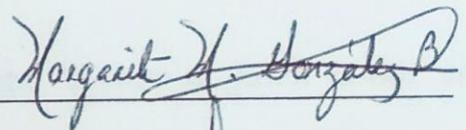


JURADO

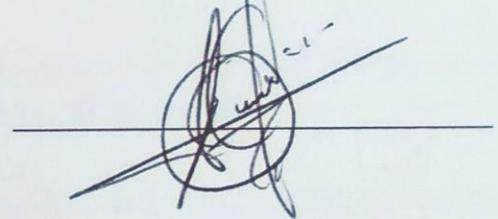
Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



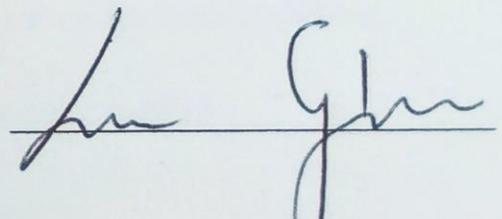
Secretario: Dra: Margarita Mercedes González Brambila
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco



Vocal: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Vocal: Dr. Adrián Gómez de Jesús
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio, guía y amigo, porque tengamos más logros.

A los Doctores Margarita, Mariano, Omar y Adrián por las revisiones, correcciones, críticas y mejoras a este trabajo.

A los Doctores Arely, Ernesto, Sergio y Gerardo motores imprescindibles para que esta planta piloto 4 camine.

Para Dany, por los días y noches de trabajo y reventón, por las sugerencias, tips y críticas, por ser amigo, colega y cómplice; que el próximo logro sea el tuyo “*tiras porque te toca*”.

A la Dra. Rosy porque sus sugerencias fueron fundamentales para la defensa de ésta tesis, por las lagrimas de muerte y sonrisas de vida compartidas, por ser la musa, la diosa. Tuyo siempre.

Al Dr. Germán, gracias por mostrarme lo grande que es mi ignorancia.

A Memo, por su excelente trabajo y desempeño en la planta “*Honor a quién honor se merece*”.

DEDICATORIAS

A Irene y Lucas; nos preparamos para todo, menos para ser padres. Sin embargo, mi vida no pudo ser mejor que con ustedes. Eternamente agradecido, gracias por todo.

Para mis amigas y enemigas intimas: Caro, Pie, Ame y Adri, gracias por darle día a día alegría a mi corazón; de lo mejor que tengo en la vida.

Pa´ mi Tete que pronto estés de vuelta y que la vida te pague más de lo que le debes.

A los vigías de las frías noches de hospital, Jordí, Henrrous, Poncho, y Ruelas, se quien son y donde están los amigos de verdad.

Para esos ingratos: Elisa, Riko, Chimino y Jacob, que se largaron en busca de una vida mejor, dejándome un baúl lleno de bellos recuerdos, donde quiera que estén, va para ustedes.

Para el Mauro y Macario hermanos de siempre, que nunca piden nada a cambio y siempre dan.

A mi Blanquis, amiga del alma, deseando que pronto tus ojitos vuelvan a brillar.

A Fabys y Richy, felicidades, que no hay nada mejor que encontrar un amor a medida.

Pa´ mi Ednita que la salud te sonría de nuevo para que pronto estés de vuelta.

A las Spice: Dany, Gaby, Ruth, Sary y Diana por darle alegría, locura y un toque femenino a nuestra planta.

A mi July que aunque ya es mexicana, aún así no será miss Universo, pero desde que es mi amiga se ganó mi corazón.

Para Cele y Eli, que este trabajo también es de ustedes.

Para Alma, Aidee, Nubia y Mary Jo.

A todos los demás compañeros y amigos de la planta 4 y laboratorios anexos (empezando desde la A a la Z y viceversa), este pequeño triunfo también es de ustedes.

Para mis amiguitos chilenos: Marjorie, Tere, Solange, Andrés, Ricardo, Carlitos y la anexada colombiana Andrea, por sus buenas compañías en los fríos aires del sur.

Y a mis queridos enemigos por sus balas que me zumban, pero no me dan.

Cualquier pelea que yo diera en ésta vida, sin ustedes yo no podría.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA	xii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	2
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Biorreactores de partición	3
1.1.1 Aplicaciones de los biorreactores de partición.....	3
1.1.2 Características de este tipo de reactores	5
1.2 Líquidos iónicos	8
1.3 Reacciones tipo Baeyer-Villiger	10
1.3.1 Usos y aplicaciones de los productos de las reacciones tipo Baeyer-Villiger	13
1.4. Mecanismos de mezclado, transporte de masa y parámetros cinéticos de bioconversión en un biorreactor de partición de tres fases	14
1.4.1. Tiempo de mezclado en biorreactores trifásicos.....	14
1.4.2. Transferencia de sustratos y productos en reactores de partición de tres fases.....	15
1.4.3. Transferencia de oxígeno en reactores de partición de tres fases	17
1.4.4. Tasas de consumo de sustrato y oxígeno en un biorreactor de partición de tres fases	18
1.5. Análisis de régimen en un biorreactor de partición de tres fases	18
1.5.1 El tiempo característico de un proceso.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
2.1. HIPÓTESIS	23
2.2. JUSTIFICACIÓN	23
2.3. OBJETIVO	23
2.3.1. Objetivo general.....	23
2.3.2. Objetivos específicos	24
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.2 Reactivos	26
4.3 Microorganismo	26
4.3.1 Conservación	26
4.3.2 Medio de cultivo.....	27
4.3.3 Inóculo para la producción del biocatalizador.....	27
4.3.4 Producción.....	27
4.3.5 Lavado	28
4.3.6 Densidad óptica	29
4.3.7 Peso seco.....	29
4.3.8 Curva de calibración para estimar la concentración celular	29
4.3.9 Curva de calibración para concentración de sustrato y producto.....	29

4.4 Tiempo de mezclado	30
4.5 Coeficientes volumétricos de transferencia de sustrato y producto ($K_S A$ y $K_P A$).....	33
4.5.1 Coeficientes de transferencia de sustrato y producto (K_S y K_P) por medio de la Celda de Lewis modificada	33
4.5.2 Determinación del área de transferencia de masa (A) de la fase dispersa en el reactor	38
4.5.3 Estimación de los coeficientes volumétricos de transferencia de sustrato y producto ($K_S A$ y $K_P A$) en el reactor	39
4.6 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa para oxígeno.....	40
4.6.1 Calibración del electrodo	40
4.6.2 Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno	40
4.6.3 Coeficientes volumétricos de transferencia de masa de O_2	40
4.6.4 Consumo de Potencia gaseada por unidad de volumen (P_g/V)	42
4.6.5 Velocidad superficial del gas en el biorreactor (V_s).....	42
4.7 Tasa de consumo de O_2.....	42
4.7.1 Tasa de consumo de O_2 para mantenimiento.....	43
4.7.2 Tasa de consumo de O_2 con reacción.....	44
4.8 Tasa de consumo de sustrato	44
5. RESULTADOS Y DISCUSION	46
5.1 Tiempo de mezclado	46
5.1.2 Tiempo de mezclado para el sistema bifásico (agua-aire).....	46
5.1.3 Tiempo de mezclado para el sistema trifásico (agua-líquido iónico-aire)	47
5.2 Coeficientes de transferencia de masa para sustrato y producto ($K_S A$ y $K_P A$)	50
5.2.1 Coeficiente de transferencia de masa para sustrato, K_S	50
5.2.2. Coeficiente de transferencia de masa para producto, K_P	51
5.2.3 Cálculo del área de transferencia de masa de la fase dispersa (A) en el biorreactor	52
5.3 Coeficientes volumétricos de transferencia de masa para O_2.....	62
5.4 Tasa de consumo de Oxígeno del biocatalizador	66
5.5 Tasa de consumo de sustrato por el biocatalizador	68
5.6 Determinación de los tiempos característicos de los mecanismos estudiados	70
5.6.1 Tiempo característico de mezclado (τ_m).....	70
5.6.2 Tiempo característico derivado del coeficiente de transferencia de sustrato ($\tau_{K_S A}$)	70
5.6.3 Tiempo característico derivado del coeficiente de transferencia de producto ($\tau_{K_P A}$).....	71
5.6.4 Tiempo característico derivado del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($\tau_{K_L a}$)...	72
5.6.5 Tiempo característico derivado de la tasa de consumo de O_2 ($t_{C_{R_{O_2}}}$).....	73
5.6.6 Tiempo característico derivado de la tasa de consumo de sustrato (τ_{R_S})	73
5.6.7 Resumen de los tiempos característicos obtenidos del análisis de régimen	74
5.7 Determinación de la etapa limitante del sistema.....	74
6. CONCLUSIONES	76
7. RECOMENDACIONES.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	85
ANEXO I Curva de calibración para la cuantificación de biomasa	85
ANEXO II Curva de calibración para estimar la concentración de sustrato y producto	85

ANEXO III Estabilidad del [MeBuPyrr][BTA] en función del NaOH y T	86
ANEXO IV Determinación del tiempo de respuesta del electrodo de pH	88
ANEXO V Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno	89
ANEXO VI Estimación de Pg/V en el biorreactor	91
ANEXO VII Velocidades superficiales de las fases iónica y acuosa en la celda de Lewis	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.5.	Tiempos característicos para la producción de ácido glucónico en un fermentador de 25 m ³ . _____	21
Tabla 4.1.	Diseño experimental para la estimación del tiempo de mezclado para un sistema líquido-gas. _____	32
Tabla 4.2.	Diseño experimental para la estimación del tiempo de mezclado a diferentes condiciones de operación. _____	32
Tabla 4.3.	Diseño experimental para la estimación de K_S 's y K_P 's en la celda de Lewis modificada. _____	34
Tabla 4.5.	Diseño experimental para la estimación del d_{32} de la fase dispersa en el biorreactor. _____	38
Tabla 5.1.	Comparación de tiempos de mezclado y volúmenes de operación con otros trabajos. _____	49
Tabla 5.2.	Coefficientes de transferencia de masa de la fase iónica a la acuosa y viceversa. _____	51
Tabla 5.3.	Comparación de los coeficientes del modelo para la estimación de K_{LA} de O ₂ en sistemas trifásicos propuesta por Nielsen y col. (2003). _____	66
Tabla 5.4.	Comparación de tasas de consumo de oxígeno con los reportados en la literatura. _____	68
Tabla 5.5.	Resultados experimentales y estimados por el modelo modificado de Aiba y col. (1968) de la cinética de consumo de sustrato. _____	69
Tabla 5.6.	Comparación de tasas específicas de consumo de sustrato con los reportados en la literatura. _____	70
Tabla 5.7.	Tiempos característicos de los mecanismos estudiados en el análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases. _____	85
Tabla AVI.1	Potencias gaseadas por unidad de volumen obtenidas a las diferentes condiciones de operación en el biorreactor. _____	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Reacción de un ataque nucleofílico a una cetona con un ácido dando como producto la formación de una lactona (Kamerbeek y col., 2003)_____	10
Figura 1.2.	Mecanismo de reacción para CHMO por oxido-reducción (Alphand y col., 2003). ____	13
Figura 1.3.	Posibles mecanismos de transferencia de oxígeno en presencia de vectores (B: burbuja de aire, C: célula, V: gota de la fase dispersa). _____	17
Figura 1.4	Respuesta de un mecanismo de primer orden. _____	21
Figura 3.1.	Diagrama general de la estrategia propuesta para llegar a un criterio de escalamiento descendente en un biorreactor de partición de tres fases. La zona punteada indica el trabajo realizado en esta tesis. _____	25
Figura 4.1.	Posiciones del electrodo estudiadas para determinar el tiempo de mezclado. _____	31
Figura 4.3.	Celda de Lewis modificada propuesta en este trabajo para la estimación de los coeficientes de transferencia de masa de sustrato K_S 's y producto K_P 's. _____	34
Figura 5.1.	Variación del pH en ambas posiciones del electrodo para determinar la homogeneidad en el reactor (400 rpm, 0.5 vvm). _____	46
Figura 5.2.	Tiempos de mezclado a diferentes velocidades de agitación (400, 700 y 1000 rpm) y aeración (0.5, 0.75 y 1 vvm) para un sistema bifásico (agua-aire). _____	47
Figura 5.3.	Tiempos de mezclado en un sistema trifásico agua-líquido iónico-gas a diferentes condiciones de operación: (rpm, vvm y fracción iónica) a) 5%, b) 12.5 % y c) 20% de fracción iónica. _____	48
Figura 5.4.	Interacciones más importantes que influyen en el tiempo de mezclado. _____	49
Figura 5.5.	Coefficientes de transferencia de masa de Sustrato en función de los N_{Re} interfaciales de la fase iónica y la acuosa. _____	50
Figura 5.6.	Coefficientes de transferencia de masa para producto en función de los N_{Re} de las fases iónica y la acuosa en la interfase de la Celda de Lewis. _____	52
Figura 5.7.	Variación del d_{32} de la fase dispersa a diferentes condiciones de operación del reactor (rpm, vvm y biomasa, fracción iónica) con 5 g/L de biomasa constante a) 5%, b) 12.5 %, c) 20% de fracción iónica. _____	54
Figura 5.8.	Diámetro promedio de gota <i>Sauter</i> , d_{32} , obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, manteniendo la fracción de fase dispersa constante (20%) y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g/L. _____	55
Figura 5.9.	Variables más importantes que influyen en el d_{32} de la fase dispersa, según el cuadro de Pareto. _____	56
Figura 5.10.	$K_S A$ obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, sin biomasa y variando la fracción iónica: a) 5, b) 12.5 y c) 20 %. _____	57

Figura 5.11.	K_{SA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, manteniendo la fracción iónica constante 20% y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g_b/L . _____	58
Figura 5.12.	K_{PA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, sin biomasa y variando la fracción iónica: a) 5, b) 12.5 y c) 20 %. _____	59
Figura 5.13.	K_{PA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, manteniendo la fracción iónica constante 20% y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g_b/L . _____	60
Figura 5.14.	Cuadro de Pareto variables de operación más importantes que influyen en los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (K_{LA}) para sustrato y producto. ____	61
Figura 5.15.	K_{LA} de oxígeno a diferentes condiciones de operación sin biomasa y variando la fracción dispersa a) 5, b) 12.5 y c) 20 %. _____	63
Figura 5.16.	K_{LA} a diferentes condiciones de operación manteniendo la fracción dispersa constante 20 % y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g_b/L . _____	64
Figura 5.17.	Valores experimentales de K_{LA} versus estimados (♦) a partir de una correlación empírica propuesta por Nielsen y col. (2003) para un biorreactor de partición de tres fases _____	65
Figura 5.18.	Tasa de consumo de O_2 a una concentración celular de 3 g_b/L en fase acuosa. _____	67
Figura 5.19.	Tasa de consumo de sustrato experimental y estimada el modelo modificado de Aiba y col. (1968) en función de la concentración de sustrato. _____	69
Figura AI.1.	Curva de calibración para la estimación de la concentración de biomasa en peso seco. _	85
Figura AII.1.	Curvas de calibración para sustrato y producto. _____	86
Figura AIII.1.	200 μL de [MeBuPyrr] [BTA] con 600 μL de 3M NaOH: a) temperatura ambiente 25 °C, b) 100 ° C y c) Blancos: 200 μL de Líquido iónico con 600 μL de agua destilada a 25 y 100 °C. _____	87
Figura AIV.1.	Tiempo de respuesta del electrodo de pH, considerado como el tiempo que tarda en llegar al 63.2% de transición de un pH de 4 a 7. _____	88
Figura AIV.2	Intervalos de tiempo donde se encontró el 63.2 % de transición de un pH de 4 a 7, para estimar el tiempo de respuesta del electrodo de pH. _____	88
Figura AV.1	Tiempo que tardó el electrodo en pasar de una concentración de una solución de 0 a 100 % de oxígeno, para estimar el tiempo de respuesta. _____	92
Figura AV.2.	Tiempos donde se encontró el 63.2 % de saturación de oxígeno del electrodo, con esta gráfica se estimó el tiempo de respuesta. _____	92

SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

Para facilidad del lector, en este anexo se muestran los significados de las nomenclaturas y símbolos empleados en este trabajo, así como sus unidades en el SI.

a área de transferencia de oxígeno en el biorreactor ($m^2/m^3 = m^{-1}$)

A área volumétrica de transferencia de masa de la fase dispersa en el reactor ($m^2/m^3 = m^{-1}$)

a_L área de transferencia de masa de la celda de Lewis ($m^2/m^3 = m^{-1}$)

C_E concentración de oxígeno medido por el electrodo (g_{O_2}/L)

C_L concentración de oxígeno en el reactor a cualquier tiempo (g_{O_2}/L)

C_L^* concentración de saturación de oxígeno en el biorreactor (g_{O_2}/L)

d_{32} diámetro promedio (*Sauter*) de la fase dispersa en el biorreactor en (μm)

DO densidad óptica para la estimación de biomasa en el espectrofotómetro en (nm)

E fuerza electromotriz suministrada al motor (Volts)

g_b masa de biomasa (g)

g_{O_2} masa de oxígeno (g)

g_p masa de producto (g)

g_s masa de sustrato (g)

H criterio de homogeneidad al 95 % para estimar el tiempo de mezclado (adimensional)

$H:T$ es la relación de altura y diámetro de un reactor tipo tanque agitado

I Corriente eléctrica del motor (Amp)

k Es la constante de ganancia en de un mecanismo (adimensional)

K coeficiente de partición (adimensional)

K_e es la constante del electrodo estimado a partir del tiempo de respuesta (s^{-1})

K_{La} coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno en el biorreactor en (h^{-1})

K_P coeficiente de transferencia de masa para producto ($m s^{-1}$)

K_{PA} coeficiente volumétrico de transferencia de masa para producto en el biorreactor (h^{-1})

K_S coeficiente de transferencia de masa para sustrato ($m s^{-1}$)

K_{SA} coeficiente volumétrico de transferencia de masa para sustrato en el biorreactor (h^{-1})

L unidades de volumen en litros

O_2^* es la concentración máxima de saturación de oxígeno en el biorreactor (g_{O_2}/L)

P concentración de producto de la fase acuosa a cualquier tiempo en la Celda de Lewis (g_p/L)
 P_f concentración final de saturación de producto en la fase acuosa en la celda de Lewis (g_p/L)
 P_g/V potencia gaseada por unidad de volumen ($W\ m^{-3}$)
 P_o concentración inicial de producto en la fase acuosa en la Celda de Lewis (g_p/L)
 P_T potencia del reactor sin carga (W)
 r_s tasa específica de consumo de sustrato (g_s/g_bh)
 rpm revoluciones por minuto del impulsor en el biorreactor en (m^{-1})
 S concentración de sustrato de la fase acuosa a cualquier tiempo en la celda de Lewis (g_s/L)
 S_f concentración final de saturación de sustrato en la fase acuosa en la celda de Lewis (g_s/L)
 S_o concentración inicial de sustrato en la fase acuosa en la celda de Lewis (g_s/L)
 τ_{rO_2} tiempo característico de la tasa de consumo de oxígeno por el biocatalizador (s)
 τ_{rS} tiempo característico de la tasa de consumo de sustrato por el biocatalizador (s)
 τ_{KLa} tiempo característico de la tasa de transferencia de masa de oxígeno (s)
 τ_{KpA} tiempo característico de la tasa de transferencia de masa de producto (s)
 τ_{KsA} tiempo característico de la tasa de transferencia de masa de sustrato (s)
 τ_m tiempo característico de mezclado en el biorreactor de tres fases (s)
 t_m tiempo de mezclado del biorreactor de partición de tres fases (s)
 tr_{O_2} Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno (s)
 tr_{pH} Tiempo de respuesta del electrodo de pH (s)
 U unidad enzimática (un μmol de formación de producto. min^{-1}) de cetona a lactona
 V volumen de operación del biorreactor (m^3)
 V_s es la velocidad del fluido en cada fase en función de las velocidades de agitación (m/s)
 vvm volumen de alimentación de aire, por volumen de reactor por minuto (min^{-1})
 X es la concentración celular (g_b/L)
 Y_E es la concentración adimensional de lectura del electrodo
 $Y_{s/p}$ Rendimiento estequiométrico en relación sustrato/producto (g_s/g_p)

Símbolos

ρ Densidad la fase estudiada (kg/m^3)
 ϕ Fracción iónica de la fase dispersa en el reactor (adimensional)

τ Tiempo característico de un mecanismo

\mathfrak{R}_{O_2} Tasa de consumo de oxígeno por el biocatalizador (g_{O_2}/Lh)

\mathfrak{R}_s Tasa de consumo de sustrato (g/Lh)

μ es viscosidad de la fase estudiada ($Kg/m.s$)

[MeBuPyrr][BTA] Líquido iónico butilmetilpirrolidinium bis (trifluorometilsulfonyl) imida

Amp unidades de corriente eléctrica (Amperes)

N_{Re} número de Reynolds definido para las fases iónica y acuosa de la Celda de Lewis

N_{We} Número de Weber (adimensional)

ORM 3D Reflectancia óptica de tres dimensiones

SMN Sistema Metereológico Nacional

W unidades de potencia (watts)

RESUMEN

Se realizó un análisis de régimen en un biorreactor de partición de tres fases tipo tanque agitado mediante la determinación de los tiempos característicos de los mecanismos de mezclado, transporte de masa y bioconversión, para determinar la etapa limitante del proceso.

Los estudios de mezclado y transferencia de masa se realizaron en un biorreactor tipo tanque agitado de 1 L a diferentes condiciones de operación: velocidad de agitación (400, 700 y 1000 rpm), aireación (0.5, 0.75 y 1.0 vvm), fracción volumen de líquido iónico (5, 12.5 y 20 % v/v). El tiempo característico de mezclado (τ_m) se estimó utilizando el método de pH reportado por Hadjiev y col. (2006). Los valores de τ_m fueron de 4 a 6 segundos. Los coeficientes de transferencia de sustrato (K_S) y producto (K_P) se estimaron indirectamente utilizando una Celda de Lewis modificada operada a diferentes tasas de agitación. El área de transferencia de masa en el biorreactor (A) se calculó con el diámetro promedio “Sauter” de gota (d_{32}) de la fase dispersa con un equipo de reflectancia óptica (3D ORM). Se integraron los K 's y A para calcular los coeficientes volumétricos de sustrato (K_{SA}) y producto (K_{PA}) en el biorreactor. Los valores obtenidos fueron de 162 a 2,470 h^{-1} y 32 a 499 h^{-1} respectivamente. Los coeficientes volumétricos de transferencia de O_2 (K_{LA}) se estimaron con el método dinámico y el modelo propuesto por Fuchs y col. (1971), los valores de K_{LA} obtenidos fueron de 28 a 275 h^{-1} . La tasa de consumo de oxígeno ($\mathfrak{R}_{\text{O}_2}$) de *Escherichia coli* TOP10 pQR239 se hizo en un mini-biorreactor de 20 mL, a una concentración inicial de sustrato de 0.5 g L^{-1} , se usó el método dinámico y el modelo propuesto por Badino y col., (2000). La $\mathfrak{R}_{\text{O}_2}$ obtenida fue 0.5 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Para estimar la tasa de consumo de sustrato (\mathfrak{R}_s) se hizo una cinética a diferentes concentraciones de sustrato (0.2 a 2 g/L) en función de las velocidades máximas de formación de producto, se usó un modelo modificado propuesto por Aiba y col. (1968) para estimar la \mathfrak{R}_s y otros parámetros cinéticos: constante de afinidad y constante de inhibición por sustrato. El modelo se resolvió por regresión no lineal con el software NCSS 2007. Con estos resultados se calcularon los tiempos característicos (τ 's). La comparación de los τ 's calculados permitió establecer: la reacción es la etapa limitante del sistema, también se observó que lo τ 's de transferencia y consumo de oxígeno predice que el sistema a ciertas condiciones de operación puede presentar ausencia de oxígeno al biocatalizador.

ABSTRACT

A regime analysis in a three phase partitioning bioreactor was carried on through the determination of characteristic times of the mechanisms involved: mixing, mass transfer phenomena (oxygen, substrates and products), and kinetic parameters (oxygen and substrate up take). To study the mixing and mass transfer mechanisms involved in the bioconversion process, experiments were carried on in a one liter bioreactor at different 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). However, kinetic experiments were conducted in a 20 mL bioreactor just using aqueous phase in order to reduce mixing and mass transfer phenomena.

Mixing time was estimated by the pH method reported by Hadjiev y col. (2006). Mixing times values obtained were between 4 and 6 seconds. Volumetric mass transfer coefficients for substrate (K_{SA}) and product (K_{PA}) were estimated by an indirect method: first mass transfer coefficients (K_S and K_P) were estimated using a modified Lewis Cell at different agitation rates of both phases. On the other hand, *Sauter* mean drop diameter (d_{32}) was measured online in the reactor using an Optical Reflectance Measurement (3D ORM) and mass transfer area (A) was calculated considering the volume fraction of the dispersed phase. With these data, volumetric mass transfer coefficients for substrate (K_{SA}) and product (K_{PA}) in the bioreactor were estimated. Estimated values obtained were 162 – 2,470 h⁻¹ for K_{SA} and 31 – 499 h⁻¹ for K_{PA} . Oxygen volumetric mass transfer coefficient (K_{La}) was estimated using the gassing in - gassing out dynamic method and the model proposed by Fuchs *et al.* (1971). Under operational conditions studied in the bioreactor estimated values range between 28 to 275 h⁻¹. Oxygen up-take rate (\mathfrak{R}_{O_2}) of *Escherichia coli* TOP10 pQR239 was estimated taking into account cell maintenance and substrate consumption. Oxygen up-take rate for substrate consumption was determined at an initial substrate concentration of 0.5 g L⁻¹. The experiments were carried out in a 20 mL mini bioreactor. The gassing out dynamic method was used to measure the oxygen up-take rate for cell maintenance and reaction. Kinetic parameters were estimated according to the model proposed for Badino *et al.* (2000). Oxygen up-take rate (\mathfrak{R}_{O_2}) value obtained was 0.5 g L⁻¹ h⁻¹. Substrate consumption during de bioconversion was determined at different substrate concentration (0.2 to 2 g L⁻¹). Data obtained were adjusted to the model proposed by Aiba *et al.* (1968). Substrate up-take rate (\mathfrak{R}_s), inhibition constant (K_i) and affinity constant (K_s) were calculated using non-linear regression with the software NCSS 2007. Comparison of the characteristic times allowed establishing: the bioconversion process studied was limited by substrate consumption, oxygen mass transfer might be the limiting step if a more active biocatalyst is used.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se llevo a cabo un análisis de régimen mediante la determinación de tiempos característicos de mezclado, transferencia de masa y bioconversión en un biorreactor de partición de tres fases. El análisis de régimen permitió establecer la etapa limitante del proceso y promete ser una herramienta para usarla como criterio de escalamiento para este tipo de reactores. Se usó la cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239, que sintetiza la enzima intracelular ciclohexanona monooxigenasa, que convierte una cetona cíclica a su correspondiente lactona, esta reacción presenta inhibición por sustrato y producto, 2 y 4 g L⁻¹, respectivamente. Las lactonas se usan en la industria farmacéutica, de cosméticos y alimentos, como precursores de medicamentos y aromas.

La estructura de este trabajo se dividió en ocho capítulos y 7 secciones: el capítulo 1 aborda la revisión bibliográfica del campo de estudio. El capítulo 2 involucra el planteamiento del problema, partiendo desde una hipótesis, la justificación, hasta los objetivos generales y específicos del trabajo. En el capítulo 3 se explica con un diagrama la estrategia general empleada para cumplir los objetivos planteados. El capítulo 4 menciona los materiales y equipos como son: (espectrofotómetro, cromatógrafo de gases, reactores, celda modificada de Lewis), los reactivos y compuestos empleados (sustratos productos, amortiguadores, medio de cultivo, etc.) y los métodos empleados para estimar los tiempos característicos en el análisis de régimen. En el capítulo 5 se muestran los resultados experimentales y se discuten las posibles causas de éstos con base a trabajos reportados y referencias bibliográficas. En el capítulo 6 se mencionan las conclusiones obtenidas con fundamento en el análisis de resultados y se concluye que el objetivo ha sido cumplido y se acepta como verdadera la hipótesis planteada. El capítulo 7 menciona algunas sugerencias para este trabajo. Finalmente las 7 secciones sirven como ayuda y guía al lector con: índices general, de figuras y tablas, resumen de los resultados obtenidos, una introducción que explica como está estructurado y organizado el trabajo, una sección de nomenclatura y simbología, referencias bibliográficas de trabajos e información reportada sobre el tema y una sección de anexos que explican algunas herramientas y metodologías utilizadas en la parte experimental de este trabajo.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biorreactores de partición

Un biorreactor de partición se forma por la adición de una fase líquida inmiscible en una fase acuosa que contiene un biocatalizador que lleva a cabo una bioconversión. La fase inmiscible transfiere por partición compuestos de una fase a otra. Estos compuestos pueden ser degradados o transformados a un producto de interés por medio de un biocatalizador (célula o enzima). Es decir la fase inmiscible funciona como reservorio de sustrato tóxico, transmitiéndolo a la célula a niveles subinhibitorios, basado en el equilibrio de partición y la demanda metabólica de la célula. Por lo que las propias células determinan la velocidad a la cual el sustrato es liberado a la fase acuosa, así el sistema responde al incremento o disminución de la demanda celular sin intervención externa (Collins y Daugulis, 1997; Yang y Pan, 2005). Este proceso depende en gran parte de las propiedades del solvente de extracción por lo que se han sugerido nuevas ideas para el uso de solventes orgánicos que no sean tóxicos, inhibitorios o letales para la célula es decir una biocompatibilidad entre fase inmiscible y biocatalizador. (Bruce y Daugulis, 1991).

1.1.1 Aplicaciones de los biorreactores de partición

El concepto de biorreactor de partición de dos fases puede ser aplicado a la degradación o bioconversión de sustratos tóxicos contenidos en una fase orgánica. Otra aplicación importante es la remoción de productos inhibitorios con ayuda de la fase inmiscible durante el curso de la bioconversión, provocando un efecto positivo sobre la tasa de reacción celular. (Nielsen 2003).

Se han reportado en la literatura varias aplicaciones de los biorreactores de partición, tales como: biorremediación de aire y aguas, y generación de productos de alto valor agregado (Daugulis 1997). Estos se discuten brevemente a continuación:

a) Biorremediación de aire

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) son contaminantes producidos de forma natural y de fuentes antropogénicas durante la quema de combustibles sólidos y líquidos

derivados de las actividades industriales. Estos contaminantes cuando se presentan en el medio ambiente y al humano, provocan altos grados de mutagénesis y cancerigenocidad debido sus propiedades químicas que los hacen estables molecularmente y reactivos con el medio que los rodea. Rocha-Ríos y col. (2009) reportaron la biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) disueltos por partición en una fase orgánica (aceite de silicón) con una fase acuosa que contenía un consorcio microbiano metanogénico, obtenido del la planta de tratamiento de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (Cd. de México) capaz de degradar estos hidrocarburos. Collins y Daugulis (1997) reportan la aplicación de un biorreactor de partición de tres fases en la degradación del fenol usando *Pseudomonas putida* ATCC 11172. Rehmman y Daugulis (2007) estudiaron la degradación de bifenil usando la cepa *Burkholderia xenovorans* LB400 en un biorreactor de dos fases sólido-líquido, donde la transferencia de sustratos poco solubles y productos tóxicos se llevaron a cabo por equilibrio termodinámico.

b) Biorremediación de aguas

Un problema serio es la concentración de contaminaciones en aguas, las cuales exceden las concentraciones biocompatibles con las estrategias de biodegradación. En un estudio Yeom y Daugulis (2001) encontraron que el benceno en agua contaminada puede ser degradado eficientemente usando como fase dispersa 1-octadeceno al 10 % de operación, alcanzando una degradación de benceno de 1000 a 35 mg L⁻¹ en 24 h empleando microorganismos degradadores de benceno.

c) Productos de alto valor agregado:

Se ha observado en la industria farmacéutica que un compuesto quiral, debe ser tratado como dos moléculas independientes debido a que en procesos bioquímicos y en tratamientos farmacológicos los compuestos quirales tienen actividades bioquímicas totalmente diferentes (Shimazawa y col. 2008). En bioconversiones donde se requiere enantioselectividad para la producción de compuestos de interés a nivel farmacéutico y biotecnológico, se ha observado que muchas de estas reacciones presentan inhibiciones: por

sustratos, productos y algunos otros metabolitos secundarios. Como solución al problema se plantea el uso de los biorreactores de partición para mantener niveles subinhibitorios de estos compuestos (Malinowski, 2001). Algunas de estas moléculas de interés son las lactonas que se usan como: citotóxicos, analgésicos, amebicidas y antimutagénicos. Se conocen más de 500 lactonas que tienen funciones de antibióticos, antitumorales, antihelmínticos, insecticidas, nematocidas, acaricidas y en el tratamiento de la oncocercosis (Reyes-Ávila y col., 1999).

Una aplicación de productos de interés es el que hacen Gomes y col. (2007) donde estudiaron en un biorreactor de tres fases (metil ricinolato-agua-aire), el efecto de la transferencia de oxígeno en la formación de γ -decalactona (compuesto aromático empleado en la industria alimentaria), se usó como sustrato la fase dispersa y como biocatalizador la levadura *Yarrowia lipolytica*. Se determinaron los valores de los coeficientes de transferencia de oxígeno (K_{La}) a diferentes condiciones de operación en un biorreactor de 2 L, y se encontraron que las mayores producciones de γ -decalactona se obtuvieron en los K_{La} más bajos (70 h^{-1}) a una fracción dispersa de 1.08 %.

Otra aplicación es la que reportan Çelik y col. (2004) para la producción de fenilacetaldehído, el cual es un aldehído aromático usado en la industria alimentaria y cosmética como fragancia y es producido por biotransformación con *Gluconobacter oxydans* B-72. La investigación consistió en usar un sistema agua-2 feniltanol. El 2 feniltetanol (PE) es el sustrato de la reacción para la producción de fenilacetaldehído, sin embargo la reacción produce inhibición al llegar a una concentración de 5 g L^{-1} de sustrato, mientras que para un sistema bifásico con alimentación constante se obtuvieron mayores producciones del aroma, a una concentración inicial de sustrato de 2.75 g L^{-1} , 130 rpm la productividad fue de $7.10 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

1.1.2. Características de este tipo de reactores

Las principales ventajas de sistemas de tres o más fases son mantener concentraciones subinhibitorias de sustrato y producto, incrementar las tasas de

transferencia de oxígeno y recuperar *in situ* los productos de interés (Daugulis 1997).
Características que se discuten a continuación:

a) Mantener concentraciones subinhibitorias de sustrato y producto:

El concepto de un reactor de partición multifásico puede ser aplicado en el control de la liberación de sustratos tóxicos disueltos en la fase orgánica hacia la célula contenida en la fase acuosa. La capacidad del solvente o fase dispersa para mantener estos niveles por debajo de la inhibición dependen del coeficiente de partición y las condiciones de operación del biorreactor como son agitación, aireación y fracción iónica. También es esencial estudiar la biocompatibilidad y la no biodegradación de la fase dispersa por el biocatalizador. Por lo tanto, la elección adecuada del solvente de extracción es crucial para un excelente proceso de producción y extracción del compuesto de interés (Collins y Daugulis, 1999). Por otro lado, los coeficientes de transferencia de masa entre las fases acuosa y orgánica son parámetros importantes en un biorreactor de partición. Se requiere conocer y controlar estos mecanismos para mantener *in situ* tanto el suministro de sustratos tóxicos como la extracción del producto de interés (Sajc y Vunjak-Novakovic, 2000).

b) Efecto en la transferencia de O₂

La velocidad de transferencia de oxígeno representa una de las etapas limitantes más importantes en el diseño y operación de los biorreactores tipo tanque agitado, y puede ser descrita por medio de los coeficientes de transferencia de masa (K_{La}), que están en función de la geometría, la operación del reactor, la composición del medio y el tipo y morfología del microorganismo (Amaral y col., 2008).

Por otro lado se ha estudiado que la transferencia de masa se puede mejorar o incrementar, por medio de la adición de vectores de oxígeno (fase dispersa), como pueden ser hidrocarburos o fluorocarbonos, sin incrementar el consumo de energía en el reactor. Por ejemplo el n-dodecano incrementa el K_{La} y el efecto de este incremento está en función de las condiciones y características del biorreactor (Galaction y col., 2004).

Por otro lado Gomes y col. (2007) estudiaron el efecto de la transferencia de masa en un sistema: metil ricinolato-agua-aire con la interacción del surfactante Tween 80. Se observó que al adicionar Tween 80 al sistema trifásico el K_{La} disminuyó, debido a que se abate la tensión superficial, evitando así la coalescencia de burbujas de oxígeno y gotas de la fase dispersa incrementando el área interfacial para la transferencia de oxígeno.

Nielsen y col. (2003) estudiaron el efecto de la transferencia de oxígeno en un sistema n-hexadecano-agua-aire, en un biorreactor de partición de tres fases para la biodegradación de compuestos tóxicos. Encontrando que al aumentar la fracción dispersa el K_{La} disminuye mientras que la tasa de transferencia de masa se incrementa debido al incremento del gradiente de concentración de oxígeno. La fase orgánica tiene una alta solubilidad de oxígeno, provocando que funcione como un vector incrementando la tasa de transferencia de oxígeno. Finalmente el valor óptimo de la tasa de transferencia de oxígeno fue con una fracción de fase dispersa de 27 % mejorando la tasa de transferencia de oxígeno en un 58.5 %.

c) Recuperación *in situ* de productos de interés

En la mayoría de los procesos de producción de metabolitos de interés, las productividades se ven afectadas por problemas originados debido a la acumulación de productos en el biorreactor. La adición de una fase dispersa para la recuperación *in situ* del producto en los reactores de partición, permite la aceleración del proceso, mejorando los valores de productividad y facilitando las operaciones unitarias de separación (Malinowski, 2001).

Daugulis (1997) menciona que existe una gran variedad de métodos para la separación selectiva por partición de productos y/o metabolitos de interés en bioprocesos industriales. En décadas recientes se ha estudiado el concepto de reactores de partición para la recuperación *in situ* de productos, donde se ha observado que la fase de extracción no afecta al biocatalizador (microorganismos, enzimas y células animales). Algunos productos han sido anticuerpos monoclonales, metabolitos secundarios, proteínas, vitaminas, y han sido elaborados con reactores de partición a pequeña escala.

Una aplicación reciente es la que proponen Nielsen y Prather (2008) en la recuperación de n-butanol producido por *Clostridium acetobutylicum* ATCC usando como fase de extracción la resina poliestireno-codivinilbenceno que mostró tener gran eficiencia en la extracción, además de ser económica y de fácil adquisición.

1.2 Líquidos iónicos

Se ha tratado de llamar a los líquidos iónicos como “Solventes Verdes”, aunque aún no está del todo claro si se les puede asignar esta categoría, ya que todavía hay estudios pendientes a nivel toxicológico tanto al biocatalizador, al medio ambiente y al usuario, lo que ha provocado que la síntesis de éstos sea a partir de materiales renovables. Sin embargo, el gran aumento en el interés de los LI’s (MacFarlane y Seddon, 2007) se deriva de sus propiedades químicas y físicas, compuestos por un anión y un catión, los LI’s no presentan cristalización, ni solidificación, tienen bajos puntos de ebullición y bajas presiones de vapor en un amplio rango de temperatura y no son inflamables. Estas propiedades permiten que sean usados como solventes en diferentes tipos de reacciones y su uso con productos que pueden ser extraídos *in situ*. Otra ventaja es la gran diversidad de su naturaleza química que puede ser bien definida por los cationes y aniones en función de sus diferentes polaridades, provocando una amplia gama de disolución de sustratos.

Existen más de 1000 líquidos iónicos diferentes en el mercado, producidos por Exxon, Chevron Celanese, AkzoNobe, Sigma Aldrich entre otros, con más de 1000 combinaciones posibles para el anión y el grupo R formado por el catión, por lo tanto es posible ajustar las propiedades de los LI’s, a una aplicación muy específica. Otra denominación que se le ha dado a los líquidos iónicos es la de “solventes sobre diseño” (MacFarlane y Seddon, 2007).

Algunos criterios para la selección adecuada de un solvente en un proceso de extracción (Treybal y col., 1963); aplicándolos a los líquidos iónicos son:

1. Selectividad: en función de las propiedades para la extracción.
2. Coeficientes de partición: la solubilidad de sustratos en la fase dispersa.

3. Toxicidad: biocompatibilidad del solvente con el biocatalizador y el medio ambiente.
4. Corrosión: no reaccione con el equipo y accesorios.
5. Costos y disponibilidad: bajos costos y fácil de adquirir.
6. Estabilidad térmica: no cambie sus propiedades en un amplio rango de temperatura.
7. Viscosidad: los LI's tienen viscosidades de orden mayor, influenciando los fenómenos de transferencia de masa.
8. Tensión interfacial: influencia en la transferencia de masa de O₂ en el sistema bifásico.
9. Miscibilidad: no presente solubilidad en la fase continua.
10. Recuperación del solvente: fácil separación entre fases.
11. Flamabilidad: no sea volátil o peligroso para el operador.
12. Propiedad intelectual: disponibilidad de diferentes fabricantes.

La biocatálisis con enzimas, en la práctica se ve limitada por su fragilidad y costos. Por estas razones, en la estabilización y recuperación se han empleado estrategias como la inmovilización, modificación química, uso de osmolitos, agentes aglomerantes macromoleculares, medios no acuosos y en esta categoría el uso de solventes, más específicamente los líquidos iónicos como solventes puros, como co-solventes, o en fases dispersas.

La primera combinación de enzimas con los líquidos iónicos fue desarrollada por Magnuson y col. (1984), con la investigación de la actividad y estabilidad enzimática de una fosfatasa en un sistema acuoso mixto con [NH₃][NO₃]. A principios de esta década, se presentaron varios reportes de biotransformaciones en líquidos iónicos: Erbeldinger y col. (2000) reportaron la primera biotransformación con la síntesis de Z-aspartame en presencia de la proteasa termolisina en [BMIM][PF₆] (con volúmenes de 5 % de agua). Cull y col. (2000) describieron la primera biotransformación empleando células en líquidos iónicos. Madeira (2002) realizó la primera biotransformación con una enzima pura en un sistema agua-LI. También Kragl y col. (2004) patentaron la primera reacción enzimática en líquidos iónicos. Baker y col. (2004) usando un residuo de triptófano en la proteína monelina encontraron que ésta presentó una gran estabilidad termodinámica en el líquido iónico [C4mpy][Tf₂N] a 105 °C comparado con agua destilada a 40 °C. Desde entonces el uso

de los líquidos iónicos como co-solventes en biotransformaciones en combinación con enzimas, sustratos y procesos han llegado a tener un impacto importante en la investigación y como ejemplos recientes se puede mencionar el uso de lipasas, proteasas, glicosidasas, epóxido hidrolasas, óxido-reductasas, liasas, peroxidasas, y células (Domínguez de María, 2008).

Pfruender y col. (2004) estudiaron diferentes líquidos iónicos y encontraron que el líquido iónico BMIM[Tf₂N] presenta una excelente compatibilidad como solvente en la producción de alcohol bencílico a partir de cloroacetofenona usando como biocatalizador *Lactobacillus kefir*, sin provocarle daño en la membrana.

1.3 Reacciones tipo Baeyer-Villiger

La conversión de cetonas, ésteres o ciclo cetonas a lactonas fue descubierta hace más de un siglo por Adolf von Baeyer y Victor Villiger en 1899 (Westgren, 1972). En esta reacción, la cetona es atacada nucleofílicamente por el peróxido de hidrógeno, también llamado a este paso “intermediario de Criegee” (Figura 1.3). Esta reacción es inestable, por lo que se re-arregla con la expulsión y la migración de un ión carboxilato provocando una unión carbono-carbono. Estas características hacen que las reacciones tipo Baeyer-Villiger sean atractivas para la síntesis de lactonas a partir de ésteres.

Desafortunadamente el uso general de los peróxidos como agentes reactivos y solventes tiene diversas desventajas y no pueden ser considerados como “química verde”. Primero, porque son de carácter explosivo e irritante, a grandes escalas incrementa el riesgo de un accidente. Segundo, el uso de reactivos halogenados no es amigable con el ambiente. Finalmente, los peróxidos son agentes oxidativos por lo tanto se requiere laboratorios con normas de seguridad altas para las síntesis de productos con este tipo de reactivos.

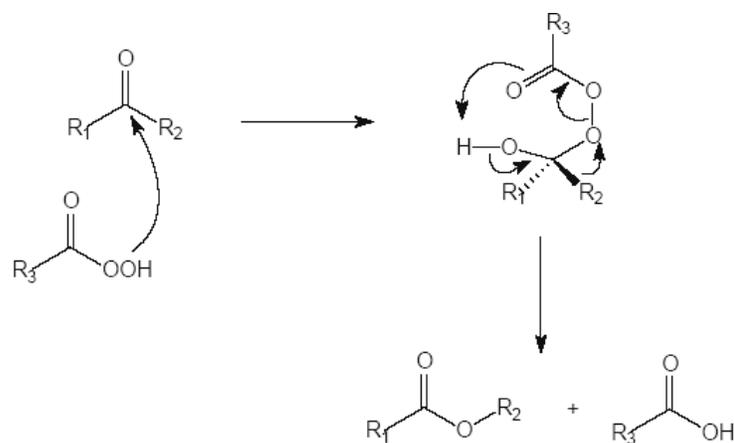


Figura 1.1. Reacción de un ataque nucleofílico a una cetona con un ácido dando como producto la formación de una lactona (Kamerbeek y col., 2003)

En los últimos 50 años se descubrió que este tipo de reacciones se pueden llevar a cabo por sistemas biológicos, la primera reacción fue descubierta en la biotransformación de esteroides fúngicos por Turfitt (1948). Desde entonces las reacciones del tipo Baeyer-Villiger se han descrito en muchas rutas metabólicas (p. ej. síntesis de iridoides y esteroides) en diferentes organismos como en: peces (producen anti toxinas) y bacterias (Wright y col., 1996).

De las enzimas que realizan este tipo de reacción (Baeyer-Villiger) las más estudiadas son las del tipo ciclohexanonas-monooxigenasas (CHMOs). Estas enzimas tienen la característica de que usan NADPH dependiente de flavo proteínas que incorporan un átomo de oxígeno molecular al sustrato y el otro átomo es reducido en forma de agua. Las Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs) pueden clasificarse en dos grupos: Tipo I que contienen como cofactor el dinucleótido adenin flavina y usan como fuente de electrones (NADPH), mientras que las del tipo II requieren como cofactor el mononucleótido flavin (FMN) y usan como donador de electrones el NADH. En los últimos años genes de una gran cantidad de ciclohexanonas monooxigenasas (CHMO; EC 1.14.13.22), han sido clonados y sobre expresados, en varios microorganismos (Willett, 1997). Algunas de estas enzimas recombinantes del tipo BVMOs son:

- a) Ciclohexanona monooxigenasa (CHMO)
- b) Ciclopentanona monooxigenasa (CPMO)
- c) Ciclododecanona monooxigenasa (CDMO)
- d) Esteroide monooxigenasa (SMO)
- e) 4-Hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO)

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio la enzima ciclohexanona monooxigenasa (CHMO). Esta enzima ha sido la más estudiada y caracterizada y pertenece originalmente a *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, su peso molecular es de 59 KDa, es del tipo oxidorreductasa y requiere FAD o NADPH para la reacción. La aplicación más comercial de esta enzima es para catalizar por oxidación un amplio rango de cetonas, siendo éste un uso potencial de catálisis industrial. Sin embargo, la producción y aplicación de BVMO en *A. calcoaceticus* están restringidas por diferentes problemas. Primero, la cepa silvestre es patógena, por lo que es poco atractiva para bioconversiones de gran escala. Segundo, para el crecimiento de *A. calcoaceticus* NCIMB 9871 se requiere una fuente de carbono tóxica (ciclohexanol) y tiene baja actividad (20 a 25 U por gramos de biomasa seca). Por estas razones el uso de la CHMO vía *A. calcoaceticus* no es una alternativa viable para la producción a gran escala.

Se sugiere el uso de un microorganismo recombinante que sea de fácil producción y no patógeno. La tecnología del ADN recombinante ha sido aplicada exitosamente en diferentes sistemas con problemas similares a éste. El gen que codifica para la síntesis de CHMO en *A. calcoaceticus* NCIMB 9871 ha sido insertado en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* por medio del vector pYES2 y expresado por el promotor de la galactosa. Doig y col. (2001) insertaron la enzima CHMO en *Escherichia coli* con el plasmido pET 22b en una cepa de *Escherichia coli* BL21 dando origen a la cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239. En este sistema la CHMO constituyó arriba del 20 % de la proteína celular lo que representa un incremento significativo de 20 veces más que el clon en *S. cerevisiae*. Sin embargo, se ha puesto poca atención en la caracterización de los procesos a gran escala de estas cepas modificadas. Entre las características cinéticas de *E. coli* TOP10 pQR239 se puede mencionar que es altamente reactante y tiene inhibición por

producto. Su actividad específica óptima es de $55 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, en concentraciones de cetona de 0.2 y 0.4 g/L y en concentraciones de 5 g/L la actividad se reduce a cero (Doig y col., 2001). En la Figura 1.2 se propone un mecanismo de bioconversión de cetona a lactona por medio de la enzima ciclohexanona monooxigenasa.

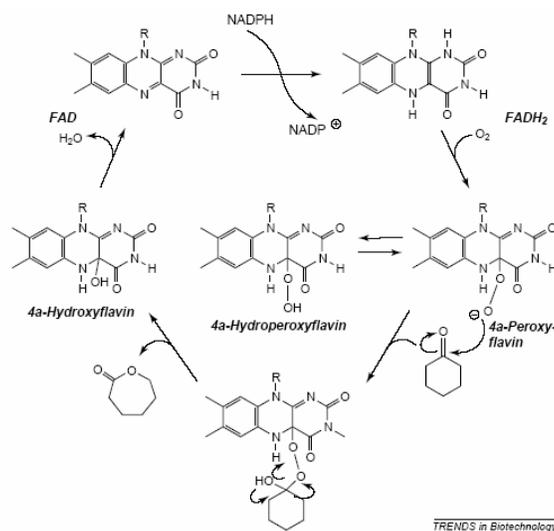


Figura 1.2. Mecanismo de reacción para CHMO por oxido-reducción (Alphand y col., 2003)

Como resumen, en los últimos años se han identificado y coleccionado una gran variedad de secuencias genómicas para las BVMO's. Así como el descubrimiento o aparición de nuevos sustratos, esto combinando con el rápido desarrollo de tecnologías en el *screening*, construcción de organismos recombinantes y el desarrollo de la tecnología de bioconversiones, provocarán que las reacciones tipo Baeyer-Villiger puedan ser mejoradas en un futuro no muy lejano.

1.3.1. Usos y aplicaciones de los productos de las reacciones tipo Baeyer-Villiger

El biocatalizador empleado en esta tesis es la cepa *Escherichia coli* TOP10 [pQR239] que expresa la enzima ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) y lleva a cabo reacciones de estereo-selectividad del tipo Baeyer-Villiger. Doig y col. (2001) estudiaron su actividad enzimática a pequeña escala usando un mini-reactor de 20 mL. Donde obtuvieron bajas tasas específicas de formación de producto con células completas ($55\text{--}60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso seco) mientras que en células sonicadas los valores fueron de ($500 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso seco). El valor óptimo de concentración de cetona fue de 0.2 a 0.4 g L⁻¹

y para producto las concentraciones obtenidas fueron de 4.5–5 g L⁻¹. Partiendo de estos estudios los autores proponen usar un método que suministre el sustrato y remueva el producto y considerarlo a gran escala para la producción de lactonas.

Hilker y col. (2006) realizaron el escalamiento ascendente de una reacción del tipo Baeyer-Villiger con este mismo biocatalizador *E. coli* TOP10 pQR239 a partir del sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona usando un reactor de 50 L. El proceso fue optimizado previamente con un escalamiento descendente. La alta productividad se obtuvo empleando una resina que suministra el sustrato, el glicerol y a la vez la extracción del producto y la alimentación de oxígeno se hizo con un difusor de acero. La mezcla de productos (las lactonas [(–)-(1S,5R)-2 y (–)-(1R,5S)-3] fue obtenida en un 98% de rendimiento. Este trabajo es el primero en reportar una reacción del tipo Baeyer-Villiger a gran escala y promete una aplicación para procesos a niveles industriales.

1.4. Mecanismos de mezclado, transporte de masa y parámetros cinéticos de bioconversión en un biorreactor de partición de tres fases

1.4.1. Tiempo de mezclado en biorreactores trifásicos

El proceso de mezclado puede verse afectado dependiendo del número de fases involucradas en el sistema: una sola fase líquida, líquido-líquido, gas-líquido, sólido-líquido y sistemas trifásicos (Nienow y col., 1997). Una forma de cuantificar el mezclado es adicionar un pulso trazador en el reactor y monitorear la transición hasta llegar al estado estacionario (homogeneidad). El tiempo de mezclado es definido como el tiempo necesario para obtener un valor de homogeneidad que se aproxime al valor umbral máximo de la variable de respuesta (pH, conductimetría, etc.) este valor es en principio arbitrario. Comúnmente se emplea el 0.95 a 0.99. En general los tiempos de mezclado a pequeña escala (1-2 L) se encuentran en el orden de segundos, sin embargo en procesos a gran escala el tiempo para llegar a la homogeneidad pueden estar en el orden de minutos.

En la Tabla 1.4 se muestran los métodos más usados para la determinación de tiempos de mezclado en reactores tipo tanque agitado:

Tabla 1.4. Métodos para estimar tiempos de mezclado

Método	Trazador
Conductividad	Electrolitos (KCl, NaCl)
pH	Ácidos y bases (NaOH-HCl)
Coloración	Colorantes
Pulso de calor	Termopares
Isótopos	Trazador de isótopos radioactivos

El diseño adecuado de un biorreactor puede resultar suficiente para obtener grados de mezclado y turbulencia en la dispersión de un sistema trifásico líquido-líquido-gas incrementando de área interfacial de transferencia de masa en las tres fases (Nienow y col., 1997).

Garikipati y col. (2009) realizaron estudios que involucran el tiempo de mezclado en un proceso de extracción de 1-naftol en lauril de acetato y dioctilalato, los autores observaron que un factor relevante es la viscosidad que tiene el dioctilalato lo cual requirió mayores tiempos de mezclado para alcanzar el equilibrio.

1.4.2. Transferencia de sustratos y productos en reactores de partición de tres fases

La tasa de transferencia de masa en los biorreactores de partición de una fase orgánica a una fase acuosa es dependiente del área interfacial. En biorreactores agitados mecánicamente está en función de la potencia de agitación, por lo que es un mecanismo importante a estudiar y considerar en los procesos de producción y extracción (Collins and Daugulis, 1997). La operación adecuada de un biorreactor de partición será un papel importante para el control de la transferencia de sustratos y productos entre las fases con el fin de evitar una concentración elevada de metabolitos tóxicos para el biocatalizador (Sajc y Vunjak-Novakovic, 2000).

Por otro lado, se debe considerar que en la extracción de productos de interés en procesos biológicos, la tasa de transferencia de masa está fuertemente influenciada por la

presencia de células, residuos celulares, proteínas, lípidos y compuestos activos, provocando mecanismos que bloquean el área interfacial disponible para la transferencia de masa, incrementando una rigidez interfacial en la absorción de los componentes de sustratos y productos. Eldridge y col. (1989) atribuyen la disminución de la transferencia de masa a la reducción de la circulación interna en las gotas debido al efecto de los agentes sobre la superficie contenidas en el medio. Por otro lado Srivastava y col. (2000) han reportado que el uso de líquidos coloidales incrementa la transferencia de masa en procesos de bio-extracción, por lo tanto es de suma importancia tener bien definidos y controlados los coeficientes de transferencia de masa para obtener la mayor producción sin inhibiciones de ningún tipo.

Lee y col. (2005) estudiaron la solubilidad de fenantreno, antraceno y pireno en dos diferentes sistemas bifásicos agua-aceite de parafina y agua-silicón, así como la transferencia de masa de los hidrocarburos en dichos sistemas. Los autores encontraron que el orden de solubilidad para los tres diferentes tipos de hidrocarburos fue: fenantreno, pireno y antraceno. Entre los sistemas bifásicos probados, el aceite de parafina no afectó la transferencia de masa en los tres hidrocarburos, mientras que el aceite de silicón redujo la transferencia de masa del antraceno significativamente, debido a que el aceite de silicón no solubiliza el antraceno como lo hace el aceite de parafina. Cuando se incrementó la concentración inicial de hidrocarburos hasta 2500 mg se observó que la transferencia de masa para fenantreno y pireno fue de un 90 % en el sistema bifásico, mientras que la del antraceno fue de 40 %. Con estos resultados se presume que la transferencia de masa en sistemas bifásicos está gobernada principalmente por la capacidad de solubilizar los productos o sustratos de interés.

En esta tesis se propone la adición de una fase iónica que libere sustratos y recupere productos manteniendo un ambiente favorable en el reactor para el biocatalizador. Por lo tanto es necesario estudiar los fenómenos de transferencia de sustrato y producto en este sistema multifásico.

1.4.3. Transferencia de oxígeno en reactores de partición de tres fases

En general, el suministro de oxígeno en los biorreactores es importante en el cultivo de microorganismos aerobios y la biosíntesis oxidativa del producto de interés. Para satisfacer la demanda de consumo de oxígeno, la eficiencia de aireación en un biorreactor depende de la solubilidad de oxígeno en el sistema y la transferencia y consumo de oxígeno están en función de las condiciones de operación y la geometría del reactor, composición del medio, concentración y propiedades del biocatalizador (morfología del microorganismo, tamaño de partícula, permeabilidad, carga, porosidad).

Una de las condiciones esenciales para mejorar la tasa de transferencia de masa es reducir el tiempo de difusión de oxígeno hacia el biocatalizador. Generalmente se logra por medio de un mezclado homogéneo sin provocar un estrés mecánico al biocatalizador. Como alternativa se pueden usar vectores de oxígeno, que pueden ser definidos como compuestos que al adicionarlos a un medio pueden incrementar la tasa de transferencia de masa al microorganismo, debido a una mayor capacidad que el agua de solubilizar el oxígeno. Algunos ejemplos de vectores empleados en biotecnología: perfluorocarbonos, aceites y antiespumantes, éstos tienen la capacidad solubilizar el oxígeno de 15 a 20 veces más que la fase acuosa (Amaral y col., 2008).

Existen una gran cantidad de mecanismos descritos en la literatura para representar la transferencia de oxígeno en sistemas multifásicos; sin embargo, el más usado es aquel que asume que la difusión del oxígeno al biorreactor ocurre a través de un vector y posteriormente hacia la fase acuosa (Galaction, 2004). (Ver Figura 1.4)

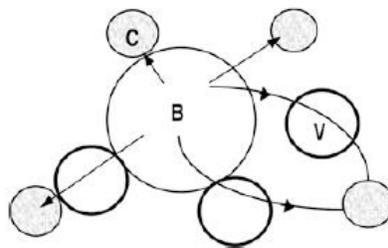


Figura 1.3. Posibles mecanismos de transferencia de oxígeno en presencia de vectores (B: burbuja de aire, C: célula, V: gota de la fase dispersa) (Galaction, 2004).

1.4.4. Tasas de consumo de sustrato y oxígeno en un biorreactor de partición de tres fases

En la bioconversión de la biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, usando células de *E. coli* TOP10 (pQR239), se han identificado un número de limitaciones como son: inhibición por sustrato y producto, gran sensibilidad al pH, ausencia de O₂ y a la temperatura (Doig y col., 2002). Como ejemplo se ha estudiado que la estabilidad de esta enzima en células que no están en crecimiento, puede ser prolongada cuando se hace la conversión a bajas temperaturas (Walton y Stewart, 2004). Otra limitación importante en este tipo de enzimas es el oxígeno, debido a que lo requieren para: la conversión enzimática y la regeneración del cofactor (Li y col., 2002). Como las BVMOs son dependientes del NAD(P)H, es una tarea más que hay que realizar, para mantener esta molécula activa en el reactor. La regeneración de este cofactor a gran escala ha sido un problema, ya que los costos de regeneración son demasiado altos (Zambianchi y col., 2002).

1.5. Análisis de régimen en un biorreactor de partición de tres fases

El análisis de régimen se basa en estimar el mecanismo de la tasa limitante en un proceso, el cual puede ser usado como criterio de escalamiento. Este análisis puede llevarse a cabo mediante la comparación de los tiempos característicos de los diferentes mecanismos involucrados en un proceso químico y/o biológico. El análisis de régimen con pruebas y experimentos a pequeña escala es muy utilizado especialmente para resolver problemas de escalamiento (Sweere y col., 1987).

1.5.1 El tiempo característico de un proceso

Un mecanismo que ocurre en un proceso puede ser representado como un sistema lineal de primer orden con una variable de entrada, “ $x(t)$ ”, y una variable de salida, “ $y(t)$ ”, y puede modelarse matemáticamente con una ecuación en función de los parámetros dinámicos del mecanismo estudiado, ecuación (1.5.1):

$$\tau \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = kx(t) \quad (1.5.1)$$

Donde:

τ el tiempo característico del mecanismo

k es la ganancia o pérdida en estado estacionario del sistema.

$y(t)$ es la variable de respuesta o salida

$x(t)$ es la variable de entrada

Los dos primeros parámetros se calculan con ecuaciones en función de las características físicas del sistema.

La ecuación (1.5.1) se escribe, usualmente con respecto a su estado dinámico:

Donde:

$$Y(t) = y(t) - y(0)$$

$$X(t) = x(t) - x(0)$$

Sustituyendo en la ecuación (1.5.1)

$$\tau \frac{dY(t)}{dt} + Y(t) = kX(t) \quad (1.5.2)$$

Al considerar que en la ecuación (1.5.2), la variable de entrada cambia con respecto al tiempo con un paso constante, se tiene: $X(t) = \Delta x$ entonces:

$$\tau \frac{dY(t)}{dt} + Y(t) = k\Delta x(t) \quad (1.5.3)$$

Resolviendo la ecuación diferencial (1.5.3) para la condición inicial $Y(t) = 0$ se tiene:

$$Y(t) = k\Delta x \left[1 - \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right] \right] \quad (1.5.4)$$

Tiempo característico, τ : Esta constante expresa el tiempo definido por la relación entre la **capacidad** que tiene el sistema de transportar a una entidad (masa, energía, cantidad de movimiento) con respecto a la **rapidez de cambio o capacitancia** de dicha entidad en la respuesta del sistema, es decir que:

$$\tau = \frac{\text{Capacidad}}{\text{Capacitan cia}}$$

Constante de ganancia o pérdida, k : Expresa el cambio último en la variable de salida o respuesta del mecanismo para un determinado cambio de paso en la variable de entrada

Si la ecuación (1.5.4) se evalúa para un tiempo igual al tiempo característico del mecanismo, se deduce un significado muy importante señalado sobre la Figura 1.5 y que es el tiempo, en el periodo no estacionario del mecanismo, en que la variable de respuesta ha alcanzado el 63.2 % de su respuesta final ecuación (1.5.5):

$$Y(\tau) = 0.632 X(t) \quad (1.5.5)$$

Ahora bien en su último estado el mecanismo se ha estabilizado porque su respuesta se mantiene constante, es decir, la derivada de su variable de salida se hace igual a cero. Al considerar esto en la ecuación (1.5.2) se reduce a la ecuación (1.5.6).

$$Y(t_{final}) = k\Delta x \quad (1.5.6)$$

Si se evalúa la ecuación (1.5.4) para un tiempo igual a cinco veces el tiempo característico, se obtiene una respuesta, aproximadamente, igual al 99.2% de la respuesta última, lo que para muchas situaciones es considerado como el tiempo transcurrido para alcanzar la estabilidad del mecanismo (Zill, 1997).

La elección de este valor es arbitrario y para mecanismos estudiados en procesos químicos o biotecnológicos se usa de 95 a 98 % para asegurar un tiempo en el que el biorreactor se encuentre homogenizado casi en su totalidad (Beronvič y Nienow, 2006). Por otro lado el tiempo característico se puede definir, como el recíproco de la constante de ganancia o de pérdida (Bennett y col., 1999).

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (1.5.7)$$

A partir de estos conceptos matemáticos se puede usar un ejemplo muy ilustrativo como es el de la determinación de tiempos característicos propuestos por Oosterhuis (1984) para la producción de ácido glucónico (Tabla 1.5).

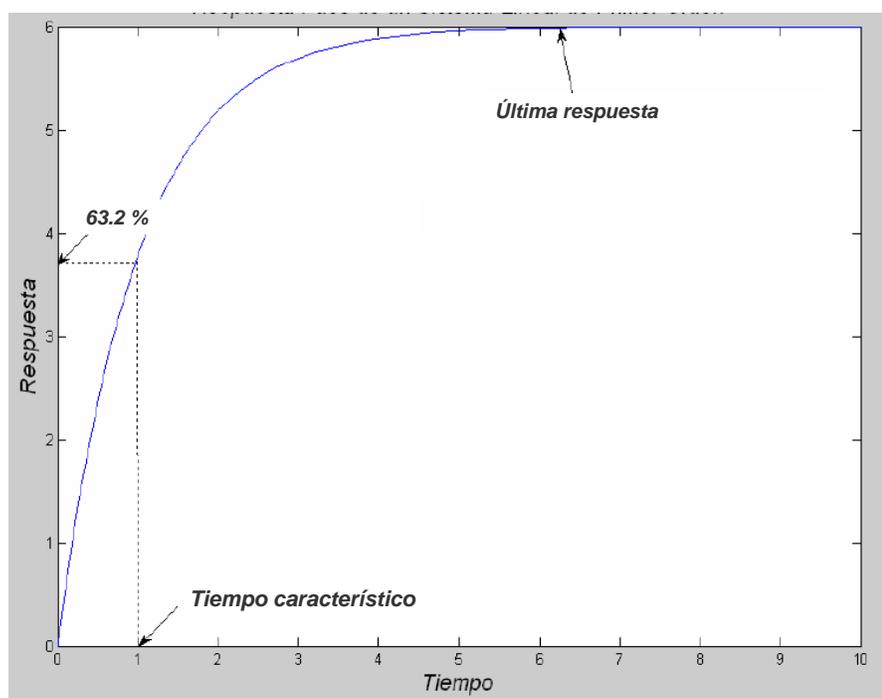


Figura 1.4. Respuesta de un mecanismo de primer orden

Tabla 1.5. Tiempos característicos para la producción de ácido glucónico en un fermentador de 25 m³

Fenómenos de transporte	
Transferencia de oxígeno	5.5 (no-coalescente) – 11.2 (coalescente) (s)
Tiempo de circulación	12.3 (s)
Residencia del gas	20.6 (s)
Transferencia de calor	330-650 (s)
Parámetros de bioconversión	
Consumo de oxígeno	16 (s)
Consumo de sustrato	5.5×10^4 (s)
Crecimiento	1.2×10^4 (s)
Producción de calor	350 (s)

Donde se observa que el tiempo para la transferencia de oxígeno se encuentra en el mismo orden de magnitud que el tiempo característico para consumo de oxígeno, así como

este último es comparable con el tiempo de circulación del líquido, el autor concluye que con estos tres mecanismos se puede presentar ausencia de oxígeno al biocatalizador así como gradientes de oxígeno debido al tiempo de circulación en el reactor.

El análisis de régimen es una herramienta útil y permite identificar la tasa limitante del proceso. Se requieren cuatro etapas para su uso en el escalamiento descendente

1. Análisis de régimen del proceso a gran escala
2. Simulación del mecanismo de la tasa limitante a escala laboratorio
3. Optimización y modelamiento del proceso a escala laboratorio
4. Optimización del proceso a escala de producción por traslación de las condiciones de laboratorio (Baganz, 2007).

El análisis de régimen clasifica el proceso en dos tipos:

Régimen puro, si el proceso es controlado por solo un mecanismo.

Régimen mixto, si el proceso es controlado por más de un mecanismo.

El análisis de régimen está basado generalmente en tiempos característicos y debe permitir cambios de escala. Para llevar a cabo el análisis de régimen también es necesario considerar que la etapa limitante puede cambiar durante el proceso.

Del resultado del análisis de régimen puede concluirse:

1. Los mecanismos requieren investigación a pequeña escala.
2. El criterio más importante para el experimento de laboratorio es que represente las condiciones en la escala de producción.
3. La tercera etapa en el proceso es la optimización a escala laboratorio.
4. La cuarta etapa es trasladar nuevamente los resultados a la escala de producción.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. HIPÓTESIS

El análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases tipo tanque agitado por medio de los tiempos característicos de los mecanismos de mezclado, transferencia de masa y parámetros cinéticos de bioconversión permitirá establecer la etapa limitante del proceso.

2.2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la adición de una fase iónica que libere sustratos y recupere productos manteniendo un ambiente favorable para el biocatalizador en el biorreactor, es necesario estudiar los fenómenos de mezclado, transferencia de masa y biorreacción en este sistema multifásico.

El trabajo pretende con un análisis de régimen estudiar e identificar cual es el mecanismo limitante del proceso, que a su vez podrá ser usado como un criterio de diseño y operación en este tipo de biorreactores. A la fecha no se han reportado estudios de análisis de régimen en biorreactores de partición de tres fases utilizando líquidos iónicos.

2.3. OBJETIVO

2.3.1. Objetivo general

Realizar un análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases, mediante la determinación de tiempos característicos de los mecanismos: de mezclado, transferencia de masa y bioconversión para identificar la etapa limitante del proceso.

2.3.2. Objetivos específicos

Determinar los tiempos característicos de:

Mecanismo de mezclado en el biorreactor:

- a) Tiempo de mezclado

Fenómenos de transferencia de masa en el biorreactor:

- b) Coeficientes de transferencia de Sustrato (fase iónica – fase acuosa)
- c) Coeficientes de transferencia de Producto (fase acuosa - fase iónica)
- d) Coeficiente de transferencia de O_2 (fase gaseosa - fase acuosa)

Tasas de reacción del biocatalizador:

- e) Tasas de específicas de consumo de Sustrato por el biocatalizador
- f) Tasas de específicas de consumo de O_2 por el biocatalizador

Definir el mecanismo o etapa limitante a partir de la comparación de los tiempos característicos del proceso de bioconversión en el sistema trifásico.

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia general del análisis de régimen (Figura 3.1) consistió en estudiar con experimentos independientes seis mecanismos involucrados en el biorreactor de partición entre los cuáles se pudiera encontrar la etapa limitante del proceso. La determinación de sus tiempos característicos e identificación de la etapa limitante del sistema podrán ser empleados como herramientas para definir criterios de escalamiento para esta clase de biorreactores.

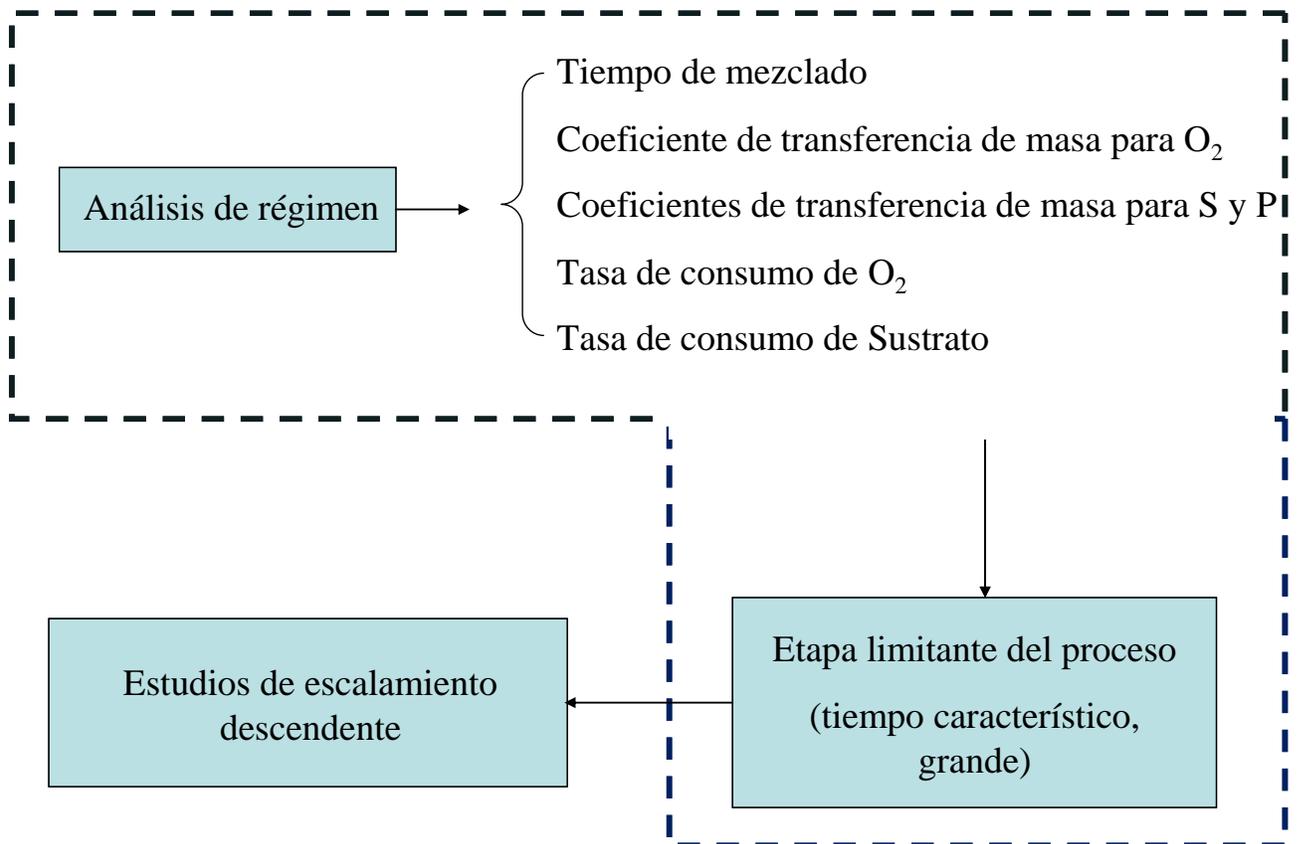


Figura 3.1. Diagrama general de la estrategia propuesta para llegar a un criterio de escalamiento descendente en un biorreactor de partición de tres fases. La zona punteada indica el trabajo realizado en esta tesis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2 Reactivos

Fase dispersa: Butilmetilpirrolidinium bis(trifluorometilsulfonil)imida [MeBuPyr][BTA] (Solvent Innovation GMBH, Alemania), **Fase continua:** Buffer de fosfatos a pH 7 y glicerol, **Sustrato:** *biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona* (Fluka, Suiza), **Producto:** (-)1(R),5(S)3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-ona (Fluka, Suiza), Buffer de pH: *J.T Baker* para pH 7 (fosfato) y (biftalato) para pH 4.

4.3 Microorganismo

La cepa utilizada como biocatalizador para llevar a cabo la reacción tipo Baeyer-Villiger fue *Escherichia coli* TOP10 pQR239 (Doig y col., 2001), la cual se obtuvo de la colección de la University College London (UCL).

4.3.1 Conservación

La cepa *E. coli* se propagó en un medio mínimo que contenía en g/L: 2.5 de glucosa, 0.92 de NH₄Cl, 0.1 de Na₂SO₄, 0.1 de MgSO₄, 0.03 de CaCl₂ en buffer de fosfatos 50 mM a pH 7; se esterilizó 115 °C por 15 minutos, posteriormente se le adicionó 1 g/L de ampicilina (para la selectividad de la cepa) previamente esterilizada por filtración con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm. Se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo y se incubaron a 37°C, a 250 rpm por 24 h. Una vez alcanzada una concentración celular de aproximadamente 1 g/L, se les adicionó glicerol estéril hasta alcanzar 50% v/v. Se depositaron alícuotas de 1 mL en crioviales y se almacenaron en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

Como método alternativo para la conservación de las células se usó la liofilización. Empleando una concentración de 1 g/L, se resuspendieron las células en una solución de leche descremada al 10% p/v previamente esterilizada. Se tomaron 3 mL de esta suspensión y se agregaron a ampollitas estériles las cuales fueron congeladas con una mezcla de hielo seco-acetona, para posteriormente liofilizarlas en el quipo (Labconco model 7522800,

Lyph-Lock6) a -50 °C. Una vez terminado este proceso, las ampollitas se conservaron a temperatura ambiente y fueron utilizadas para inocular aproximadamente un matraz con 100 mL de medio de cultivo.

4.3.2 Medio de cultivo

La producción de *E. coli* TOP10 pQR239 fue llevada a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Doig y col. (2001), usando un medio complejo (MC) con la composición: buffer de fosfatos de sodio 50 mM a pH 7, y concentraciones de 10 g/L de cloruro de sodio, triptona de peptona, extracto de levadura, y 0.1 g/L de ampicilina para la selectividad de la cepa.

4.3.3 Inóculo para la producción del biocatalizador

Para la producción del inóculo se utilizó el contenido de una ampollita liofilizada de *E. coli*, con el cual se inoculó un matraz bafleado de 250 mL con 70 mL de medio de cultivo MC y se incubó en agitación a 200 rpm durante 14 horas a 37 °C.

4.3.4 Producción

4.3.4.1 Producción de biocatalizador en matraces de 250 mL para experimentos de biotransformación

Utilizando 0.7 mL por matraz del inóculo previamente propagado, se inocularon cinco matraces de 250 mL que contenían 70 mL de medio MC y se incubaron en agitación a 200 rpm a 37° C durante 8 horas. Posteriormente, en la fase exponencial al alcanzar una $DO_{650\text{ nm}}=0.3$ se adicionó arabinosa (2 g/L) como inductor de la actividad enzimática. Durante la expresión de la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) se disminuyó la agitación a 150 rpm para mantener el nivel de O₂ disuelto entre 40 a 15 %. Una vez expresada la enzima las células fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en buffer de fosfatos 50 mM para su uso y/o almacenamiento a 4 °C por un máximo de 3 días.

4.3.4.2 Producción de biocatalizador en el reactor de 3 L para estudios de hidrodinámica

En los experimentos para caracterizar la hidrodinámica del reactor, medición del diámetro promedio de gota (d_{32}) de la fase dispersa y el coeficiente de transferencia (K_La) de O_2 . Para estas mediciones, se requirió gran cantidad de biomasa, por lo que la producción del biocatalizador se llevó a cabo en un biorreactor Aplikon de 3 L con un biocontrolador ADI 1010 Bio controller, operado al 70% de su capacidad (2.1 L), usando un medio mínimo (en g/L) con: 25 de glucosa, 9.2 de NH_4Cl , 1 de Na_2SO_4 , 1 de $MgSO_4$, 0.3 de $CaCl_2$ en buffer de fosfatos 50 mM pH 7, suplementado con 1.0 de ampicilina.

El inóculo para el reactor de 3 L se propagó iniciando con una ampolla de la cepa liofilizada con la cual se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo y se incubó a 30°C por 24 h. Posteriormente, se empleó este matraz para inocular otros tres con 100 mL de medio de cultivo y se incubaron a 37 °C durante 12 h. Finalmente el biorreactor de 3 L se inoculó con estos tres matraces que alcanzaban un volumen total de 400 mL, aproximadamente el 20 % del volumen de trabajo y el resto se completó con medio mínimo. El biorreactor fue aireado a 1 vvm con aire filtrado y agitado a 700 rpm a 37°C, se controló el pH del medio a 7 mediante la adición de una solución de KOH 3M.

La biomasa se siguió mediante el método de densidad óptica ($DO_{650\text{ nm}}$) con un espectrofotómetro Shimadzu 1800 U-V. Cuando se alcanzó una concentración celular de 3 g_b/L se hizo la inducción de la enzima con L-Arabinosa y se cosecharon las células cuatro horas después cuando se alcanzaron 6 g_b/L (Doig y col., 2002).

4.3.5 Lavado

Una vez terminada la producción de células se cosecharon y centrifugaron a 10,000 rpm (entrífuga Beckman Coulter modelo Allegra 25R) durante 15 min a 4 °C, lavadas y resuspendidas con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7. Las células fueron almacenadas a 4 °C para su posterior uso.

4.3.6 Densidad óptica

La biomasa de las muestras provenientes de los cultivos se cuantificó midiendo la absorbancia a 650 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV-1800), las muestras fueron previamente diluidas 1:3. Se elaboró una curva estándar para correlacionar el peso seco con la densidad óptica.

4.3.7 Peso seco

Para la determinación de peso seco se utilizaron alícuotas de 10 ml de cultivo celular, diluidos en una relación de 1:3 en buffer de fosfatos. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm 4°C por 10 min y se desechó el sobrenadante. Los botones celulares se resuspendieron y centrifugaron nuevamente con agua destilada, se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 3 mL de agua destilada y se adicionaron a tubos de ensayo previamente pesados y secados durante 12 horas a 100 °C. Los tubos con las diluciones fueron secados en una estufa a 100 °C durante 24 horas, se enfriaron en un desecador y se pesaron. La biomasa se calculó por la diferencia de peso entre los tubos con células y los tubos vacíos.

4.3.8 Curva de calibración para estimar la concentración celular

Con la densidad óptica y el peso seco se obtuvo una curva de calibración de biomasa (g_b/L) v_s densidad a 650 nm, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9927$ (ANEXO I). La curva se empleó para estimar la concentración celular que se usaron en los experimentos de hidrodinámica en el reactor y las biotransformaciones.

4.3.9 Curva de calibración para concentración de sustrato y producto

Se prepararon soluciones para sustrato y producto de 0.2 hasta 2 g/L en agua destilada, y se analizaron por cromatografía de gases. Se obtuvieron dos correlaciones lineales, y con éstas se calcularon las concentraciones de los experimentos de transferencia de masa de sustrato y producto en la celda de Lewis modificada y de la tasa de consumo de sustrato en los experimentos de bioconversión (ANEXO II).

Mecanismos estudiados

4.4 Tiempo de mezclado

4.4.1. Estabilidad de fase dispersa [MeBuPyrr][BTA] en función del pH y Temperatura

Se decidió utilizar el método de pH para caracterizar el tiempo de mezclado en el bioreactor. En este método se consideró lo siguiente: el reactivo empleado (NaOH) reacciona rápidamente con la fase continua no afectando la fase dispersa y no haciendo cambios de viscosidad en el sistema. Para corroborar esta hipótesis se realizó un experimento para observar la estabilidad del líquido iónico a altas concentraciones de NaOH a temperatura ambiente y a 100 °C. La fase dispersa fue sometida a esta última temperatura para la extracción del sustrato y producto (ANEXO III). El experimento consistió en adicionar 200 µL de [MeBuPyrr][BTA] en 600 µL de NaOH 2 M en tubos Eppendorf y como blanco una muestra de líquido iónico con agua. Las muestras se agitaron con vórtex durante 5 minutos y se hicieron observaciones de descomposición del líquido iónico a las 0, 8 y 16 horas, para ambas temperaturas.

4.4.2. Determinación del tiempo de respuesta del electrodo de pH

La estimación del tiempo de respuesta del electrodo (Applisens Z010023511, L=235 mm) se realizó usando estándares de pH de 4 y 7. El experimento se llevó a cabo a 30°C, en mini-reactores de 20 mL, con agitación magnética, pasando el electrodo del buffer de 4 al de 7, y se midió la variación de pH con respecto al tiempo en segundos. El experimento se realizó por cuadruplicado (ANEXO IV).

4.4.3. Determinación del tiempo de mezclado

Para el análisis de los tiempos de mezclado se empleó el criterio de homogeneidad reportado por Hadjiev y col. (2006). Se estudiaron dos posiciones del electrodo en el biorreactor de 1 L (Figura 8.1). Se adicionó un pulso de 80 µL de NaOH 2 M, con este pulso el electrodo presentó un intervalo de variación de pH de 7 a 11 unidades

aproximadamente y se consideró que la reacción de hidrólisis se lleva a cabo entre el NaOH y la fase acuosa sin interacción con la fase dispersa. Las desviaciones estándar de los resultados no presentaron diferencia entre ambas posiciones. Por lo que se decidió colocar el electrodo 2 cm debajo del impulsor.

Se inyectó un pulso de NaOH 2 M de 80 μ L, 2 cm debajo de la superficie del líquido



Figura 4.1. Posiciones del electrodo estudiadas para determinar el tiempo de mezclado

El método consistió en adicionar a la dispersión agitada (a las condiciones de operación del biorreactor establecidas por el diseño experimental), un pulso de solución alcalina de 2 M para obtener un cambio de pH en la emulsión (agua-líquido iónico), es decir, partir de un pH inicial hasta lograr uno final, el tiempo de mezclado se obtiene cuando se alcanza el 95 % de esta variación de pH, el criterio de homogeneidad se define como:

$$H = \frac{pH_{\infty} \pm 0.05\Delta pH}{pH_{\infty}} \times 100 = 95\% \quad (4.4.3.1)$$

Donde:

pH_{∞} es el *pH final*

pH es el *pH inicial*

4.4.4. Tiempo de mezclado para el sistema bifásico (agua-aire)

Este experimento se realizó con el fin de comparar tiempos de mezclado con el sistema trifásico (agua-líquido iónico-aire). Se empleó un diseño experimental de 2 factores y 3 niveles cada uno, con un total de 9 corridas (Tabla 1.1). Los experimentos se llevaron a

cabo partiendo de la velocidad de agitación y aireación más baja. Los 9 experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 4.1. Diseño experimental para la estimación del tiempo de mezclado para un sistema líquido-gas

Aireación vvm (min^{-1})	Agitación rpm (min^{-1})
0.50	400
0.75	400
0.50	400
1.00	700
0.50	700
0.75	1000
0.75	1000
0.50	1000
0.50	400

4.4.5. Tiempo de mezclado para el sistema trifásico (agua-líquido iónico-aire)

Se empleó un diseño experimental de composición central (Torres-Martínez y col., 2009) compuesto de 15 corridas con 3 factores de 3 niveles cada uno (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Diseño experimental para la estimación del tiempo de mezclado a diferentes condiciones de operación.

Φ	rpm (min^{-1})	vvm (min^{-1})
0.5	400	0.5
0.5	400	1.0
0.5	700	0.75
0.5	1000	0.5
0.5	1000	1.0
0.125	400	0.75
0.125	700	0.5
0.125	700	0.75
0.125	700	1.0
0.125	1000	0.75
0.2	400	0.5
0.2	400	1.0
0.2	700	0.75
0.2	1000	0.5
0.2	1000	0.75

Los 15 experimentos se realizaron partiendo de la fracción dispersa más baja, empleando como fase acuosa agua destilada (no se empleó buffer de fosfatos debido a que no sería posible la medición de pH, por la acción el amortiguador).

Todos los experimentos partieron de un pH inicial de 7, se adicionó un pulso de 80 μL de NaOH y se midió la variación de pH con respecto al tiempo en segundos. Cada corrida se realizó por triplicado. Una vez medido el pH se adicionó HCl 2 M para regresar al pH inicial, y repetir el experimento o continuar con la siguiente corrida. Para evitar la acumulación de sales, se vació el reactor y se llenó con agua destilada nueva, esto se realizó cuando había que aumentar el volumen de fracción iónica correspondiente, de acuerdo al diseño experimental.

4.5 Coeficientes volumétricos de transferencia de sustrato y producto (K_{SA} y K_{PA})

4.5.1 Coeficientes de transferencia de sustrato y producto (K_S y K_P) por medio de la Celda de Lewis modificada

En este trabajo se propone un método para la estimación de los coeficientes de transferencia de masa para sustrato y producto mediante una Celda de Lewis modificada (Figura 4.2), que tiene un área interfacial constante de $18 \text{ m}^2/\text{m}^3$, agitación independiente en ambas fases y temperatura controlada. Se empleó un diseño experimental de composición central de 11 corridas.

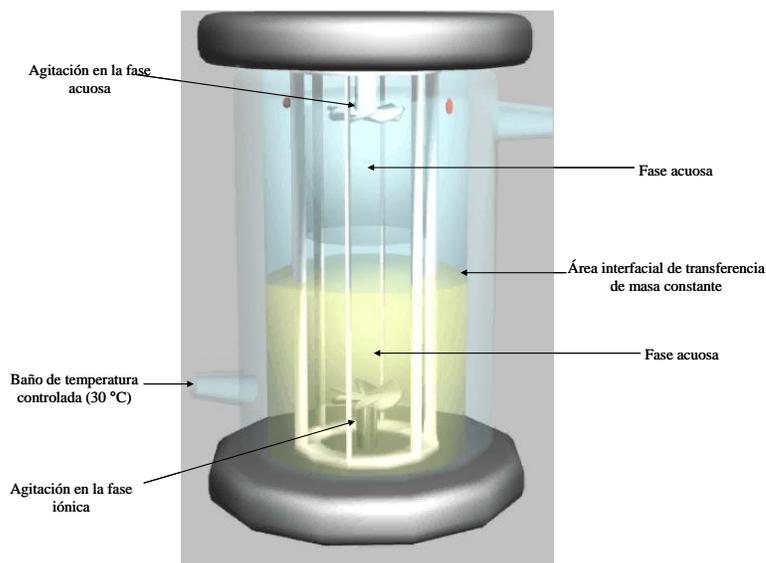


Figura 4.3. Celda de Lewis modificada propuesta en este trabajo para la estimación de los coeficientes de transferencia de masa de sustrato K_S 's y producto K_P 's.

La fase acuosa se saturó con líquido iónico antes de cada experimento y viceversa. Cada corrida consistió en adicionar un pulso de 2 mL con una mezcla de sustrato y producto de concentraciones conocidas en la fase acuosa. Se agitaron las fases conforme al diseño experimental (Tabla 4.3). Al final de cada experimento, la fase acuosa se renovó y se saturó con líquido iónico, mientras que la fase iónica se mantuvo a 65 °C durante 14 h para evaporar en lo posible los compuestos de extracción (sustrato y producto), no dejándolo más tiempo debido a la posible formación de cristales en el líquido iónico.

Tabla 4.3. Diseño experimental para la estimación de K_S 's y K_P 's en la celda de Lewis modificada.

Propela superior (rpm)	Propela inferior (rpm)
165	206
165	103
206	206
206	64
165	103
165	64
0	103
0	64
0	206
165	103
206	103
206	103

En cada experimento se tomaron muestras de 1 mL de la fase acuosa a los tiempos 0, 2, 5, 8, 12, 16, 20, 25, 30 y 40 minutos. Las muestras se analizaron por cromatografía de gases. Se hizo un balance de masa y partiendo de las concentraciones de extracción obtenidas se estimaron los coeficientes de transferencia de masa para sustrato y producto para las 11 diferentes condiciones de operación. Todos los experimentos se realizaron a 30° C, temperatura de operación en el reactor para la biotransformación de cetonas a lactonas.

La tasa con la que se transfiere el sustrato y/o producto a través de la interfase agua-líquido iónico en la Celda de Lewis modificada se puede expresarse mediante la ecuación (4.5.1.1):

$$\frac{dS}{dt} = -K_S a_L (S - S_f) \quad (4.5.1.1)$$

Donde:

$\frac{dS}{dt}$ es la tasa de transferencia de masa de sustrato en la interfase

$K_{s a_L}$ es el coeficiente de transferencia de masa de sustrato en la interfase agua-líquido iónico en la Celda de Lewis

a_L es el área interfacial de transferencia de masa en la celda de Lewis modificada

S es el la concentración de sustrato en la fase acuosa en cualquier tiempo

S_f es la concentración final en equilibrio de la fase acuosa

t es el tiempo

Resolviendo la ecuación 4.5.1.1 por el método de variables separables se tiene:

$$\int \frac{dS}{(S - S_f)} = -K_s a_L \int dt \quad (4.5.1.2)$$

Integrando y evaluando entre los límites:

$$\text{a } t = 0 \quad S = S_0$$

$$\text{a } t = t \quad S = S$$

$$\int_{S_0}^S \frac{dS}{(S - S_f)} = -K_s a_L \int_0^t dt \quad (4.5.1.3)$$

$$\ln(S - S_f) \Big|_{S_0}^S = -K_s a_L t \Big|_0^t \quad (4.5.1.4)$$

$$\ln(S - S_f) - \ln(S_0 - S_f) = -K_s a_L t \quad (4.5.1.5)$$

Aplicando leyes de los logaritmos:

$$\ln \frac{(S - S_f)}{(S_0 - S_f)} = -K_s a_L t \quad (4.5.1.6)$$

Donde:

$$K_{ps} = \frac{S_I^*}{S_a^*} \quad (4.5.1.7)$$

$$\text{Y } S_I^* = S_o - S_a^* \quad (4.5.1.8)$$

$S_f = S_a^*$ sustituyendo (4.5.1.8) y la ecuación (4.5.1.7)

$$K_{ps} = \frac{S_o - S_f}{S_f} \quad (4.5.1.9)$$

$$K_{ps} S_f = S_o - S_f \quad (4.5.1.10)$$

$$K_{ps} S_f + S_f = S_o$$

$$S_f(K_{Ps} + 1) = S_o \quad (4.5.1.11)$$

$$S_f = \frac{S_o}{K_{Ps} + 1} \quad (4.5.1.12)$$

K_{Ps} es el coeficiente de partición del sustrato entre la fase dispersa y la acuosa, S_I^* y S_a^* son las concentraciones de sustrato en el equilibrio en la fase iónica y acuosa respectivamente.

Una vez obtenida esta ecuación lineal se graficó contra el tiempo, donde la pendiente resultante es el coeficiente de transferencia de masa K_{sAL} en la Celda de Lewis modificada.

Se realizó el mismo tratamiento matemático para calcular el coeficiente de transferencia de masa de producto, ya que ambos experimentos se realizaron al mismo tiempo y el pulso inyectado en la Celda de Lewis era una mezcla de ambos compuestos a concentraciones conocidas. Y se obtuvo la ecuación (4.5.1.13).

$$\ln \frac{(P - P_f)}{(P_0 - P_f)} = -K_p a_L t \quad (4.5.1.13)$$

Donde la pendiente de esta gráfica es el coeficiente de transferencia de masa para producto K_{pAL} .

Los coeficientes de transferencia de masa para sustrato y producto a diferentes números de Reynolds (N_{Re}) de las interfases se estimaron de la siguiente manera:

$$K_s = \frac{K_s a_L (s^{-1})}{a_L (m^{-1})} = K_s \left(\frac{m}{s} \right) \quad (4.5.1.19)$$

Los N_{Re} de las interfases tanto acuosa como iónica se estimaron con la ecuación (4.5.1.15):

$$N_{Re} = \frac{\rho L V_s}{\mu} \quad (4.5.1.20)$$

ρ es la densidad la fase estudiada

μ es la viscosidad de la fase estudiada

V_s es la velocidad del fluido en cada fase en función de las velocidades de agitación

L es la longitud característica (Diámetro del área interfacial)

La velocidad superficial de las fases líquidas en la interfase se estimó utilizando partículas construidas a partir de silicón y resina epóxica tratando de que tuvieran la misma densidad de las fases, es decir, que las partículas se mantuvieron estáticas en medio de cada una de las fases sin agitación. Se empleó la siguiente metodología: Se agitaron las propelas de la celda conforme al diseño experimental y se midió el tiempo que tardaba la partícula en dar una vuelta por todo el tubo de arrastre de cada una de las fases en la celda, cada medición se realizó 10 veces y se obtuvo un promedio que se consideró como la V_s promedio de la fase en estudio en función de su respectiva agitación (ANEXO VII).

Por otro lado, se realizaron dos experimentos que consistieron en adicionar un pulso de sustrato en la fase iónica, debido a que en el reactor el sustrato se transfiere de la fase dispersa a la acuosa. La recolección de muestras se realizó en la fase acuosa. Estos experimentos permitieron comparar los coeficientes obtenidos de la fase acuosa a la iónica y viceversa. Las velocidades de agitación empleadas en estos experimentos fueron de para fase iónica 0 y 206, y fase acuosa 60 y 206 rpm. Para este experimento el balance de masa en la Celda de Lewis fue partiendo de la ecuación (4.5.1.21)

$$\frac{dS}{dt} = K_S a_L (S_f - S) \quad (4.5.1.21)$$

Donde S_f es la concentración de sustrato final en equilibrio en la fase acuosa

$$\int \frac{dS}{S_f - S} = K_S a_L \int dt \quad (4.5.1.22)$$

Integrando y evaluando entre los límites:

$$\text{a } t = 0 \quad S = 0$$

$$\text{a } t = t \quad S = S$$

$$\int_0^S \frac{dS}{S_f - S} = K_S a_L \int_0^t dt \quad (4.5.1.23)$$

$$\ln(S_f - S) - \left| \ln(S_f) \right|_0^S = K_S a_L t \quad (4.5.1.24)$$

$$\ln \frac{(S_f - S)}{S_f} = K_S a_L t \quad (4.5.1.25)$$

Se resolvió la ecuación (4.5.1.21) por mínimos cuadrados y se obtuvo el coeficiente de transferencia de masa (K_S) para sustrato de la fase iónica a la acuosa.

4.5.2 Determinación del área de transferencia de masa (A) de la fase dispersa en el reactor

Para determinar el área de transferencia de masa de la fase dispersa a las diferentes condiciones de operación del reactor, se determinó el diámetro promedio “Sauter” de gota (d_{32}) empleando un equipo de reflectancia óptica de 3 dimensiones (ORM 3D NTSE Particle scan 2008) con un diseño de composición central de 19 corridas. Con tres factores de tres niveles cada uno (Tabla 4.5):

Tabla 4.5. Diseño experimental para la estimación del d_{32} de la fase dispersa en el biorreactor

Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Fracción iónica (%)	Biomasa (g/L)
1000	0.50	20.	0.0
700	0.75	12,5	5.0
700	0.75	12.5	0.0
700	0.75	12.5	2.5
1000	1.00	5.0	0.0
1000	0.75	12.5	2.5
700	0.75	12.5	2.5
400	1.00	5.0	5.0
700	0.75	20	2.5
400	0.50	20	5.0
400	1.00	20	0.0
400	0.75	12.5	2.5
400	0.50	5.0	0.0
700	0.50	12.5	2.5
700	0.75	12.5	2.5
1000	0.50	5.0	5.0
1000	1.00	20	5.0
700	0.75	5.0	2.5
700	1.00	12.5	2.5

Los experimentos se realizaron en un reactor Aplikon de 1 L con volumen de operación de 0.7 L. La medición del diámetro d_{32} , para las 19 corridas se realizó por triplicado a 30 ° C.

Los experimentos se iniciaron con los tratamientos sin biomasa y la fracción dispersa más baja, se midió el d_{32} , los siguientes experimentos consistieron en incrementar la fracción iónica y extraer el volumen de la fase acuosa correspondiente. Para los experimentos con biomasa a $2.5 \text{ g}_b/L$, se inició con la fracción iónica más baja, para los posteriores experimentos se incrementó la fracción iónica, y se extrajo el volumen correspondiente de fracción acuosa, este volumen se centrifugó para recuperar la biomasa y regresarla al reactor, para mantener siempre la misma concentración. Para $5 \text{ g}_b/L$ se empleó la misma estrategia descrita en este párrafo. Se usó como blanco estándar en la medición del d_{32} buffer de fosfatos 50 mM a pH 7 saturado con líquido iónico.

4.5.3 Estimación de los coeficientes volumétricos de transferencia de sustrato y producto (K_{SA} y K_{PA}) en el reactor

Para el cálculo de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa para sustrato y producto en el reactor, se multiplicaron los valores más bajos de los coeficientes de transferencia de masa, K_S y K_P obtenidos en la Celda de Lewis modificada por las áreas de transferencia de masa, A de la fase dispersa en el reactor obtenidas a diferentes condiciones de operación.

Donde el área de transferencia de masa, A de la fase dispersa se calculó:

$$A = \frac{6(\varphi)}{d_{32}} \quad (4.5.3.1)$$

A es el área volumétrica de transferencia de masa de la fase dispersa en el reactor

φ es la fracción iónica en el reactor

d_{32} es el diámetro de gota promedio (*Sauter*) de la fase dispersa, calculada con la ecuación (4.5.3.2)

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3 n_i}{\sum d_i^2 n_i} \quad (4.5.3.2)$$

4.6 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa para oxígeno

4.6.1 Calibración del electrodo

Se empleó un electrodo (AppliSens Z010032520, L=235 mm). La calibración se realizó con 20 mL de una solución de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 a 30°C y agitación magnética, previamente saturada con oxígeno durante 20 min, a estas condiciones se calibró el electrodo tomando como referencia el 100 % de saturación de oxígeno disuelto en la solución.

4.6.2 Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno

Una vez calibrado el electrodo se emplearon 20 mL de otra solución de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 sin oxígeno a 37 °C, esto se logró con la adición de N₂ al 99% y agitación magnética durante 20 min, se sumergió el electrodo en esta solución hasta el 0% de saturación y se pasó lo más rápido posible el electrodo a la solución de 100% de saturación utilizada para la calibración. Se registró el tiempo que tardó la señal del electrodo en llegar al 62.3 % de saturación (Hadjiev 2006), el experimento se realizó por triplicado (ANEXO V). Este tiempo se consideró como el tiempo de respuesta del electrodo.

4.6.3 Coeficientes volumétricos de transferencia de masa de O₂

Se empleó el método dinámico para la estimación de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa de O₂ que involucra el tiempo de respuesta del electrodo y asegura una medición más confiable. Las condiciones de operación usadas en este experimento fueron las mismas que se emplearon y se describen en la estimación de d_{32} (Ver 8.5.3) para calcular el área de transferencia de masa (A) de la fase dispersa en el reactor.

El método consistió en eliminar el gas del reactor con N₂ hasta alcanzar el 0 % de la saturación, posteriormente se inyectó aire mediante un difusor convencional hasta lograr el 100 % de la saturación. En este lapso se realizaron mediciones cada 5 s. Con estos datos

se usó el modelo propuesto por Fuchs y col. (1971), asociado a una regresión no lineal para estimar un K_La . Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El modelo incluye el tiempo de respuesta del electrodo como sigue:

Partiendo de un balance de materia tanto en el electrodo como en el biorreactor:

$$\frac{dC_E}{dt} = K_e(C_L^* - C_E) \quad (4.6.3.1)$$

Fase acuosa

$$\frac{dC_L}{dt} = K_La(C_L^* - C_L) \quad (4.6.3.2)$$

En el electrodo

La constante del electrodo se define como:

$$K_e = \frac{1}{t_R}$$

C_E es la concentración medida por electrodo

C_L es la concentración en líquido

K_e es la constante del electrodo estimada a partir del tiempo de respuesta

t es el tiempo de medición del coeficiente de transferencia de O_2

K_La es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa O_2 a diferentes condiciones de operación

Adimensionalizando el gradiente del electrodo que involucra la concentración de oxígeno disuelto en el reactor se tiene:

$$Y_E = \frac{C_L^* - C_E}{C_L^* - C_{EO}} \quad (4.6.3.3)$$

Y_E es la concentración adimensional de lectura del electrodo

Y sustituyendo los balances de masa en el biorreactor y el electrodo ecuaciones (4.6.3.1) y ecuación (4.6.3.2) en la ecuación (4.6.3.3) se tiene:

$$Y_E = \frac{(K_e \exp^{-K_La(t)} - K_La \exp^{-K_e(t)})}{K_La - K_e} \quad (4.6.3.4)$$

El cálculo de los K_La 's se estimó con una regresión no lineal empleando el algoritmo Levenberg-Marquardt y se resolvió en PolyMath 5.

4.6.4 Consumo de Potencia gaseada por unidad de volumen (P_g/V)

El consumo de Potencia gaseada por unidad de volumen (P_g/V) se estimó a partir de la corriente y fuerza electromotriz del motor del reactor (ANEXO VI) que es de corriente directa, mediante la siguiente ecuación (4.6.4.1):

$$P = I E \quad (4.6.4.1)$$

Donde:

P_T es la potencia total suministrada del motor hacia la flecha del reactor

I es la corriente eléctrica producida por del motor

E es la fuerza electromotriz suministrada al motor

Las mediciones de corriente y voltaje se realizaron con dos multímetros (STEREN Mul 050) conectados en paralelo al motor, midiéndose en cada una de las 19 corridas del diseño experimental.

4.6.5 Velocidad superficial del gas en el biorreactor (V_s)

La velocidad superficial del gas en el reactor se estimó a partir de la aireación (vvm) que involucra el flujo volumétrico y se dividió sobre el área superficial del reactor.

4.7 Tasa de consumo de O_2

Los experimentos para cuantificar la tasa de consumo de oxígeno se realizaron en un mini reactor con una relación de $H:T = 1$, con un volumen de operación de 20 mL. El medio estuvo compuesto de buffer de fosfatos 50 mM a pH 7, 1.0 g/L de ampicilina y 10 g/L de glicerol como poder reductor y 3 g_b/L de biomasa. Los experimentos se realizaron a 30 °C por triplicado. El reactor se mantuvo con agitación constante mediante un agitador magnético (no fue posible estimar la velocidad de agitación). Lo cual permitía alcanzar una concentración de O_2 disuelto de 100 %.

La concentración de oxígeno disuelto se estimó a partir de la presión atmosférica reportada por el Sistema Meteorológico Nacional (SMN) con una presión de 1013.25 hPa, esta presión fue alimentada al software del módulo OXY-4 mini set (PreSens GmbH), el cual estimó una concentración promedio de 0.0072 g/L. Por otro lado Jiménez-Cisneros (2001), reporta que en la ciudad de México a 20 °C se presenta una solubilidad de oxígeno de 0.0072 g/L en agua destilada, mientras que Hilker y col. (2006) reportan en estudios de la influencia de oxígeno en reacciones tipo Baeyer-Villiger concentraciones de 0.0075 g/L a 30 °C empleando medio complejo similar al usado en este trabajo para la producción de células.

El consumo de oxígeno se realizó con un modelo propuesto por Badino y col. (2000), que involucra el tiempo de respuesta del electrodo, la concentración de saturación de oxígeno en el reactor y la tasa de consumo de éste por el biocatalizador de acuerdo con la ecuación (4.7.1):

$$C_E = C_L - \mathfrak{R}_{O_2} \left(t + \frac{e^{-ket}}{ke} - \frac{1}{ke} \right) \quad (4.7.1)$$

Donde:

C_E es la concentración registrada por el electrodo

C_L es la concentración de saturación en el reactor

\mathfrak{R}_{O_2} es la tasa de consumo de mantenimiento y/o reacción del biocatalizador

t es el tiempo en segundos

ke es la constante del electrodo

Se usó una regresión no lineal con el algoritmo de Levenberg-Marquardt en PolyMath 5.0, para estimar la tasa específica de consumo de oxígeno (\mathfrak{R}_{O_2})

4.7.1 Tasa de consumo de O_2 para mantenimiento

Las células se adaptaron durante 30 minutos antes de iniciar el experimento. Se midió la tasa de consumo de oxígeno para mantenimiento celular, con el método dinámico. Que consistió en dejar de suministrar oxígeno al reactor, permitiendo que el oxígeno disuelto fuera consumido por las células: así se midió la caída de oxígeno disuelto en

intervalos de 5 s con el electrodo, previamente calibrado y su tiempo de respuesta caracterizado.

4.7.2 Tasa de consumo de O₂ con reacción

Una vez medida la caída de O₂ disuelto en reactor por triplicado, se adicionó un pulso de sustrato con una concentración final de 0.5 g_S/L en el reactor y se realizó la misma estrategia empleada para la medición de la tasa de consumo de oxígeno en mantenimiento.

4.8 Tasa de consumo de sustrato

Para la determinación de la tasa de consumo de sustrato, se utilizó biomasa producida de acuerdo a la metodología descrita en apartado 8.3.4.1. Los experimentos se llevaron a cabo en matraces bafleados de 250 mL con 20 mL de buffer de fosfatos, con 1.0 g/L de ampicilina y 10 g/L de glicerol. Se estudió la cinética de velocidad de formación de producto en función de las concentraciones de sustrato (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.2, 1.6, 20 g_S/L). Para cada concentración inicial de sustrato, se tomaron muestras en los tiempos 0, 2, 5, 8, 12, 16, y 20 min, las muestras se analizaron por cromatografía de gases para cuantificar la formación de producto. Los experimentos se realizaron a 30 °C, 100 rpm y aireación superficial (medida al 100% con el electrodo de O₂) y una concentración celular de 3 g_b/L.

Se utilizó un modelo modificado propuesto por Aiba y col. (1968) ecuación (4.8.1) para estimar las tasas específicas de consumo de sustrato, la constante de inhibición y de afinidad de la ciclohexanona monooxigenasa a una concentración de sustrato óptimo

$$\mathfrak{R}_s = X \left(\frac{(r_s)S_{ac}}{K_S + S_{ac}} \right) \exp \left(- \frac{S_{ac}^3}{K_i} \right) Y_{s/p} \quad (4.8.1)$$

Donde:

\mathfrak{R}_s es la tasa de consumo de sustrato del biocatalizador

X es la concentración de biocatalizador

r_s es la tasa específica de consumo de sustrato del biocatalizador

S_{ac} es la concentración de sustrato en la fase acuosa

K_i es la constante de inhibición de sustrato hacia el biocatalizador

K_S es la constante de afinidad de sustrato

$Y_{s/p}$ es el rendimiento de sustrato en función de producto

Datos experimentales y conocidos para alimentar el modelo

\mathfrak{R}_s tasa de consumo de sustrato en función de las tasa de formación de producto

X concentración de biocatalizador, $3 \text{ g}_b \text{ L}^{-1}$

S_{ac} concentraciones de Sustrato en la fase acuosa

$Y_{s/p}$ rendimiento estequiométrico entre el sustrato y de producto

Donde el rendimiento estequiométrico se calculó como se define en la ecuación (5.5.1)

$$Y_{s/p} = 1 \frac{\text{mol}_s}{\text{mol}_p} = \frac{\left(108 \frac{\text{g}_s}{\text{mol}}\right)}{\left(124 \frac{\text{g}_{ps}}{\text{mol}}\right)} = 0.87 \frac{\text{g}_s}{\text{g}_p} \quad (5.5.1)$$

Datos estimados por el modelo: K_i , K_S y r_S

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Tiempo de mezclado

En esta tesis, se consideró importante el estudio del tiempo de mezclado porque el líquido iónico [MeBuPyrr][BTA] tiene una viscosidad 40 veces mayor a la de la fase acuosa (Torres-Martínez y col., 2009), lo que podría provocar un aumento global en la viscosidad del sistema, modificando los tiempos de mezclado y la dispersión de las fases. La Figura 4.1 muestra la variación de pH en ambas posiciones del electrodo propuestas para estudiar el tiempo de mezclado en el biorreactor. Las desviaciones estándar mostraron que no hay una diferencia de pH en la respuesta del electrodo entre ambas posiciones. Por lo tanto, se decidió colocar el electrodo 2 cm debajo del impulsor para todos los experimentos de mezclado en el biorreactor.

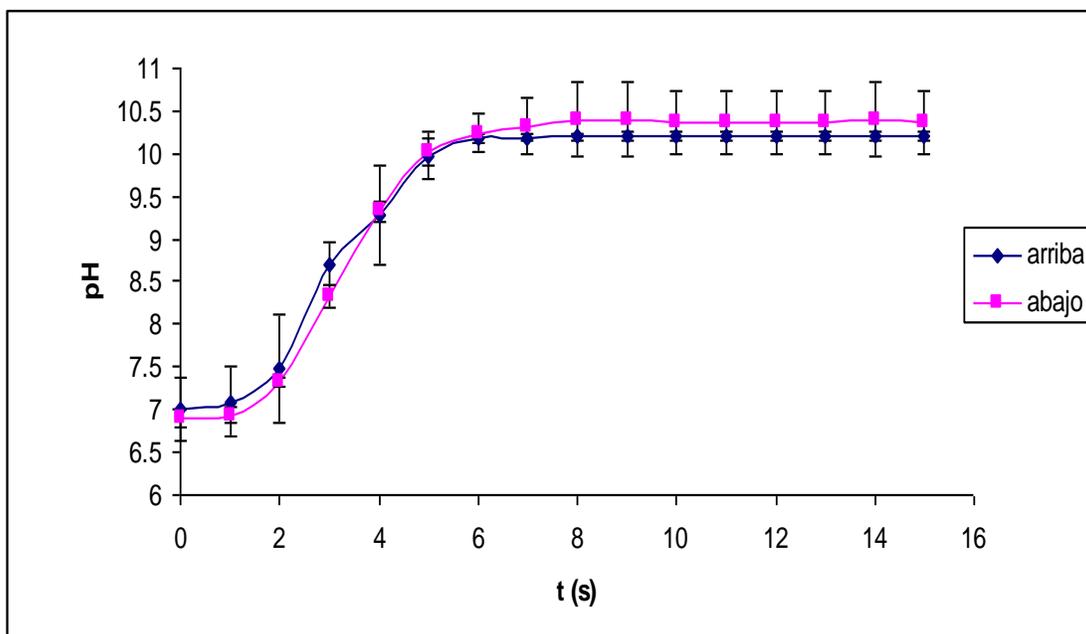


Figura 5.1. Variación del pH en ambas posiciones del electrodo para determinar la homogeneidad en el reactor (400 rpm, 0.5 vvm).

5.1.2 Tiempo de mezclado para el sistema bifásico (agua-aire)

Para comparar los tiempos de mezclado al adicionar una fase líquida dispersa (agua-líquido iónico-aire), se usó como referencia un sistema bifásico agua-aire. Para el sistema

bifásico, los resultados mostraron que al incrementar la velocidad de agitación de 400 hasta 1000 rpm el tiempo de mezclado disminuye de 6 a 4 segundos. Así mismo se observó que la aeración no interactuó de manera importante en el mezclado (Figura 5.2).

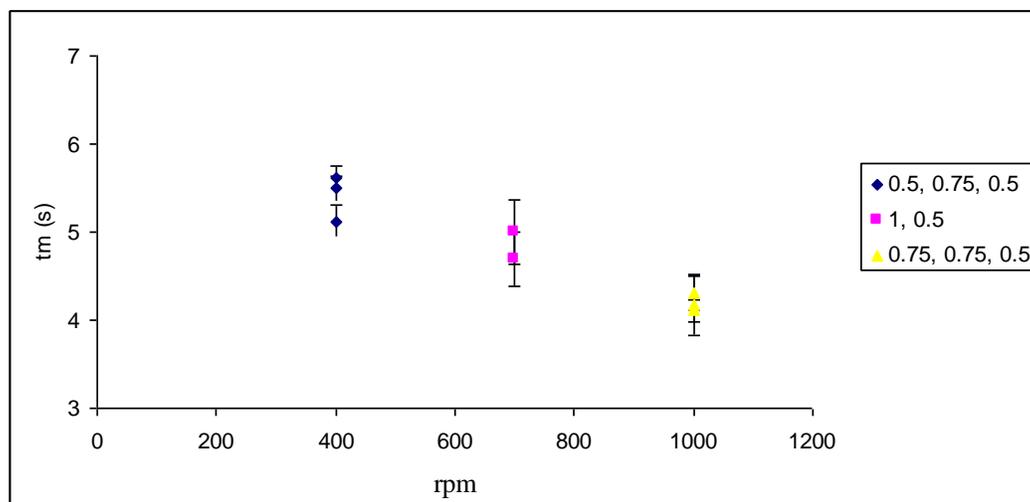


Figura 5.2. Tiempos de mezclado a diferentes velocidades de agitación (400, 700 y 1000 rpm) y aeración (0.5, 0.75 y 1 vvm) para un sistema bifásico (agua-aire).

5.1.3 Tiempo de mezclado para el sistema trifásico (agua-líquido iónico-aire)

Partiendo del diseño de composición central con los factores de agitación, aireación y fracción iónica, se estudió el tiempo de mezclado a diferentes fracciones iónicas (5, 12.5 y 20% v/v). En la Figura 5.3 se observa que al incrementar la fracción iónica en el reactor, el tiempo de mezclado disminuye a altas velocidades de agitación. Se plantea como hipótesis que el líquido iónico aumenta la viscosidad en el sistema debido a que es 40 veces más viscoso que el buffer de fosfatos, haciendo la suposición que la viscosidad del buffer es muy similar a la del agua ($0.001 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$). De forma inversa, la tensión interfacial del líquido iónico en comparación con el buffer de fosfatos es 7 veces menor provocando una disminución de la tensión interfacial en el sistema. Por lo tanto a bajas velocidades de agitación las fuerzas viscosas gobiernan el sistema, mientras que a altas no y la tensión superficial permite rápidos tiempos de mezclado. Por otro lado se ha encontrado que la aireación no es un factor importante que influya en este tipo de reactores (Hadjiev y col., 2006).

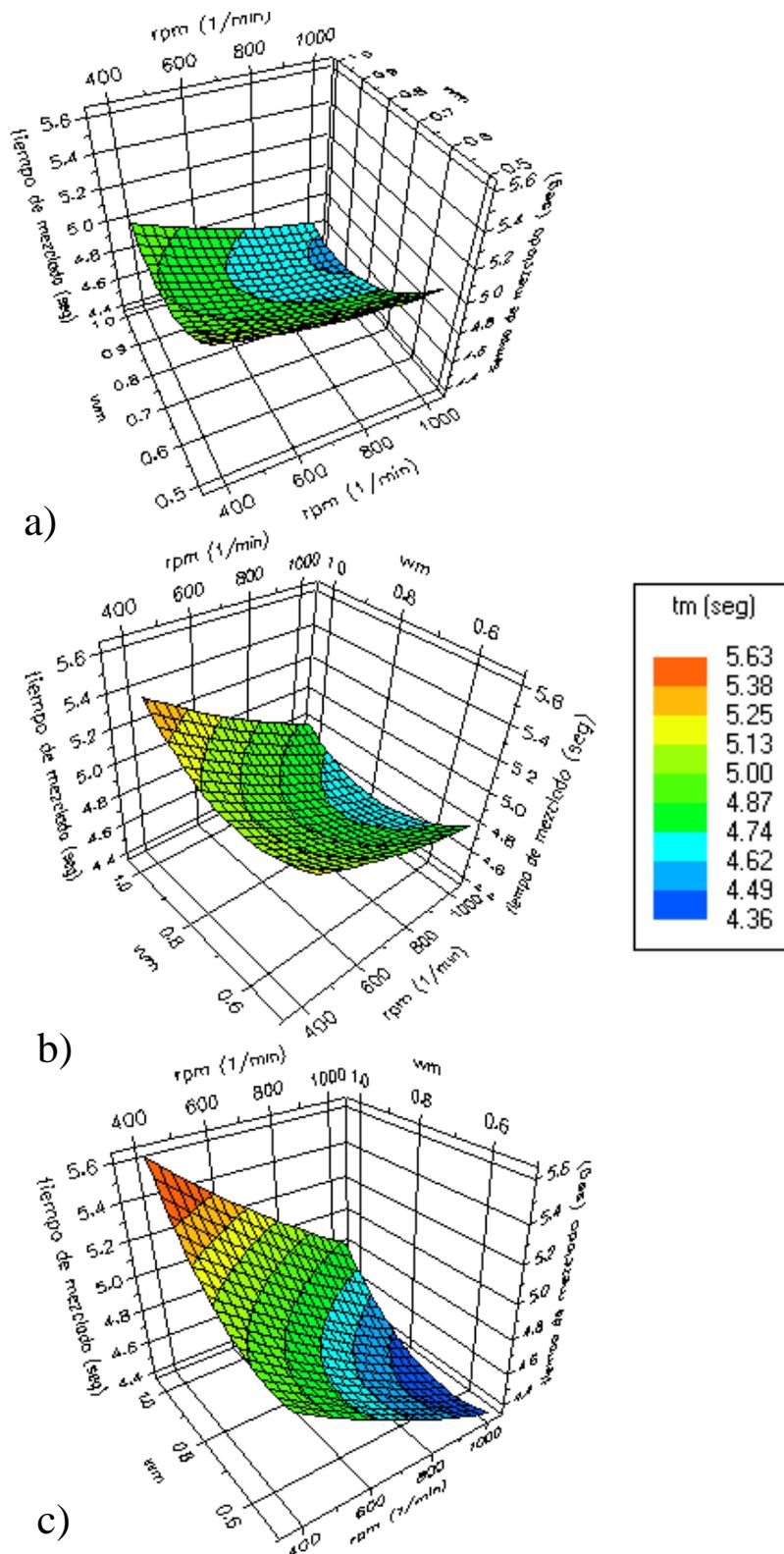


Figura 5.3. Tiempos de mezclado en un sistema trifásico agua-líquido iónico-gas a diferentes condiciones de operación: (rpm, vvm y fracción iónica) a) 5%, b) 12.5 % y c) 20% de fracción iónica

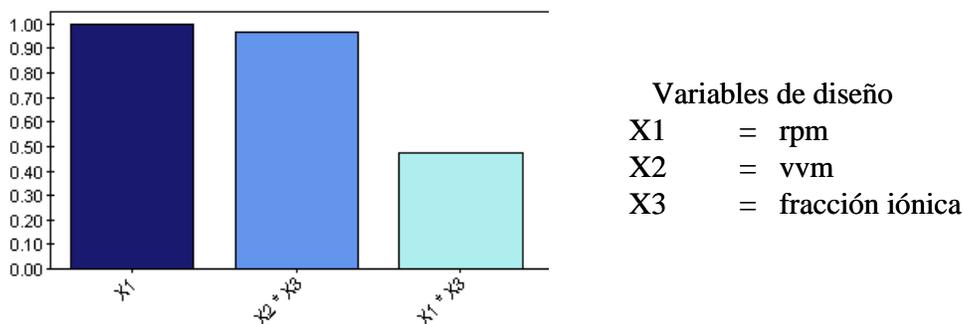


Figura 5.4. Interacciones más importantes que influyen en el tiempo de mezclado

El cuadro de Pareto (Figura 5.4) muestra que de los tres factores estudiados, la interacción que más influye en el tiempo de mezclado es la velocidad de agitación, mientras que las interacciones fase dispersa-aireación y la velocidad de agitación-fracción iónica tiene un menor efecto. Comparando los tiempos de mezclado obtenidos, con el tiempo de respuesta del electrodo, se observa que ambos se encuentran en el mismo orden de magnitud (4-5 y 4 segundos, respectivamente). El valor real del tiempo de mezclado puede presentar un error debido a este empalme de tiempos, es decir el valor verdadero podría ser más pequeño que el tiempo de respuesta. Los tiempos característicos obtenidos de los demás mecanismos estudiados son mayores al tiempo de mezclado, por lo tanto este tiempo no aparenta ser un efecto importante en la etapa limitante del proceso. Por otro lado, Van't Riet y Tramper (1991) reportan que los tiempos de respuesta para electrodos esterilizables como el empleado en este trabajo oscilan entre los 10 y 100 s. Finalmente si se compara el tiempo de mezclado con algunos reportados, la mayoría se encuentran en órdenes de magnitud similares, dependiendo del volumen de operación y las fases empleadas como se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Comparación de tiempos de mezclado y volúmenes de operación con otros trabajos

Reportes	Volúmenes	Método	Sistema	t_m (s)
Devine y col., 1995	30 – 2400 L	Conductancia	Líqu-gas	23 – 240
Hadjiev y col., 2006	3 L	pH	Líqu-gas	18 – 32
Kawase y col., 1997	3 L	pH	Líqu-gas-sólido	9-40
Este trabajo	1 L	pH	Líqu-gas	4 -6
Este trabajo	1 L	pH	Líqu-gas-líqu iónico	4 -5

5.2 Coeficientes de transferencia de masa para sustrato y producto (K_sA y K_pA)

Se estudiaron los coeficientes de transferencia de sustrato y producto para saber si el suministro de sustrato a la fase acuosa y la remoción de producto hacia la fase líquido iónico son del mismo orden de magnitud que la tasa de reacción y la formación de producto.

5.2.1 Coeficiente de transferencia de masa para sustrato, K_s

A partir de los datos de concentraciones de sustrato de los experimentos realizados en la Celda de Lewis modificada y considerando que tiene un área interfacial de transferencia constante y conocida (a_L) con un valor de $18.5 \text{ m}^2/\text{m}^3$, se realizaron los cálculos para obtener los coeficientes de transferencia a diferentes tasas de agitación en ambas fases.

La Figura 5.5 muestra los valores obtenidos de K_s a los diferentes N_{Re} de ambas fases.

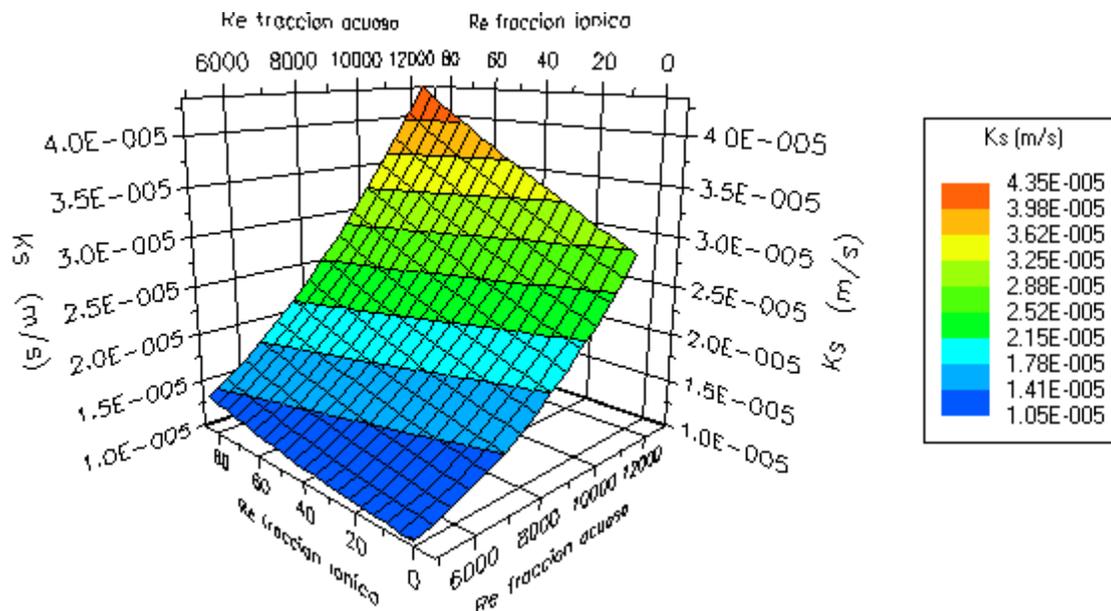


Figura 5.5. Coeficientes de transferencia de masa de Sustrato en función de los N_{Re} interfaciales de la fase iónica y la acuosa.

La teoría de capa límite (Bird y col., 1992) menciona que la disminución del espesor de la película de líquido estancada en la interfase de un sistema bifásico, provocado

por el incremento en las fuerzas inerciales y venciendo las fuerzas viscosas de las fases, permite una menor resistencia al transporte de un compuesto de una fase a otra. Esto se corrobora con los resultados obtenidos en la Celda de Lewis, donde se observa que los incrementos de los coeficientes de transferencia de masa (K_S) son proporcionales al aumento de los N_{Re} de los fluidos a ambos lados de la interfase líquido-líquido, esto es debido a que la capa límite en la interfase a N_{Re} altos disminuyen de espesor provocando una menor resistencia al transporte de masa.

También se realizaron dos experimentos donde la transferencia de masa fue de la fase iónica a la acuosa. Este experimento se hizo para comparar los K_S obtenidos de la fase acuosa a la iónica y viceversa. La tabla 5.2 muestra los coeficientes de transferencia de masa de la fase iónica a la acuosa y viceversa a las diferentes velocidades de agitación en ambas fases.

Tabla 5.2. Coeficientes de transferencia de masa de la fase iónica a la acuosa y viceversa

Tasas de agitación Fases (acuosa-iónica) (min^{-1})	Coeficientes de transferencia de sustrato (acuosa-iónica) (m s^{-1})	Coeficientes de transferencia de sustrato (iónica-acuosa) (m s^{-1})
60-0	9.63×10^{-6}	6.12×10^{-6}
206-206	4.35×10^{-5}	2.23×10^{-5}

Analizando los resultados de la Tabla 5.2, se observa que los coeficientes de transferencia de masa para sustrato de la fase acuosa a la iónica y viceversa son del mismo orden de magnitud y se hace la consideración que son iguales sin importar de que fase a que fase se calculen y están en función de la agitación de las fases y dependen de la difusividad del compuesto de estudio. Con estos resultados se justifica el método de análisis con que se estimaron los coeficientes de transferencia de masa en la celda de Lewis modificada propuesta en este trabajo.

5.2.2. Coeficiente de transferencia de masa para producto, K_P

A continuación se muestran los valores obtenidos de K_P en función de los N_{Re} de la fase acuosa y la fase iónica (Figura 5.6).

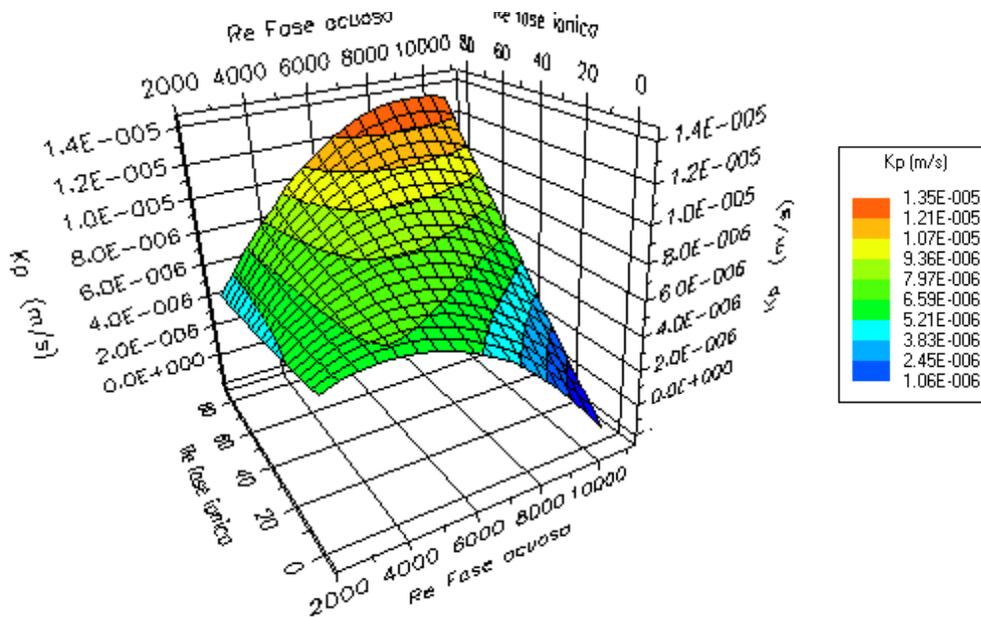


Figura 5.6. Coeficientes de transferencia de masa para producto en función de los N_{Re} de las fases iónica y la acuosa en la interfase de la Celda de Lewis

Se observa que a los N_{Re} más altos de las fases se obtienen los K_P más altos, esto se debe a que se disminuye el espesor de las dos capas límites en ambos lados de la interfase, permitiendo una menor resistencia al transporte del producto de la fase acuosa a la fase iónica.

Los K_S y K_P obtenidos en este trabajo son del mismo orden de magnitud que algunos reportados en Celdas de Lewis similares. Biswas y col. (2004) estudiaron la extracción de vanadio en un sistema bifásico tolueno–acetato sulfato a una temperatura de 303°C . Niemczewska y col. (2004) estudiaron la extracción de zinc (II) en un sistema tributilfosfato-agua. En ambos trabajos se observó que al incrementar la agitación en ambas fases se disminuía el espesor de película de la interfase, provocando un aumento del coeficiente de transferencia de masa.

5.2.3 Cálculo del área de transferencia de masa de la fase dispersa (A) en el biorreactor

El área de transferencia de masa de la fase dispersa (A) en el biorreactor se estimó para integrarla a los coeficientes de transferencia de masa (K_S y K_P) obtenidos en la Celda

de Lewis modificada y obtener un coeficiente volumétrico de transferencia de masa tanto de sustrato como de producto (K_{SA} y K_{PA}) en el biorreactor.

La Figura 5.7 muestra los valores obtenidos del d_{32} de la fase dispersa a las diferentes condiciones de operación del reactor según el diseño experimental descrito previamente manteniendo una concentración de biomasa constante de 5 g/L y aumentando la fracción iónica de 5, 12.5 y 20 %.

Se observa que la velocidad de agitación es el parámetro que más influye en el d_{32} de la fase dispersa. A velocidades altas y bajas se presentan los diámetros más pequeños, mientras que a velocidades medias se obtuvieron los diámetros más grandes. No se observó un efecto importante al incrementar la fase dispersa sobre el diámetro de gota. Torres-Martínez y col. (2009) empleando condiciones de aireación, agitación y fracción dispersa similares a este trabajo encontraron que al incrementar la fracción dispersa el diámetro de gota aumenta. La diferencia entre los resultados reportados por Torres-Martínez y col. (2009) con los de este trabajo es la presencia de biomasa, como una fase adicional al sistema. El incremento de la concentración celular en el biorreactor generó una disminución del d_{32} de la fase dispersa, probablemente debido a que la interacción biomasa-líquido iónico, propició una disminución en la tensión superficial de las gotas y evitó la coalescencia, favoreciendo el fenómeno de ruptura de las gotas haciéndolas de menor tamaño. La Figura 9.8 muestra los d_{32} obtenidos a diferentes condiciones de operación en el reactor, variando la concentración celular de biomasa de 0 a 5 g/L, manteniendo constante la fracción iónica (20%). Por otro lado, Galindo y col. (2000) encontraron que en un sistema aire-aceite- células al incrementar 15 % de la fracción dispersa y la concentración celular de 0.5 a 5 g/L el diámetro promedio “*Sauter*” de la fase dispersa se reducía notablemente, esta reducción del tamaño de gota incrementó el área interfacial del sistema. Lovick y col. (2005) empleando reflectancia óptica de tres dimensiones en un sistema agua-keroseno encontraron que a diferentes fracciones de keroseno, no se presentó un efecto importante en el tamaño gota, por el contrario a velocidades altas de agitación se presentó una disminución del d_{32} .

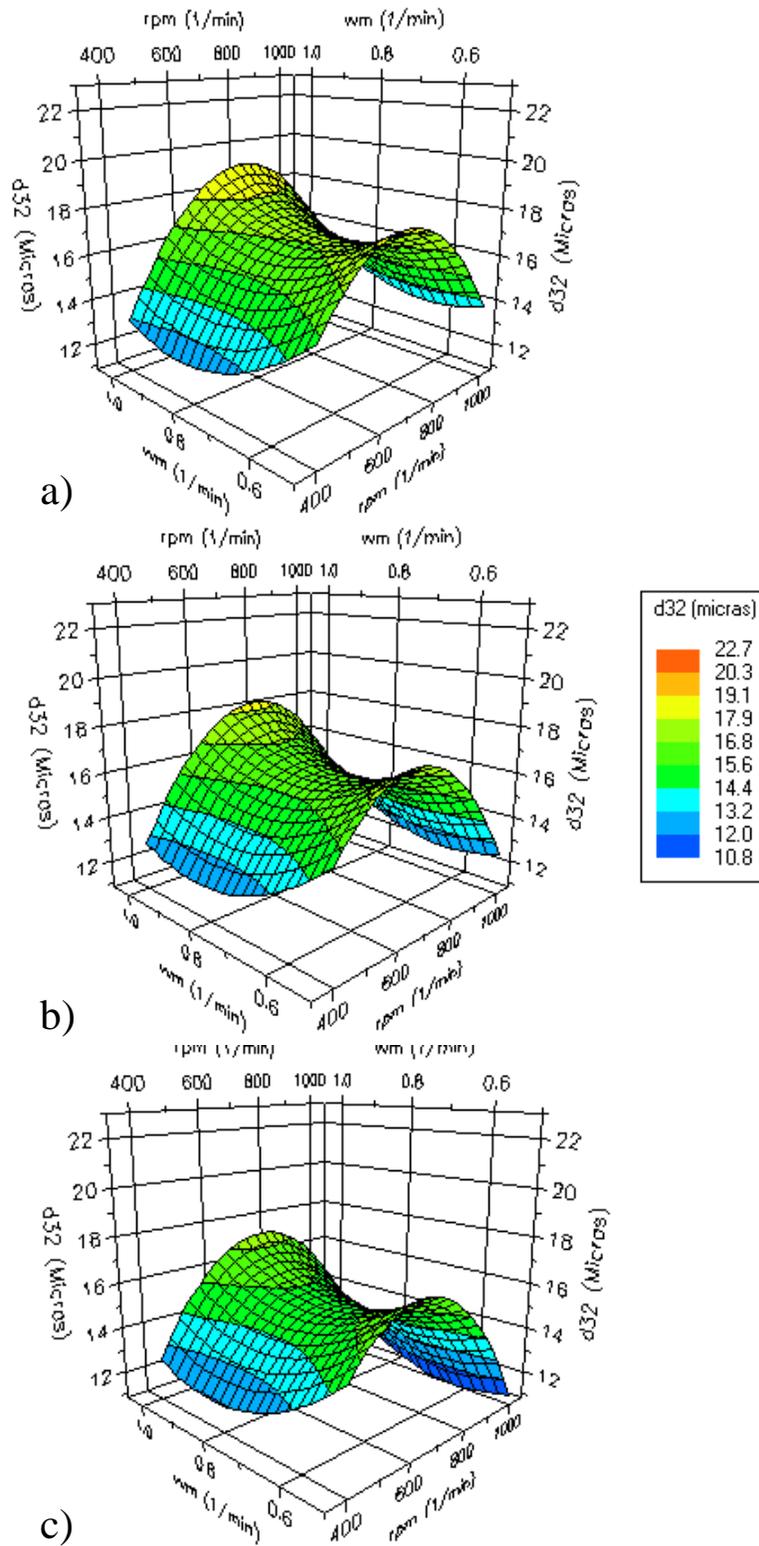


Figura 5.7. Variación del d_{32} de la fase dispersa a diferentes condiciones de operación del reactor (rpm, vvm y biomasa, fracción iónica) con 5 g/L de biomasa constante a) 5%, b) 12.5 %, c) 20% de fracción iónica

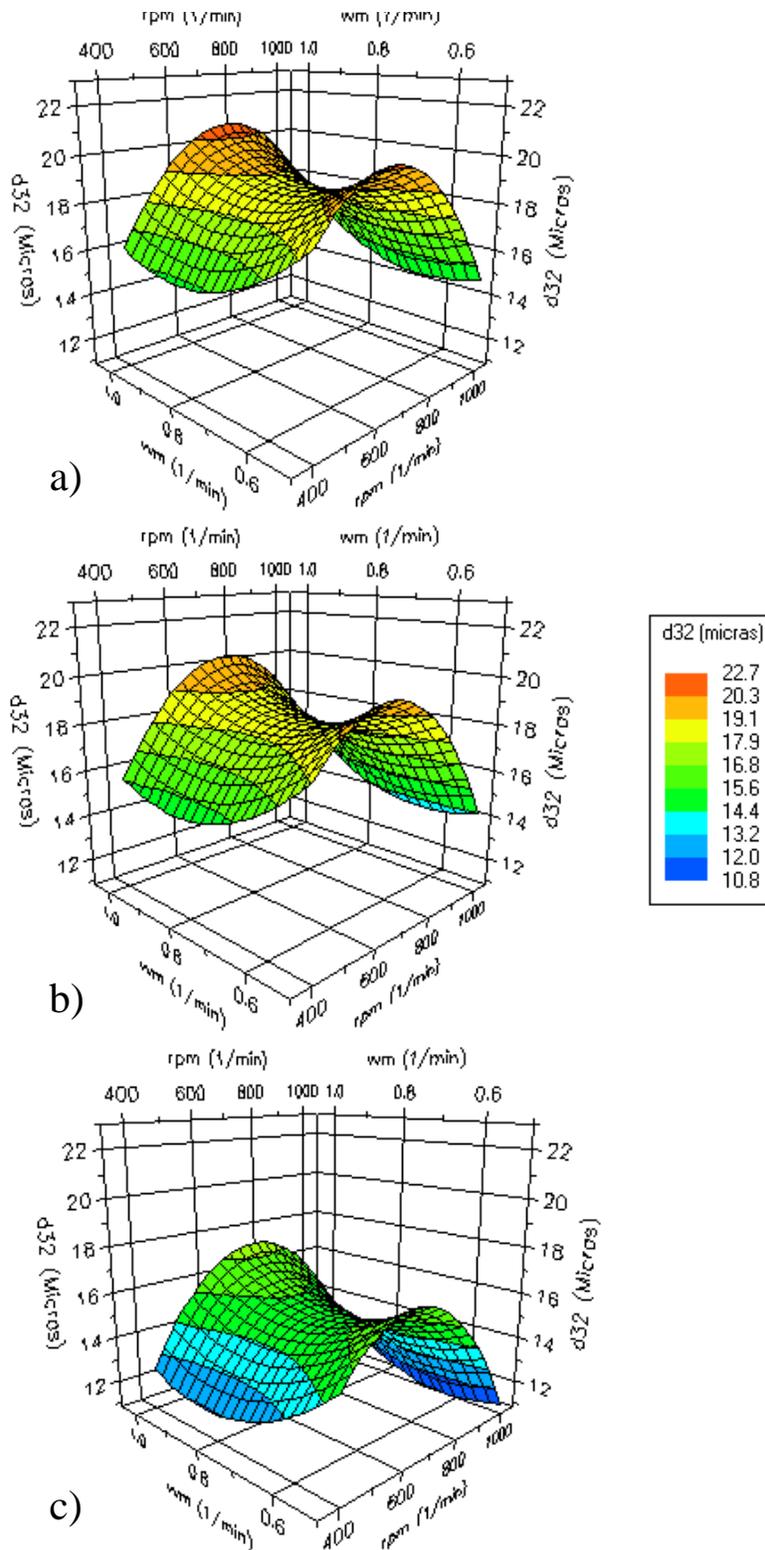


Figura 5.8. Diámetro promedio de gota *Sauter*, d_{32} , obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, manteniendo la fracción de fase dispersa constante (20%) y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g/L

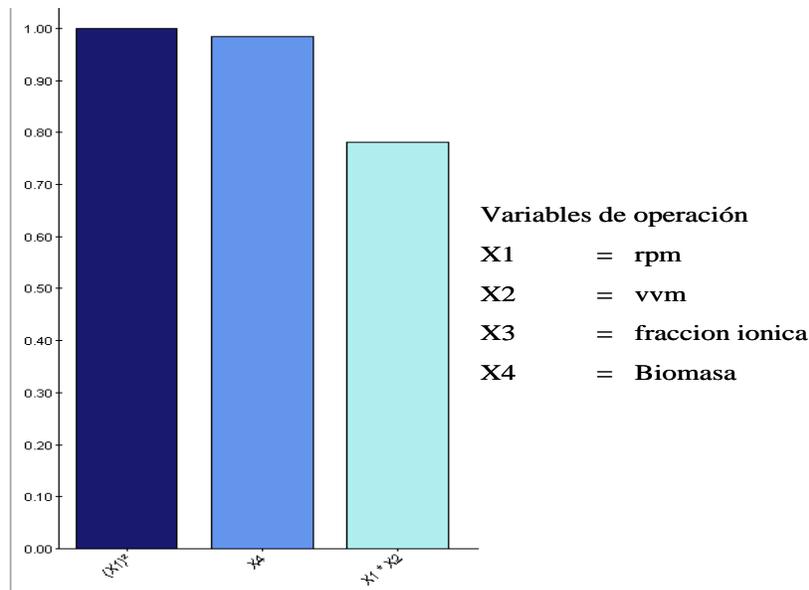


Figura 5.9. Variables más importantes que influyen en el d_{32} de la fase dispersa, según el cuadro de Pareto

En el cuadro de Pareto (Figura 5.9) se observa que las variables más importantes que influyen en el d_{32} de la fase dispersa en el reactor son la agitación y la concentración celular.

Para estimar los coeficientes volumétricos de transferencia de masa en el reactor a diferentes condiciones de operación para sustrato y producto ($K_S A$'s y $K_P A$'s), se tomaron los valores mas bajos de K_S y K_P obtenidos en la Celda de Lewis (8.06×10^{-6} para sustrato y 1.62×10^{-6} m/s para producto) con el fin de obtener las tasas de transferencia de sustrato y producto más bajas que se pudieran presentar en el biorreactor y se multiplicaron con las áreas volumétricas obtenidas a partir del d_{32} promedio de gota de la fracción iónica a las diferentes condiciones de operación del biorreactor, estas áreas estuvieron en un intervalo de 13972 a 83353 m^{-1} .

En las Figuras 5.10 y 5.11 se muestran los coeficientes volumétricos de transferencia de masa para sustrato ($K_S A$) obtenidos a las diferentes condiciones de operación, sin biomasa e incrementando la fracción dispersa. Mientras que las Figuras 5.12 y 5.13 los ($K_P A$) a las mismas condiciones para producto.

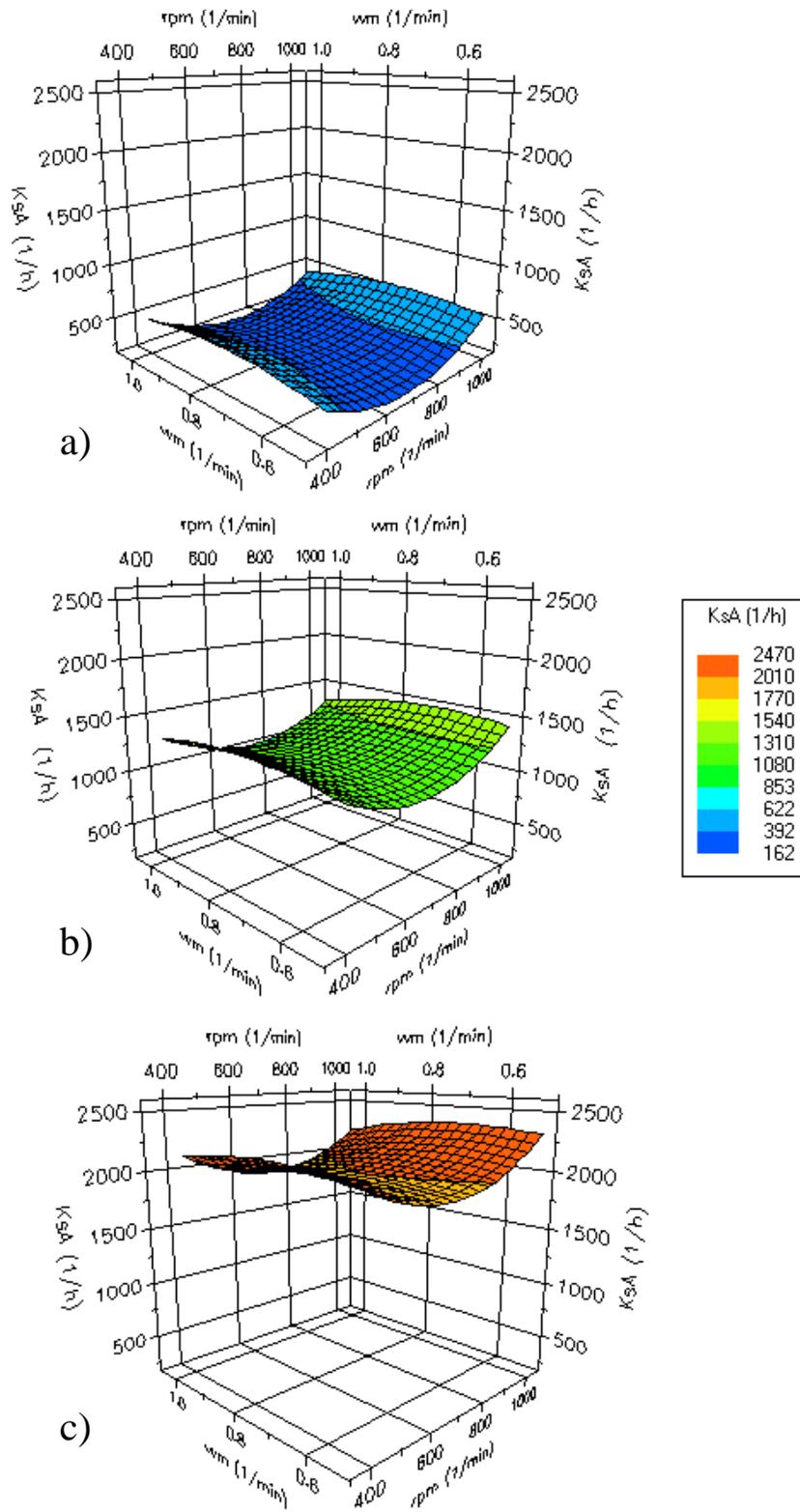


Figura 5.10. K_{sA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, sin biomasa y variando la fracción iónica: a) 5, b) 12.5 y c) 20 %

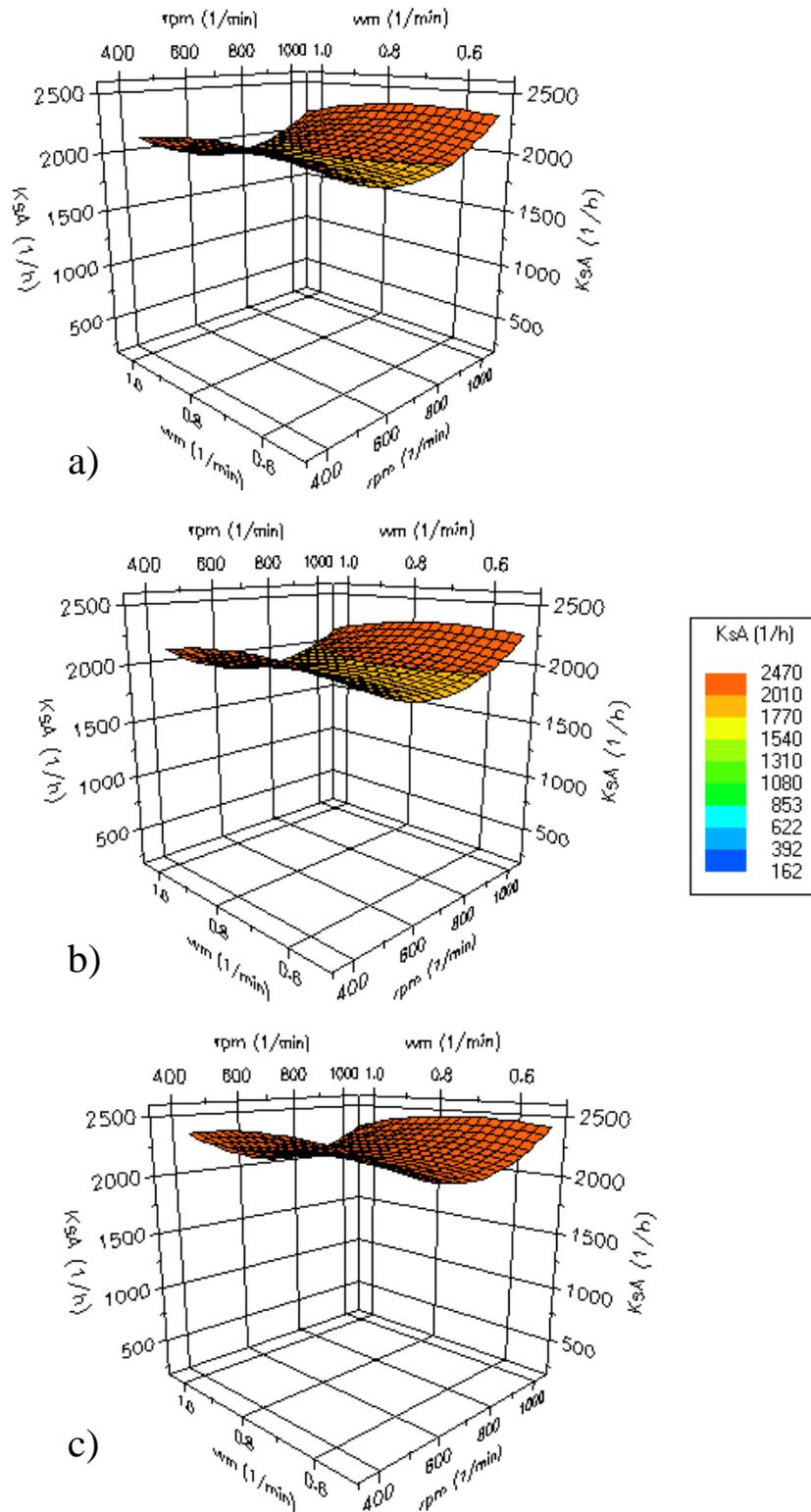


Figura 5.11. K_{sA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, manteniendo la fracción iónica constante 20% y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g_b/L

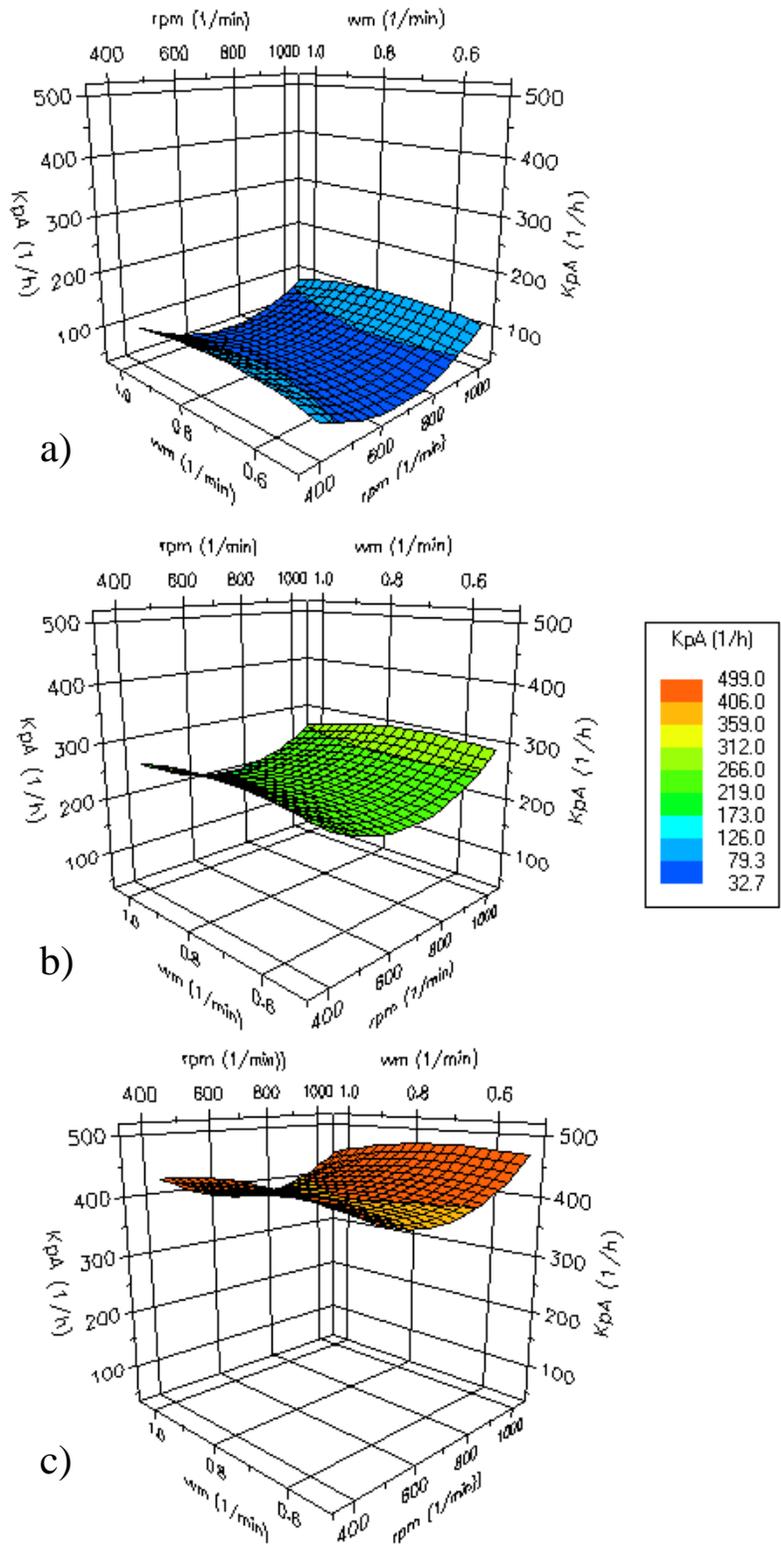


Figura 5.12. K_{pA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, sin biomasa y variando la fracción iónica: a) 5, b) 12.5 y c) 20 %

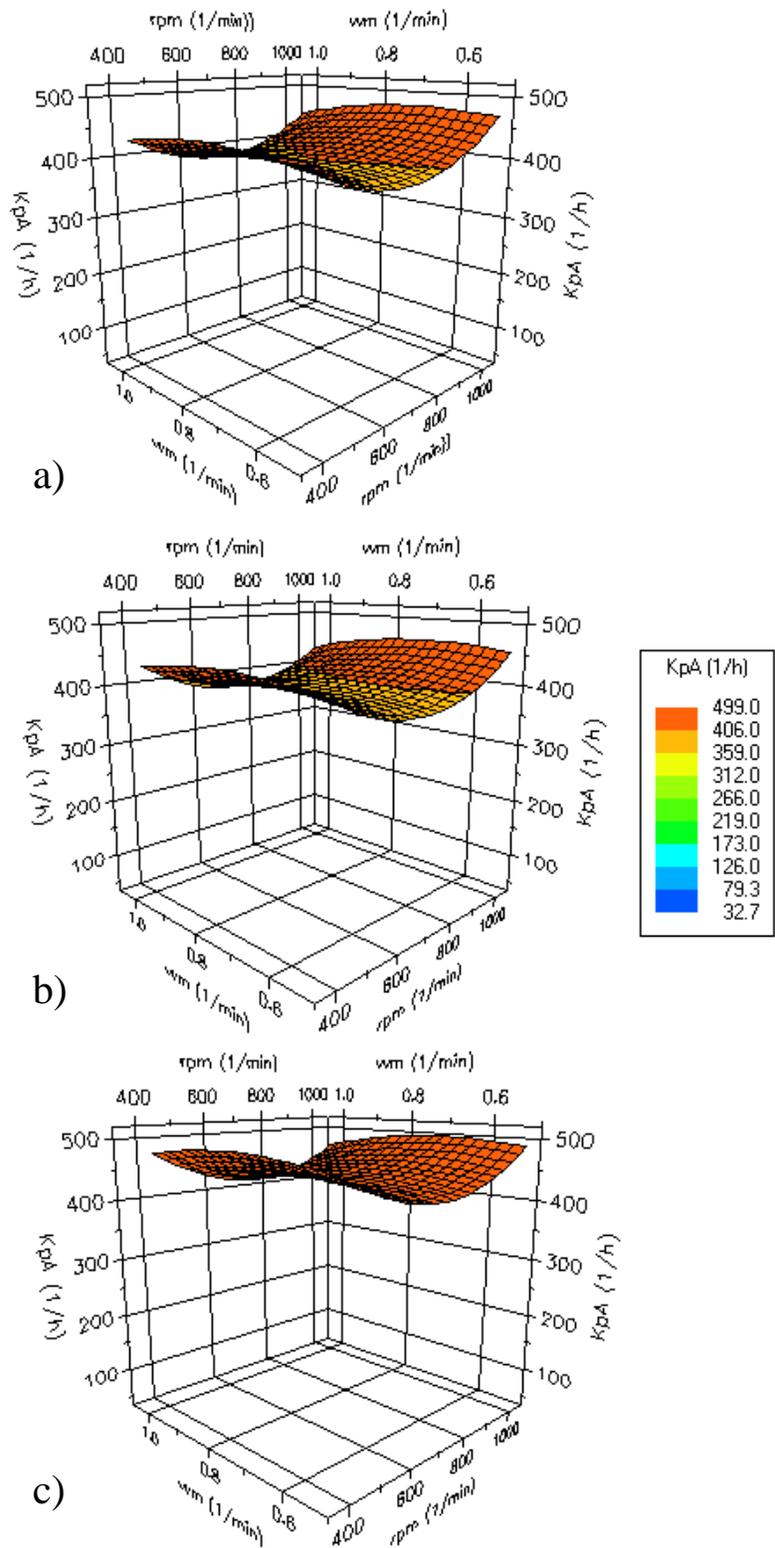


Figura 5.13. K_{pA} obtenidos a diferentes condiciones de operación del reactor, manteniendo la fracción iónica constante 20% y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g_b/L

Como se observa en las cuatro figuras anteriores, el comportamiento de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa para sustrato y producto, fueron muy similares y se vieron modificados principalmente por la fracción iónica. Esto se corrobora con el cuadro de Pareto, donde se muestra que la condición de operación que influyó en los coeficientes volumétricos de transferencia de masa de sustrato y producto fue la fracción dispersa, mientras que las otras tres generaron un efecto muy bajo (Figura 5.14). Este resultado pudo deberse a que al incrementar la fracción iónica, no disminuye el diámetro de gota como se explica en los resultados de d_{32} , pero si aumenta la cantidad de éstas, por lo tanto se incrementa el área volumétrica de transferencia de masa. Cabe mencionar que los coeficientes de transferencia de masa (K_S y K_P) son demasiado pequeños en comparación con el (A) la cual está en función de la fracción dispersa. Por otro lado Srivastava y col. (2000) mencionan que el área (A) de transferencia de masa puede ser modificada disminuyendo el tamaño de gota por medio de la agitación, esta es una estrategia muy usada cuando se presenta limitación por transferencia de masa, sin embargo para proceso a gran escala esto requiere alto consumo de energía y por lo tanto el proceso se hace costoso. Lye y Stuckey (1996) proponen el uso de surfactantes para pre-dispersar la fase no acuosa antes de adicionarla a la fase dispersa, obteniendo con esto tamaños de gota en el orden de magnitud de micrómetros o menores.

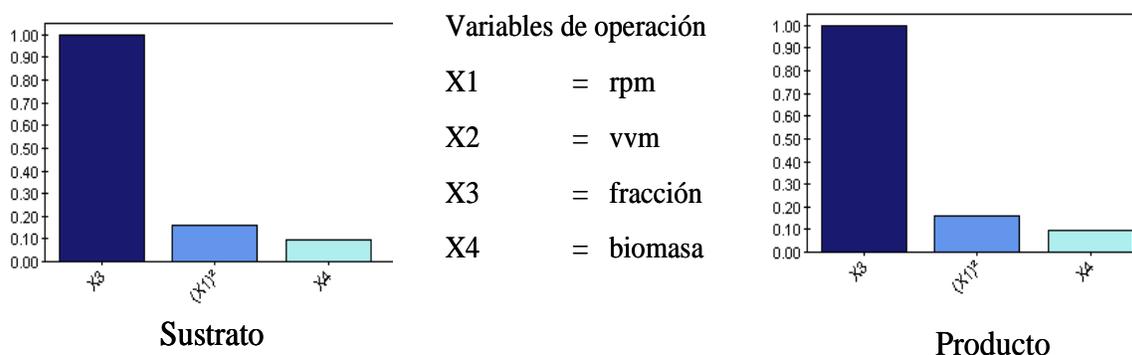


Figura 5.14. Cuadro de Pareto variables de operación más importantes que influyen en los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (K_LA) para sustrato y producto

Comparando los coeficientes de volumétricos de transferencia de sustrato y producto se observa que los coeficientes de transferencia de sustrato se encuentran entre los

valores de 162-2470 h⁻¹, mientras que para los de producto fueron de 32 a 499 h⁻¹. Esta diferencia se debe a las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, como son: los coeficientes de partición entre la fase acuosa y la iónica (hay este tipo de limitación; como mejorarlo) , así como la diferencia de difusividades entre sustrato y producto, sin embargo esta diferencia de coeficientes de transferencia de masa no son un problema limitante en la bioconversión debido a que las concentraciones de inhibición por sustrato y producto son de 2 y 4 g/L respectivamente por lo tanto no se puede producir más de lo que consume.

5.3 Coeficientes volumétricos de transferencia de masa para O₂

Estudios reportados han mostrado que la tasas de transferencia de oxígeno son muy importantes y a veces limitantes aún en biorreactores tipo tanque agitado en muchos procesos biotecnológicos (Daugulis, 1997). Por esta razón se estudiaron los coeficientes volumétricos de transferencia de masa para oxígeno (K_{La}) a las diferentes condiciones de operación (agitación, aireación, fracción iónica y biomasa) en el biorreactor.

En la Figura 5.15 se muestran los valores de K_{La} obtenidos a las diferentes condiciones de operación sin adicionar biomasa y variando la fracción dispersa. En general para los reactores tipo tanque agitado el factor más importante que influye en la transferencia de masa de oxígeno es la agitación y lo mismo ocurre para este sistema. También se observa, que la presencia de fracción dispersa no presentó un aumento en los K_{La} de oxígeno. Para un sistema similar, Torres-Martínez y col. (2009) encontraron que la adición de la fracción dispersa disminuyó los coeficientes de transferencia de oxígeno. Comparando estos resultados con los obtenidos en este trabajo, los órdenes de magnitud de K_{La} son similares, excepto para la fracción dispersa al 5%. Nielsen y col. (2003) encontraron que en un sistema trifásico agua-aire-hexano, la adición de esta última fase dispersa disminuía los K_{La} de oxígeno y estos valores se encuentran muy cercanos a los obtenidos en este trabajo.

En la Figura 5.16 se muestran las mismas condiciones de operación, variando la concentración de biomasa y manteniendo la fracción dispersa constante a 20%.

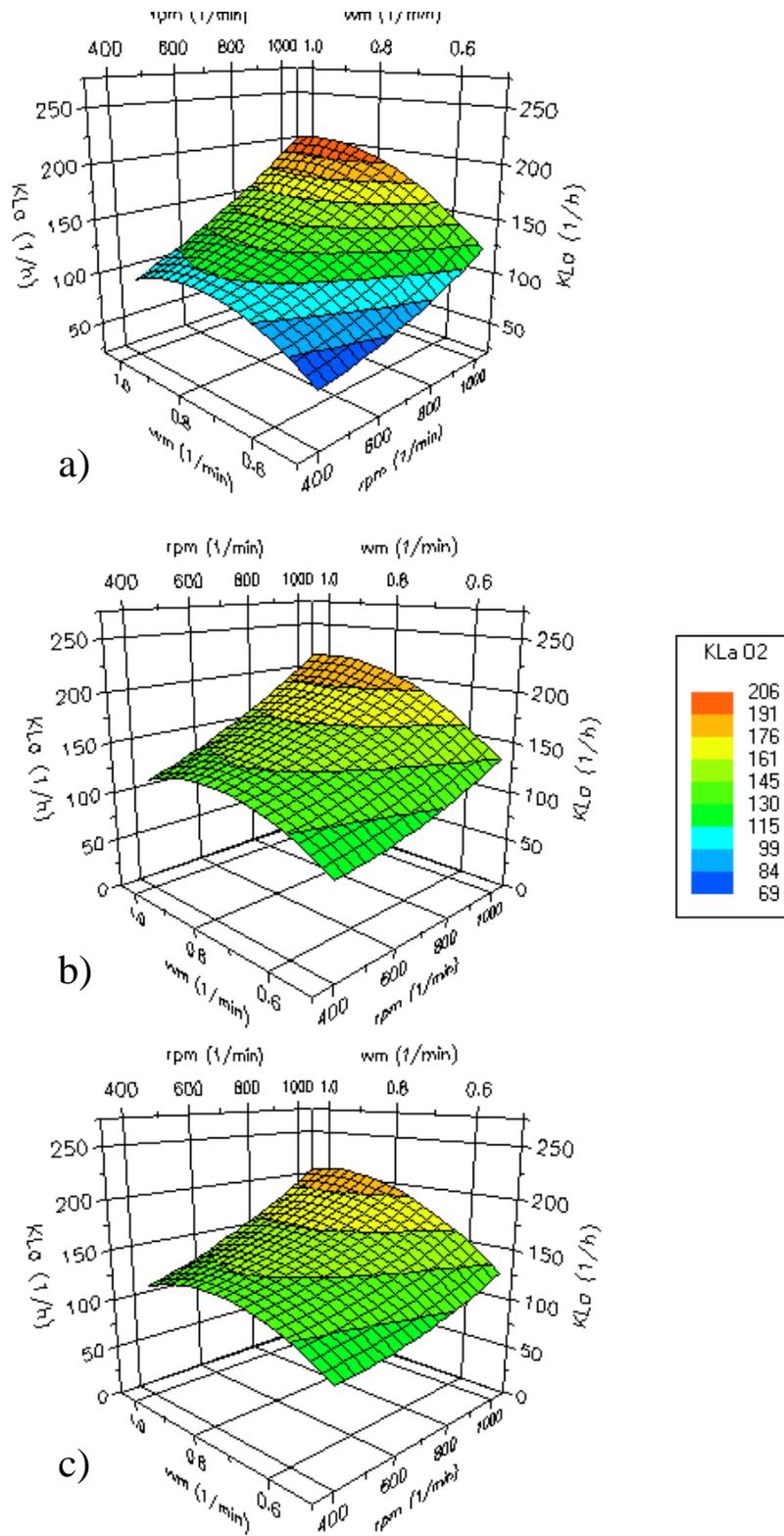


Figura 5.15. K_{La} de oxígeno a diferentes condiciones de operación sin biomasa y variando la fracción dispersa

a) 5, b) 12.5 y c) 20 %

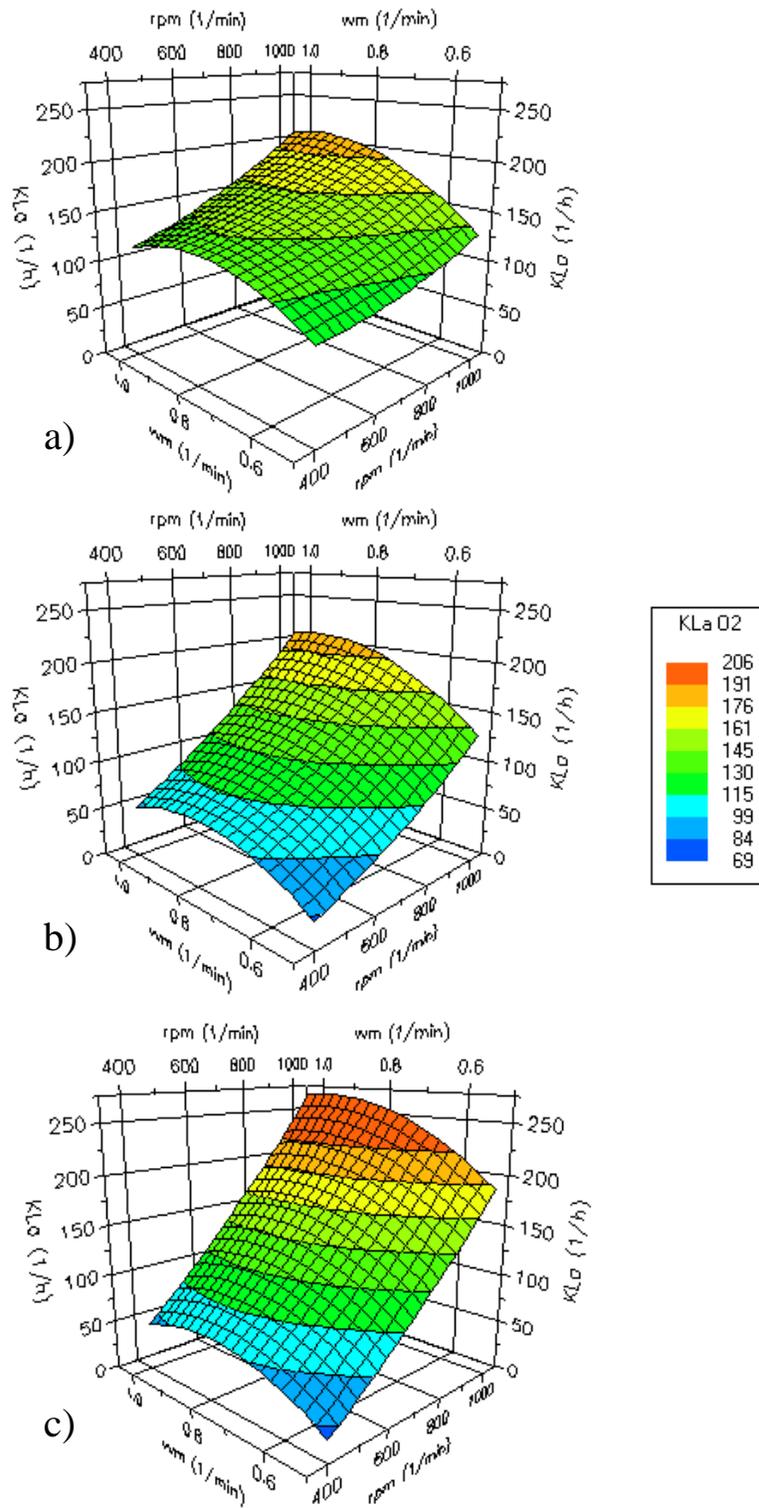


Figura 5.16. K_{La} a diferentes condiciones de operación manteniendo la fracción dispersa constante 20 % y variando la concentración celular: a) 0, b) 2.5 y c) 5 g_b/L

La adición de biomasa al sistema generó un incremento de 50 unidades en el valor de K_La de oxígeno, teniendo un efecto mayor que la fracción dispersa. Probablemente a que la biomasa, disminuyó la tensión superficial y evitando la coalescencia de las burbujas de aire, provocando una menor resistencia de transferencia de oxígeno al medio. Aldric y col. (2009) en un biorreactor de partición de dos fases para un sistema agua-aceite de silicón, encontraron que la biomasa está asociada a un efecto surfactante en fenómenos de transferencia de masa gas-líquido, concluyendo que la presencia de biomasa afecta la coalescencia de la fase dispersa.

Una vez obtenidos los valores experimentalmente para K_La de oxígeno, se usó una correlación empírica propuesta por Nielsen y col. (2003) que relaciona el coeficiente de transferencia de oxígeno con las condiciones de operación para biorreactores de tres fases. En la Figura 5.17 muestran los valores experimentales contra los estimados por el modelo.

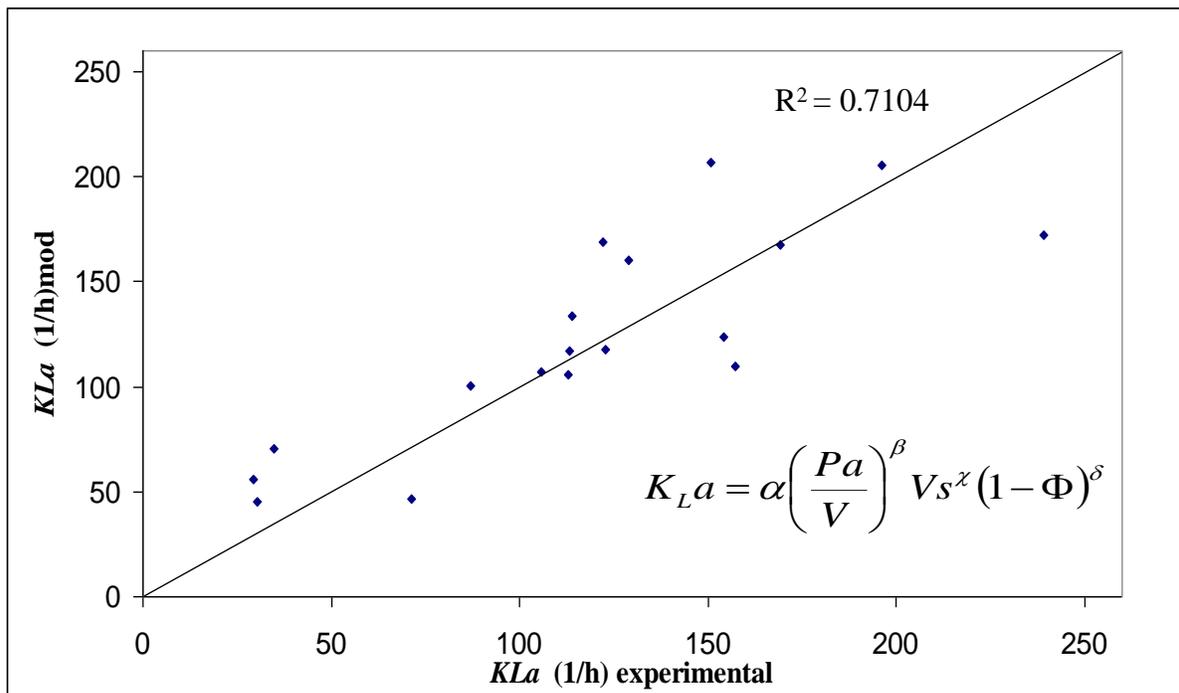


Figura 5.17. Valores experimentales de K_La versus estimados (\blacklozenge) a partir de una correlación empírica propuesta por Nielsen y col. (2003) para un biorreactor de partición de tres fases

Se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.71. Esta correlación no incluye la presencia de la biomasa como una fase adicional, mientras que para este trabajo la presencia de biomasa representó un factor importante que afectó el K_{La} de O_2 .

En la tabla 5.3 se presenta una comparación de estos resultados con otros trabajos que han empleado esta correlación para sistemas trifásicos.

Tabla 5.3. Comparación de los coeficientes del modelo para la estimación de K_{La} de O_2 en sistemas trifásicos propuesta por Nielsen y col. (2003).

Coefficientes	Nielsen y col., 2003 (n-hexadecano)	Melgarejo, 2007. [BMIM][PF ₆]	Torres-Martínez y col., 2009 [MeBuPyr][BTA]	Este trabajo [MeBuPyr][BTA] Con biomasa
β	0.31	0.817	0.815	0.497
χ	0.70	0.756	0.636	0.349
δ	1.70	2.214	2.651	0.283
α	650	0.067	6.88×10^{-3}	708

Moo-Young y Blanch (1981) proponen que en medios de una sola fase dispersa los valores de α y β para sistemas coalescentes son de 0.7 y 0.3, respectivamente. Mientras que para no coalescentes son de 0.4 y 0.5, respectivamente. Se sugiere replantear nuevos coeficientes para sistemas trifásicos con estándares coalescentes y no coalescentes empleando esta correlación empírica, esta correlación podría ser usada en escalamiento para predecir coeficientes de transferencia de oxígeno a diferentes escalas.

5.4 Tasa de consumo de Oxígeno del biocatalizador

La tasa de consumo de oxígeno se estimó en condiciones de mantenimiento celular y en condiciones de reacción a concentraciones de: $[S] = 0.5 \text{ g}_S/\text{L}$ y $[\text{Biomasa}] = 3 \text{ g}_b/\text{L}$. Estos experimentos se realizaron únicamente en fase acuosa, con el fin de estimar las tasas más altas que se pudieran obtener en el reactor y para eliminar otros fenómenos que pudieran afectar la tasa de consumo (mezclado, transferencia de masa). Se realizaron por triplicado partiendo del segundo día de cosecha de las células.

La Figura 5.18 muestra los resultados de las tasas de consumo para mantenimiento celular (sin reacción) y en la bioconversión (con reacción) a una concentración de sustrato de 0.5 g/L.

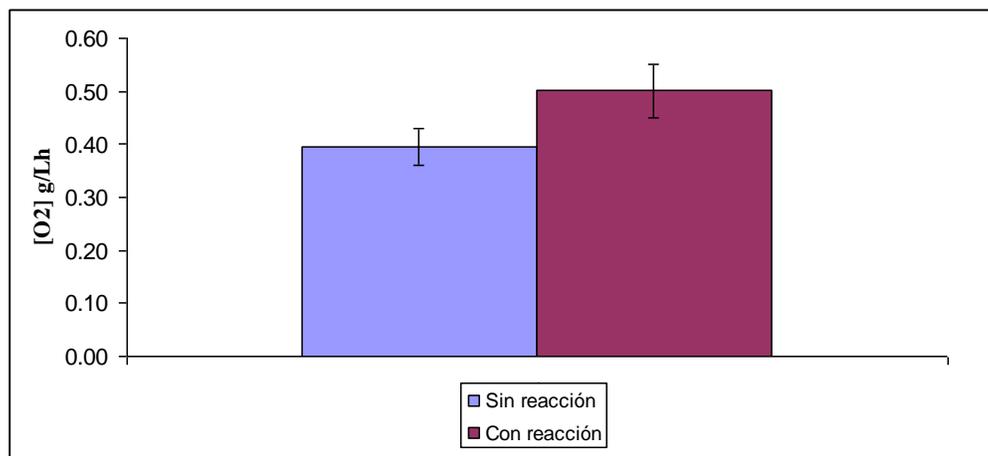


Figura 5.18. Tasa de consumo de O₂ a una concentración celular de 3 g/L en fase acuosa

Se observó un incremento en la tasa de consumo de oxígeno ($20 \pm 0.8 \%$) cuando se adicionó un pulso de sustrato para llevar a cabo la bioconversión (0.5 g/L) para llevar a cabo la bioconversión de éste sustrato a producto. En estos experimentos se generaron los siguientes valores promedio: para mantenimiento de 0.40 ± 0.03 para reacción fue $0.5 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. También se observó que al cuarto día de reacción, el biocatalizador conservó la misma tasa de consumo de mantenimiento más no así la de reacción ya que sólo presentó un incremento del 9 %. Baldwin y Woodley (2006) reportan que esta cepa presenta una pérdida de actividad enzimática a las 450 horas de reacción; sin embargo, no reportan datos sobre su conservación.

La tasa específica de consumo de oxígeno se estimó dividiendo la tasa de consumo de O₂ sobre la concentración celular empleada, como se indica en la ecuación (5.4.1):

$$\mathfrak{R}_{O_2} = 0.5 \frac{\text{g}_{O_2}}{\text{Lh}} \quad (5.4.1)$$

$$r_{O_2} = \frac{0.5 \frac{g_{O_2}}{Lh}}{3 \frac{g_b}{L}} = 0.166 \frac{g_{O_2}}{g_b h} \quad (5.4.2)$$

Es difícil comparar estos resultados con otros reportados en la literatura, debido a los diferentes sistemas geométricos empleados, así como las técnicas con las que se midió la tasa de consumo de oxígeno. Sin embargo, todos se encuentran en un orden de magnitud similar. Los valores obtenidos en este trabajo son más bajos a los que se reportan, probablemente esto se debe a que por ser una cepa modificada genéticamente podría disminuir la expresión de la enzima CHMO en la Tabla 5.4 muestra la comparación de los resultados de este trabajo con los reportados, para facilitar el análisis de los resultados se transformaron de $g_{O_2} L^{-1} h^{-1}$ a $mmol L^{-1} h^{-1}$.

$$\mathfrak{R}_{O_2} = 0.5 \frac{g_{O_2}}{Lh} \left(\frac{mol}{32 g_{O_2}} \right) = 0.015 \frac{mol}{Lh} \left(\frac{1000 mmol}{1 mol} \right) = 15.62 \frac{mmol O^2}{Lh}$$

Tabla 5.4. Comparación de tasas de consumo de oxígeno con los reportados en la literatura

Trabajo	\mathfrak{R}_{O_2} ($mmol g_{O_2} L^{-1} h^{-1}$)	Condiciones
Doig y col. (2002)	38	Micro pozos de 2 mL aereación superficial, 1000 rpm y $5 g_b L^{-1}$
Este trabajo	15.62	Reactor de 20 mL, agitación constante y aireación por difusor y $3 g_b L^{-1}$

5.5 Tasa de consumo de sustrato por el biocatalizador

Doig y col. (2001) reportan problemas de inhibición por sustrato y producto para esta reacción. Por lo que se estudió la tasa de consumo de sustrato en fase acuosa a diferentes concentraciones de sustrato (0 a $2 g_s L^{-1}$) y $3 g_b L^{-1}$ de biomasa, para encontrar en que concentración de sustrato se encuentra la tasa de consumo máxima de éste por el biocatalizador.

La figura 5.19 muestra el comportamiento de la tasa de consumo de sustrato a diferentes concentraciones de éste y los estimados por el modelo modificado propuesto por Aiba y col. (1968) (*Ver (4.8.1)*). Se usó una regresión no lineal con el algoritmo Levenberg-

Marquardt y el software NCSS 2007. Las tasas de consumo de sustrato se estimaron a partir de las tasas de formación de producto empleando el rendimiento estequiométrico entre sustrato y producto. El modelo presentó un coeficiente de correlación ($R^2 = 0.84$) y la tasa máxima de consumo de sustrato se obtuvo a una concentración de 0.3 g s L^{-1} de sustrato que fue de $0.093 \text{ g s L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

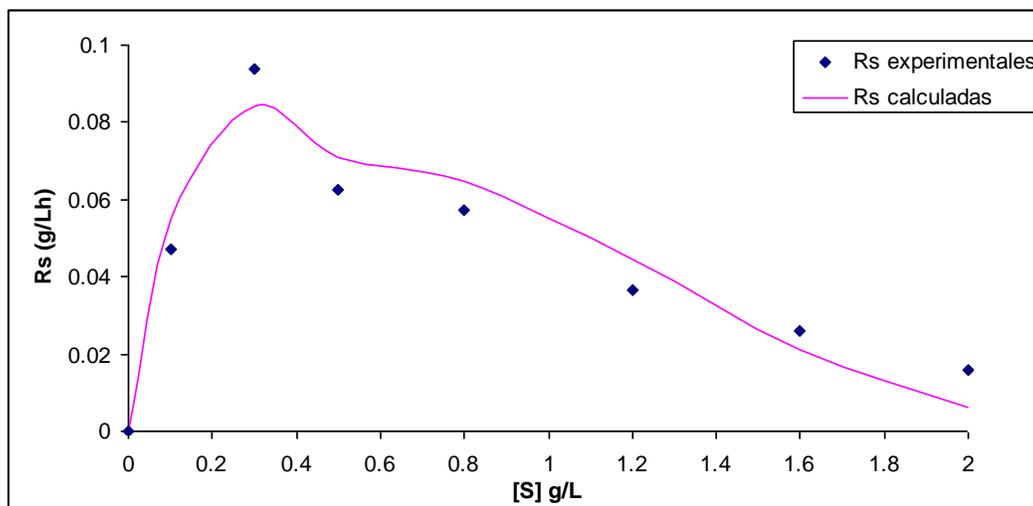


Figura 5.19. Tasa de consumo de sustrato experimental y estimada por el modelo modificado de Aiba y col. (1968) en función de la concentración de sustrato.

La tasa específica de consumo de sustrato se calculó dividiendo la \mathfrak{R}_s entre los gramos de biomasa, $3 \text{ g}_b \text{ L}^{-1}$.

$$r_s = \frac{\mathfrak{R}_s}{[Biomasa]} = \frac{0.093 \frac{\text{g}_s}{\text{Lh}}}{3 \text{ g}_b / \text{L}} = 0.031 \frac{\text{g}_s}{\text{g}_b \text{ h}}$$

En la tabla 5.5 se muestra la tasa de consumo de sustrato y los parámetros cinéticos estimados por el modelo.

Tabla 5.5. Resultados experimentales y estimados por el modelo modificado de Aiba y col. (1968) de la cinética de consumo de sustrato

Valores	$r_s \text{ (g}_s/\text{g}_b\text{h)}$	$\mathfrak{R}_s \text{ (g}_s/\text{Lh)}$	$K_i \text{ (g}_s/\text{L)}$	$K_S \text{ (g}_s/\text{L)}$
Experimentales	0.031	0.093	--	--
Estimados	0.030	0.084	3.1	0.045

Comparando estos resultados con los obtenidos por Baldwin y Woodley (2006) para el mismo biocatalizador (Tabla 5.6), se observa que en este trabajo las tasas de consumo de sustrato son demasiado bajas, probablemente debido a una pérdida de expresión de la célula sobre la enzima CHMO y/o la diferencia en el medio de crecimiento usado.

Tabla 5.6. Comparación de tasas específicas de consumo de sustrato con los reportados en la literatura.

Trabajo	r_s (gs/g _b h)	Condiciones
Baldwin y Woodley (2006)	0.65	Matraz de 1L, 200 mL, 200 rpm, 37 °C y 2 g _b L ⁻¹
Este trabajo	0.031	Reactor 20 mL, agitación constante y aireación por difusor con 3 g _b L ⁻¹

5.6 Determinación de los tiempos característicos de los mecanismos estudiados

5.6.1 Tiempo característico de mezclado (τ_m)

El tiempo de mezclado se definió como el transcurrido desde la adición de la alicuota hasta que el reactor alcanzó el 95 % de homogeneidad en función de un pH inicial a uno final.

Dando como unidades de tiempo (s), por lo tanto se considera para éste como:

$$t_m = \tau_m \quad (5.6.1.1)$$

Los tiempos de mezclado obtenidos para el sistema trifásico (agua-líquido iónico-gas) estuvieron en un intervalo de tiempo que fueron de 4 a 6 segundos.

Entonces:

$$\tau_m = 4 - 6s$$

5.6.2 Tiempo característico derivado del coeficiente de transferencia de sustrato (τ_{KsA})

Los coeficientes de transferencia de masa se definen como una velocidad de transferencia de masa por unidad de volumen:

$$K_{LA} [=] \frac{m}{s} \left(\frac{m^2}{m^3} \right) [=] s^{-1}$$

Para representar los tiempos característicos de los mecanismos de transferencia de masa en unidades de tiempo se obtuvo la inversa de los K_sA de sustrato.

$$\tau_{K_sA} = \frac{1}{K_sA} \quad (5.6.2.2)$$

El intervalo de los valores mínimos de los coeficientes de transferencia de masa para sustrato obtenidos en s^{-1} (Figuras 5.10 y 5.11) para 2404 y 392 h^{-1} fueron de 0.66 a 0.045 s^{-1} , respectivamente. Por lo tanto, los tiempos característicos para los coeficientes de transferencia de masa de sustrato son:

$$\tau_{K_sA} = \frac{1}{K_sA} = \frac{1}{0.66s} = 1.49s$$

$$\tau_{K_sA} = \frac{1}{K_sA} = \frac{1}{0.045} = 22.22s$$

Finalmente, el intervalo de los tiempos característicos fue:

$$\tau_{K_sA} = 1.49 - 22.22s$$

5.6.3 Tiempo característico derivado del coeficiente de transferencia de producto (τ_{K_pA})

Los tiempos característicos se calcularon de forma similar a los tiempos característicos para los coeficientes de transferencia de masa para sustrato. Donde el intervalo de los valores mínimos de los coeficientes de transferencia de masa para producto obtenidos en s^{-1} (Figuras 5.12 y 5.13) para 406 y 81 h^{-1} fue de 0.13 a 0.022 s^{-1} , respectivamente.

El cálculo de los tiempos característicos para los coeficientes de transferencia de masa de producto son:

$$\tau_{K_pA} = \frac{1}{K_pA} = \frac{1}{0.022s} = 44.13s$$

$$\tau_{K_pA} = \frac{1}{K_pA} = \frac{1}{0.13s} = 7.40s$$

El intervalo de los tiempos característicos para los coeficientes de transferencia de producto es:

$$\tau_{K_pA} = 7.40 - 44.13s .$$

5.6.4 Tiempo característico derivado del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (τ_{KLa})

De forma similar para los coeficientes de transferencia de masa para oxígeno, el intervalo de los valores mínimos de los coeficientes de transferencia de masa para oxígeno obtenidos en s^{-1} (Figuras 5.15 y 5.16) para 275 y 28 h^{-1} fueron de 0.076 a 0.0077 s^{-1} , respectivamente.

El cálculo de los tiempos característicos para los coeficientes de transferencia de masa de oxígeno son:

$$\tau_{KLa} = \frac{1}{KLa} = \frac{1}{0.076s} = 13s$$

$$\tau_{KLa} = \frac{1}{KLa} = \frac{1}{0.0077s} = 128.57s$$

El intervalo de los tiempos característicos para los coeficientes de transferencia de oxígeno es:

$$\tau_{KLa} = 13.00 - 128.57s$$

5.6.5 Tiempo característico derivado de la tasa de consumo de O_2 ($t_{c_{\mathfrak{R}_{O_2}}}$)

El tiempo característico para el mecanismo de la tasa de consumo de oxígeno se estimó como la concentración máxima de saturación presente en el biorreactor sobre la tasa específica de consumo de oxígeno, dando como resultado unidades de tiempo:

$$\tau_{\mathfrak{R}_{O_2}} = \frac{[O_2^*]}{\mathfrak{R}_{O_2}} \quad (5.6.5.1)$$

Donde:

$\tau_{\mathfrak{R}_{O_2}}$ es el tiempo característico de consumo de oxígeno por el biocatalizador

$[O_2^*]$ es la concentración inicial de saturación de oxígeno en el biorreactor

\mathfrak{R}_{O_2} es la tasa de consumo de oxígeno por el catalizador

El tiempo característico es:

$$\tau_{\mathfrak{R}_{O_2}} = \frac{[O_2^*]}{\mathfrak{R}_{O_2}} = \frac{0.0072 \text{ g}_{O_2}/L}{0.5 \text{ g}_{O_2}/Lh} = 0.0144h = 51.84s$$

5.6.6 Tiempo característico derivado de la tasa de consumo de sustrato ($\tau_{\mathfrak{R}_s}$)

A partir de la tasa de consumo de sustrato se estimó el tiempo característico para este mecanismo, se definió como: la concentración máxima o inicial de sustrato presente en el biorreactor sobre la tasa de consumo de sustrato:

$$\tau_{\mathfrak{R}_s} = \frac{[S_o]}{\mathfrak{R}_s} \quad (5.6.6.1)$$

Donde:

$\tau_{\mathfrak{R}_s}$ es el tiempo característico de consumo de sustrato por el biocatalizador

$[S_o]$ es la concentración inicial sustrato en la fase acuosa en el reactor

\mathfrak{R}_s es la tasa de consumo de sustrato por el catalizador

El tiempo característico es:

$$\tau_{\mathfrak{R}_s} = \frac{[S_o]}{\mathfrak{R}_s} = \frac{0.3 \text{ g}_s/L}{0.093 \text{ g}_s/Lh} = 3.22h = 11612.90s$$

5.6.7 Resumen de los tiempos característicos obtenidos del análisis de régimen

Finalmente, una vez realizado el análisis de régimen estudiando los seis mecanismos propuestos como posibles fenómenos que pudieran ser limitantes de la biorreacción desarrollada en un biorreactor de partición de tres fases, en la Tabla 5.7 se muestran los mecanismos estudiados, el análisis dimensional para obtener los tiempos característicos de estos mecanismos así como la forma en que fueron definidos.

Tabla 5.7. Tiempos característicos de los mecanismos estudiados en el análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases

Mecanismo de mezclado			
Mecanismo	Definición	Unidades	τ (s)
Tiempo de mezclado	t_m	S	4-6
Mecanismos de transferencia de masa			
Coefficientes volumétricos de transferencia de sustrato	$\frac{1}{K_s A}$	$\frac{1}{s^{-1}}$	1.49 – 22.22
Coefficientes volumétricos de transferencia de producto	$\frac{1}{K_p A}$	$\frac{1}{s^{-1}}$	7.40 – 44.13
Coefficientes volumétricos de transferencia oxígeno	$\frac{1}{K_L a}$	$\frac{1}{s^{-1}}$	13– 128.57
Parámetros de bioconversión			
Consumo de oxígeno	$\frac{[O^*]}{\mathfrak{R}_{O_2}}$	$\frac{g_{O_2}/L}{g_{O_2}/L \cdot s}$	51.84
Consumo de sustrato	$\frac{[S_o]}{\mathfrak{R}_s}$	$\frac{g_s/L}{g_s/L \cdot s}$	11612.90

5.7 Determinación de la etapa limitante del sistema

En la tabla 5.7 se observa que el mecanismo que tiene el tiempo característico más grande es el de la tasa de consumo de sustrato en aproximadamente dos órdenes de magnitud, lo cual significa que el proceso está limitado por reacción y no por las condiciones de operación del reactor. De acuerdo a los datos reportados con la misma cepa, la tasa específica de consumo de sustrato (ver Tabla 5.6) es casi 21 veces menor que la reportada por Baldwin y Woodley (2006) posiblemente debido al medio de cultivo

empleado para crecer la cepa, tomando en cuenta estos datos el proceso estaría limitado sólo en un orden de magnitud. Otra alternativa es aumentar la cantidad de biocatalizador; sin embargo, un análisis de sensibilidad realizado por Law y col. (2006) también con la misma cepa, demostró que al aumentar la cantidad de biocatalizador el transporte de oxígeno se vuelve la etapa limitante. Esto concuerda con los datos obtenidos en este trabajo al analizar los tiempos característicos de la tasa de transferencia de masa y la tasa de consumo de oxígeno. Se observa que el tiempo característico de este último parámetro se encuentra dentro de los tiempos característicos de la tasa de transferencia de oxígeno, esto podría provocar una deficiencia en la transferencia de oxígeno al biocatalizador.

Comparando este análisis de régimen con la literatura, Oosterhuis (1984) realizó un análisis de régimen para la producción de ácido glucónico en un escalamiento descendente de 25 m³ y encontró que los tiempos característicos de transferencia de oxígeno, el tiempo de circulación de líquido y la tasa de consumo de oxígeno por el biocatalizador se encontraban en el mismo orden de magnitud, dando como resultado posibles limitaciones y gradientes de oxígeno dentro del biorreactor.

6. CONCLUSIONES

En el análisis de régimen en un biorreactor de partición de tres fases mediante la comparación de los tiempos característicos de los mecanismos estudiados se observaron diferentes magnitudes, estos resultados presuponen que dichos mecanismos tienen diferentes tasas de cambio o transición en el proceso.

El mezclado presentó el tiempo característico más corto (4-6 s), mientras que para el mecanismo de la tasa de consumo de sustrato se observó el tiempo más largo (11612 s) siendo este la etapa limitante del proceso, para futuros estudios se requiere un biocatalizador más activo. Este resultado permite observar que el biorreactor de partición estudiado utilizando un líquido iónico presentó un buen desempeño con respecto a los requerimientos de suministro de sustrato para la bioconversión estudiada.

Por otro lado comparando los tiempos característicos de los mecanismos de transporte (13-128.57 s) y consumo de oxígeno (54.21 s) estos se encuentran en el mismo orden de magnitud, lo que implica que la transferencia de oxígeno pudiera ser una etapa limitante del proceso tomando como criterio el coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 . Por lo tanto, es importante encontrar las condiciones de operación del reactor que mantenga un suministro de oxígeno adecuado al biocatalizador.

La identificación del mecanismo limitante de la bioconversión desarrollada en este trabajo no solamente generó información importante para el mejor desempeño de este tipo de biorreactor en la producción de lactonas en reacciones del tipo Baeyer-Villiger, si no también promete en futuros trabajos ser un criterio para el escalamiento descendente en esta clase de reactores.

El análisis de régimen, mediante los tiempos característicos permitió la clasificación cualitativa y cuantitativa de los diferentes mecanismos que intervienen y pueden limitar la bioconversión llevado a cabo en un biorreactor de partición de tres fases.

7. RECOMENDACIONES

Debido a que la tasa de consumo de sustrato presentó el tiempo característico más largo en comparación con los otros mecanismos estudiados, resultando la etapa limitante del proceso, se hacen las siguientes recomendaciones:

1. Propagar el inóculo en medio rico para mejorar el proceso de inducción de la enzima CHMO.
2. Estudiar el efecto del incremento de la concentración del biocatalizador en el medio de reacción.
3. Solicitar a la colección del “University College London” la nueva cepa de *E.coli* que es 10 veces más activa.

Teniendo en mente que al incrementar la productividad del catalizador, el consumo de oxígeno será mayor, es necesario obtener tasas de transferencia de oxígeno más elevadas, es decir incrementar el K_{La} para evitar ausencia de éste en la bioconversión.

Se sugiere realizar un análisis dimensional, para obtener una correlación que involucre las condiciones de operación manejadas en este sistema, con el fin de obtener un mejor ajuste y una predicción más exacta de los coeficientes de transferencia de masa para O_2 en función de las condiciones de operación del biorreactor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aiba S., Shoda M. and Nangatani M. 1968. Kinetics of production Inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 10: 845-864.
2. Aldric J. M., Gillet S., Delvigne F., Blecker C., Lebeau F., Wathélet J., Manigat G. and Thonart P. 2009. Effect of surfactants and biomass on the gas/liquid mass transfer in an aqueous-silicone oil two-phase partitioning bioreactor using *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to remove VOCs from gaseous effluents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Volume 84(9): 1274-1283.
3. Alphand V., Carrea G., Wohlgemuth R., Furstoss R. and Woodley J. M. 2003. Towards large-scale synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 21(7): 318-323.
4. Amaral P., Freire M. G., Rocha-Lea M. H. Marrucho I. S., Coutinho A. P. and Coelho M. A. 2008. Optimization of Oxygen Mass Transfer in a Multiphase Bioreactor with Perfluorodecalin as a Second Liquid Phase. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 99(3): 588-598.
5. Badino A., Facciotti M. C. and Schmidell W. 2000. Improving k_{LA} determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. *J Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol. 75: 469-474.
6. Baganz F. 2007. Notas de curso "Rapid fermentation process design". UCL, Reino Unido.
7. Baker, S. N., McCleskey T. M., Pandey S. y Baker G. A. 2004. Fluorescence studies of protein thermostability in ionic liquids. *Chem. Commun.*, 940-941.
8. Baldwin C. F and Woodley J. 2006. On Oxygen Limitation in a Whole Cell Biocatalytic Baeyer-Villiger Oxidation Process. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 95(3): 362-369.
9. Bennett D., Kastenber W. and Mckone T. 1999. General Formulation of Characteristic Time for Persistent Chemicals in a Multimedia Environment. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 33: 503-509.
10. Beronvič M. and Nienow A. W., 2006. Biochemical Engineering Principles. Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubjana, Slovenia.

11. Bird B., Stewart W., Lightfoot E. 1992. Fenómenos de transporte. Ed. Reverté. Barcelona España. pp 4-19.
12. Biswas R. K., Habib M. A. and Mondal M.G.K. 2004. Kinetics of stripping of VO–D2EHPA complex from toluene phase by aqueous sulphate–acetate solution. Comparison of Lewis and Hahn cells. *Hydrometallurgy*, Vol. 73: 257–267.
13. Bruce L. J. and A. J. Daugulis. 1991. Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the use of solvent mixtures. *Biotechnology Letters*, Vol. 14(1): 71-76.
14. Çelik D., Bayraktar E. and Mehmetođglu U. 2004. Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 17: 5–13.
15. Collins L. D. and Daugulis A. J. 1997. Characterization and optimization of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol. *Appl. Microbiol Biotechnol.* Vol. 48: 18–22.
16. Collins L. D. and Daugulis A. J. 1999. Simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application. *Biotechnol Prog.* Vol. 15: 74–80.
17. Cull S. G., Holbrey J. D., V. Vargas-Mora, Seddon K. R., Lye G. J. 2000. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 69: 227 – 233.
18. Daugulis A. J. 1997. Partitioning bioreactors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol. 8: 169–174.
19. Devine D., Shah Y.T. and Morsi B. 1995. Liquid phase axial mixing in a bubble column with viscous non-Newtonian liquids. *Can. J. Chem. Eng.* 63: 195-201.
20. Doig S., O’Sullivan M., Patel S. and Ward J. 2001. Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 28: 265–274.
21. Doig S., Pickering S., Lye G. J. and Woodley J. 2002. The use of microscale processing technologies for quantification of biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 80(1): 42-49.
22. Doig S. D., Simpson H.V., Alphand G., Furstoss R. and Woodley J. M. 2003. Characterization of a recombinant *Escherichia coli* TOP10 [pQR239] whole-cell

- biocatalyst for stereoselective Baeyer–Villiger oxidations. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 32: 347–355.
23. Domínguez de María, P. 2008. “Nonsolvent” Applications of Ionic Liquids in Biotransformations and Organocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 47: 6960 – 6968.
 24. Eldridge R.B., Booth-McGee S. and Turpin J. L. 1989. Application of traditional mass-transfer algorithms to a bioextraction process. *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 28: 1868–73.
 25. Erbedinger, M., Mesiano, A. J. and Russel A. J. 2000. Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid - An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 16: 1129 – 1131.
 26. Fuchs R., Dewey D. and Humphrey A. 1971. Effect of Surface Aeration on Scale-Up Procedures for Fermentation Processes. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop.*, Vol. 10(2): 190-196.
 27. Galaction A. I., Dan Cascaval C. and Turnea O. M. 2004. Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. Simulated fermentation broths. *Bioprocess Biosyst Eng.* Vol. 26: 231–238.
 28. Galindo E, Andrzej W., Pacek G., Nienow A. 2000. Study of Drop and Bubble Sizes in a Simulated Mycelial Fermentation Broth of Up to Four Phases *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 69(2): 213-221.
 29. Garikipati J. B., McIver A. M. and Peebles T. L. 2009. Whole-Cell Biocatalysis for 1-Naphthol Production in Liquid-Liquid Biphasic Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75(20): 6545–6552.
 30. Gomes N., Aguedo M., Teixeira J. and Belo I. 2007. Oxygen mass transfer in a biphasic medium: Influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 35: 380–386.
 31. Hadjiev D., Sabiri E. N. and Zanati A. 2006. Mixing time in bioreactors under aerated conditions. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 27: 323-330.
 32. Hilker I., Baldwin C., Alphand V., Furstoss R., Woodley J. and Wohlgemuth R. 2006. On the Influence of Oxygen and Cell Concentration in an SFPR Whole Cell

- Biocatalytic Baeyer–Villiger Oxidation Process. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93(6): 1138-1144.
33. Jiménez-Cisneros B. 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Ed. Limusa. Instituto de Ingeniería de la UNAM. p. 133.
 34. Kamerbeek. N. Janssen B. van Berkel J. H. Fraaije M. Baeyer-Villiger monooxygenases, an emerging family of flavin-dependent biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.*, 2003, 6+7: 1-12.
 35. Kawase Y., Shimizu K., Bakker, A. 1997. Hydrodynamics in three-phase stirred tank reactors with non-newtonian fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36: 270-276.
 36. Kragl U., Kaftzik N., Schofer S. and Wasserscheid P. 2004. US2004/ 0096932A1.
 37. Law H.E.M., Baldwin C.V.F., Chen B.H. and Woodley. 2006. Process limitations in a whole-cell catalysed oxidation: Sensitivity analysis. *Chemical Engineering Science*, Vol. 61: 6646-6652.
 38. Lee J.Y., Cho H.J., Baek K. and Yang J.W. 2005. Mass Transfer of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a two-liquid-phase system. *Journal of Environmental Science and Health part a-toxic/hazardous substances & environmental engineering*, Vol. 40(3): 509-519.
 39. Li Z., van Beilen J.B., Duetz W.A., Schmid A., De Raadt A., Griengl H. and Witholt B. 2002. Oxidative biotransformations using oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, Vol. 6(2):136–144.
 40. Lovick J., Mouza A., Paras S. V., Lye G. J. and Angeli P. 2005. Drop size distribution in highly concentrated liquid–liquid dispersions using a light back scattering method. *J Chem Technol Biotechnol*, Vol. 80: 545–552.
 41. Lye G. J., Stuckey D. C. 1996. Predispersed solvent extraction of microlide antibiotics using colloidal liquid aphrons. Shallcross DC, Paimin R, Prvcic LM, editors. *Proceedings of the International Solvent Extraction Conference*, Melbourne, Australia. 1399–1405.
 42. MacFarlane D. R. and Seddon K R. 2007. Ionic Liquids—Progress on the Fundamental Issues. *Australian Journal of Chemistry* 60(1) 3–5.

43. Madeira L., Van Rantwijk F., Seddon K. R. and Sheldon R. 2002. Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. *Org. Lett.* Vol. 2(26): 4189–4191.
44. Magnuson, D. K., Bodley J. W., Evans D. F. 1984. Protein crystallisation - Ionic Liquids. *J. Solution Chem.*, Vol. 13: 583 – 587.
45. Malinowski J. J., 2001. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. *Biotechnology Advances*, Vol. 19: 525–538.
46. Melgarejo R. 2007. Modelamiento matemático de un biorreactor de tres fases. Tesis de Especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana.
47. Moo-Young M. and Blanch H. W. 1981. Design of biochemical reactors. Mass transfer criteria for simple and complex systems. *Adv. Biochem. Eng.*, Vol. 19: 1–69.
48. Nielsen D. R., Daugulis A. D., McLellan P. J. 2003. A Novel Method of Simulating Oxygen Mass Transfer in Two Phase Partitioning Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 83(6): 735-742.
49. Nielsen D. R. and Prather K. R. 2008. Recovery in situ product of *n*-butanol using polymeric resins. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102(3): 811-821.
50. Niemczewska J., Cierpiszewski R. and Szymanowski J. 2004. Mass transfer of zinc(II) extraction from hydrochloric acid solution in the Lewis cell. *Desalination*, 169-177.
51. Oosterhuis, N. M. G. 1984. PhD Thesis, Delft University of Technology.
52. Pfruender H., Amidjojo M., Kragl U. and Weuster-Botz D. 2004. Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. *Angew. Chem. Int.* Vol. 43: 4529 –4531.
53. Rehmann A. and J. Daugulis. 2007. Biodegradation of biphenyl in a solid–liquid two-phase partitioning bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 36: 195–201.
54. Reyes Ávila, J. A., Almaraz Abarca, N., Herrera Corral J. y Naranjo Jiménez N. 1999. Efecto Letal y sub letal de lactonas sobre la garrapata del ganado *Boophilus annulatus* say. *Veterinaria México*, Vol. 30(4): 281-284.
55. Rocha Rios J., Bordel S., Hernández S. and Revah S. 2009. Methane degradation in two phase partition bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 152: 289–292.

56. Saje L. and Vunjak-Novakovic G. 2000. Extractive bioconversion in a four-phase external-loop airlift bioreactor. *AIChE J.*, Vol. 46: 1368–75.
57. Shimazawa R., Nagai N. Toyoshima S. and Okuda H. 2008. Present State of New Chiral Drug Development. and Review in Japan. *Journal of Health Science*, 54(1) 23–29.
58. Srivastava P., Hahr O., Buchholtz R. and Worden R.M. 2000. Enhancement of mass transfer using colloidal liquid aphrons: measurements of mass transfer coefficients in liquid–liquid extraction. *Biotechnol Bioeng.*, Vol. 70: 525–32.
59. Straathof, A.J.J., Panke, S., Schmid, A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol. 13: 548–556.
60. Sweere A. P. J., Luyben K.Ch.A.M. and Kossen N.W.F. 1987. Regime analysis and scale-down: Tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 9: 386-398.
61. Treybal R. E., Sherwood T., Pigford P.L., Wilke C.R. 1963. *Mass Transfer*. Mc Graw Hill.
62. Torres-Martínez D., Melgarejo-Torres R., Gutiérrez-Rojas M., Aguilera-Vázquez C., Micheletti M., Lye G. L. and Huerta-Ochoa S. 2009. Hydrodynamic and oxygen mass transfer studies in a three-phase (air–water–ionic liquid) stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 45(3): 209-217.
63. Turfitt, G.E. (1948). Microbiological degradation of steroids IV. Fission of the steroid molecule. *Biochemical Journal*, Vol. 42: 376-383.
64. Van 't Riet and Tramper J. 1991. *Basic Bioreactor Design*, Ed. Marcel Dekker, New York.
65. Walton A. Z., Stewart J. D. 2004. Understanding and improving NADPH dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Prog.* Vol. 20(2):403-11.
66. Westgren, A. 1972. *Nobel – The Man and His Prizes*, ed. Odelberg, W. Elsevier, New York, pp. 279-385.
67. Willetts J. 1997. Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Trend. Biotechnol.*, Vol. 15: 55-62.

68. Wright J. C., Hu T, McLachlan J. L., Needham J. and Walter J. A. 1996. Biosynthesis of DTX-4: confirmation of a polyketide pathway, proof of a Baeyer-Villiger oxidation step, and evidence for an unusual carbon deletion process. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118: 8757– 8758.
69. Yang Z. and Pang W. 2005. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 37: 19-28.
70. Yeom S. H. and Daugulis A. J. 2001. A two phase partitioning bioreactor system for treating benzene-contaminated soil. *Biotechnology Letters*. 23. 467-473.
71. Zambianchi F., Pasta P., Carrea G., Colonna S., Gaggero N., Woodley J. M. 2002. Use of isolated cyclohexanone monooxygenase from recombinant *Escherichia coli* as a biocatalyst for Baeyer- Villiger and sulfide oxidations. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 489–496.
72. Zill D. 1997. *Differential equations with Modelling Applications*. Ed. Brooks/Cole. New York.

ANEXOS

ANEXO I Curva de calibración para la cuantificación de biomasa

Con la densidad óptica y el peso seco se obtuvo una curva de calibración de biomasa (g_b/L) vs densidad a 650 nm, con un coeficiente de correlación de $R^2=0.9927$. La curva se empleó para determinar la concentración celular (g_b/L) en las fermentaciones, los experimentos de hidrodinámica en el reactor y las biotransformaciones.

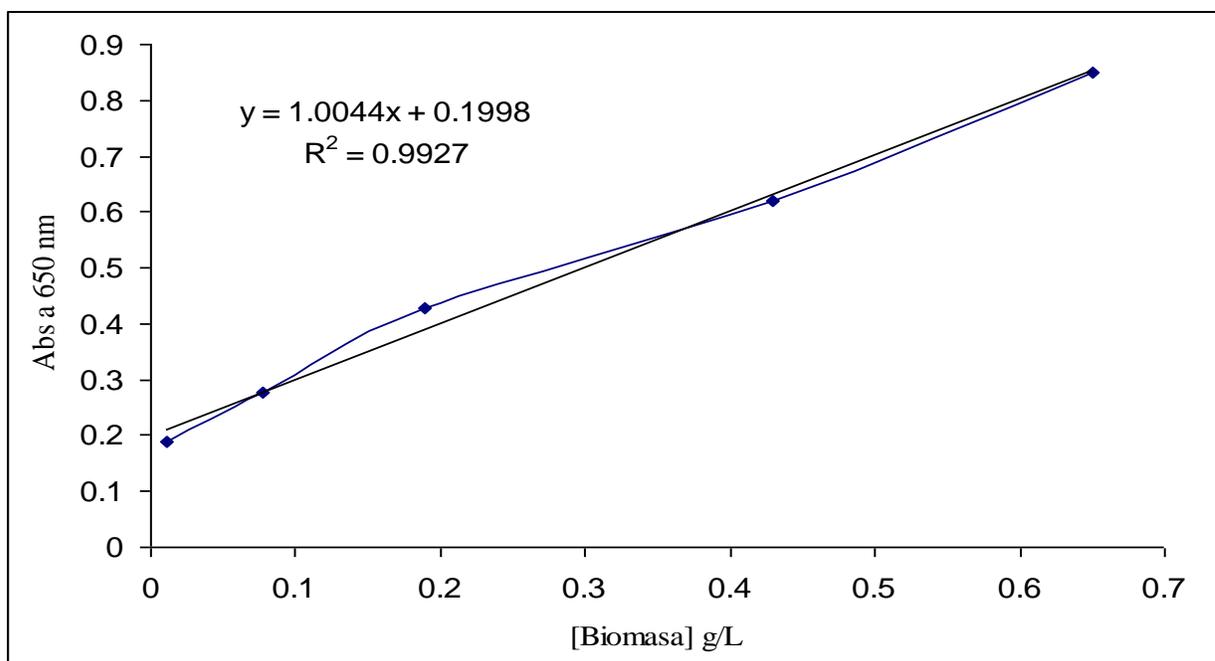


Figura AI.1. Curva de calibración para la estimación de la concentración de biomasa en peso seco

ANEXO II Curva de calibración para estimar la concentración de sustrato y producto

De cada muestra a analizar se inyectó un microlitro al cromatógrafo de gases XL (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) con una columna Cylosilb (30 m 0.32 mm) (Aligent, Technologies, USA). La concentración de sustrato y producto fue estimada a partir de una curva de calibración. Para las curvas de calibración se usaron como sustrato

biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona y como producto (1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona (en un intervalo de concentraciones de 0-2.0 g/L). El método cromatográfico consistió en un tiempo de retención de 3.7 min y 3.95 min para los sustratos (estéreo isómeros) y 8.5 minutos para producto, se empleó un puerto de inyección, FID a 250°C, la temperatura en el horno fue la siguiente: T inicial 100°C por 1 minuto, rampa 10°C/min hasta 150°C, mantener a 150°C por 3 minutos. Se usó N₂ como gas acarreador a un flujo de 5 mL/min.

Se obtuvieron dos correlaciones lineales, y con éstas se estimaron las concentraciones de extracción en la Celda de Lewis. Los valores de los coeficientes de regresión fueron de 0.961 y 0.99 para sustrato y producto, respectivamente.

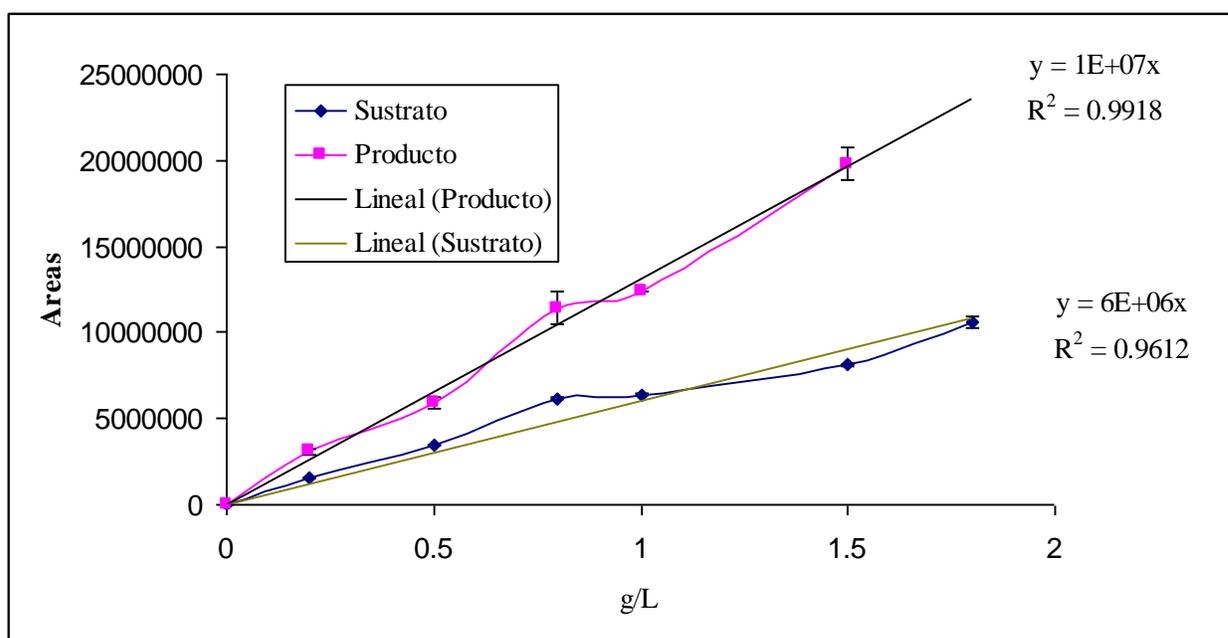


Figura AII.1. Curvas de calibración para sustrato y producto

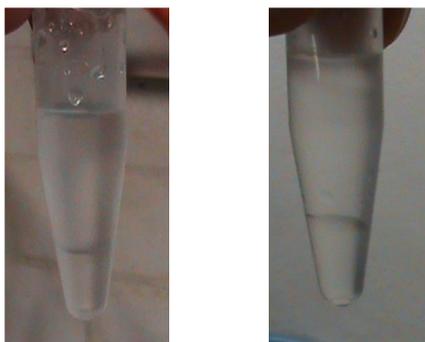
ANEXO III Estabilidad del [MeBuPyr][BTA] en función del NaOH y T

Se estudió la estabilidad del líquido iónico en contacto con el NaOH y la temperatura, ya que el método para determinar el tiempo de mezclado podía desnaturalizarlo, así como la extracción de sustrato y producto a altas temperaturas.

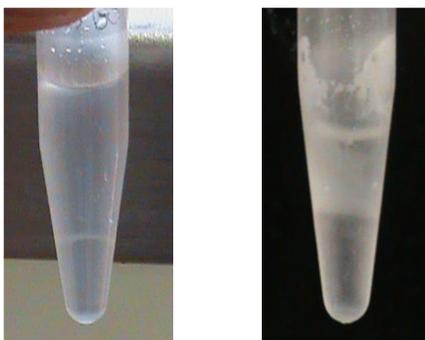
Los resultados obtenidos en la estabilidad del líquido iónico en función de la interacción entre el pH y la temperatura mostraron que la combinación de estos dos factores a 100 °C descompone el líquido iónico, mientras que a temperatura ambiente no se observó un daño aparente. Los blancos no presentaron alteración en ninguna de las temperaturas manejadas.

Se hace la consideración que al adicionar el pulso de NaOH 2M 80 μ L en la medición del tiempo de mezclado en el reactor, el mezclado es tan rápido que el NaOH reacciona con la fase acuosa sin afectar o dañar a la fase dispersa.

a)



b)



c)

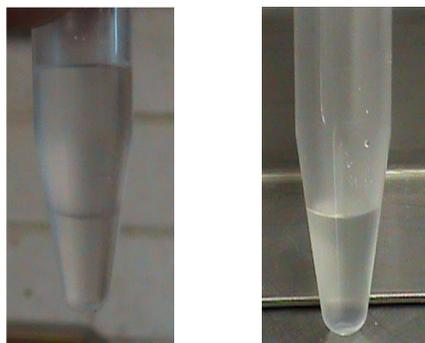


Figura AIII.1. 200 μ L de [MeBuPyrr] [BTA] con 600 μ L de 3M NaOH: a) temperatura ambiente 25 °C, b) 100 °C y c) Blancos: 200 μ L de Líquido iónico con 600 μ L de agua destilada a 25 y 100 °C.

ANEXO IV Determinación del tiempo de respuesta del electrodo de pH

El tiempo de respuesta ($t_{r_{pH}}$) se estimó partiendo del criterio del tiempo característico el cual es el tiempo en que un mecanismo en un proceso alcanza en 63.2 % de transición.

Y se estimó para saber si el tiempo de mezclado no era de la misma magnitud que del tiempo de respuesta, ya que de ser así, no se tendrían datos confiables del tiempo de mezclado. La Figura AIV.1 Muestra los resultados obtenidos del tiempo de respuesta del electrodo, partiendo de un pH inicial de 4 a uno final de 7. Se emplearon amortiguadores estándar a 30°C.

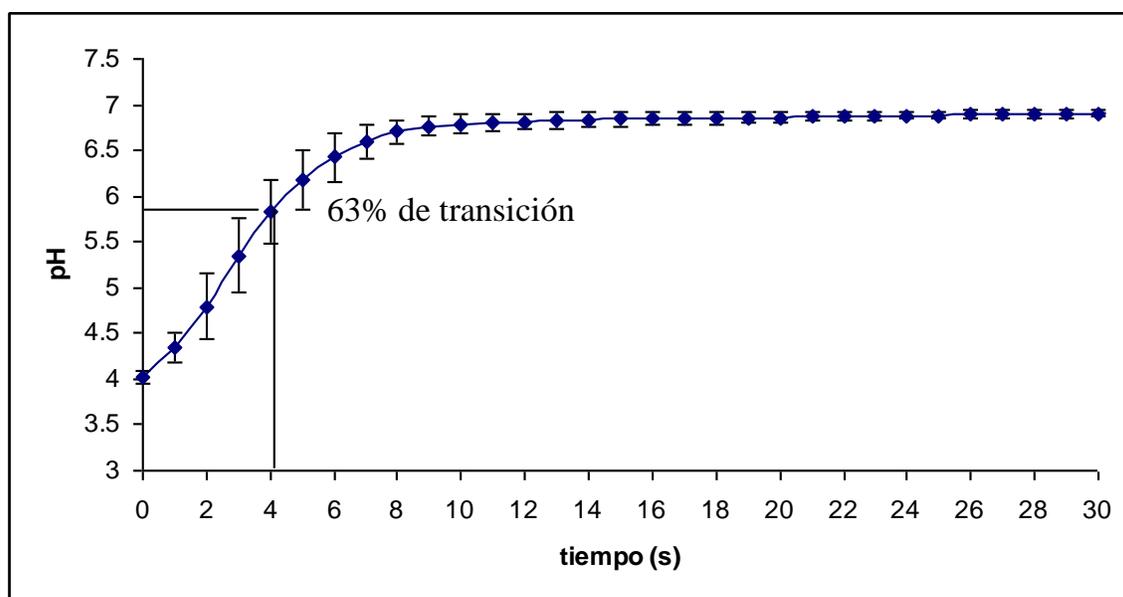


Figura AIV.1. Tiempo de respuesta del electrodo de pH, considerado como el tiempo que tarda en llegar al 63.2% de transición de un pH de 4 a 7.

El tiempo de respuesta se estimó partiendo de regresiones lineales de cada repetición en el intervalo de tiempo donde se encontró el 63.2 % de transición. A partir de las ecuaciones lineales, se obtuvieron t_r de cada repetición y se promediaron. El $t_{r_{pH}}$ calculado fue de 4.83 ± 0.84 segundos. (Figura AIV.2).

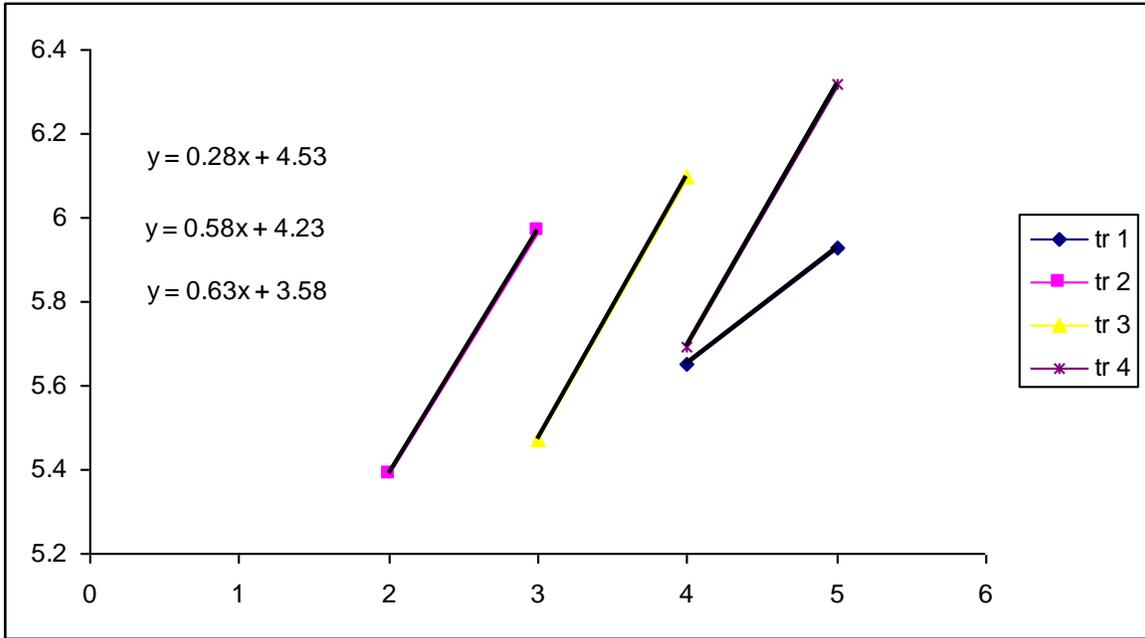


Figura AIV.2 Intervalos de tiempo donde se encontró el 63.2 % de transición de un pH de 4 a 7, para estimar el tiempo de respuesta del electrodo de pH.

ANEXO V Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno

La curva se realizó con el electrodo en una solución sin oxígeno y se pasó a una solución saturada al 100 %, el tiempo de respuesta se consideró como el tiempo que tardó el electrodo en llegar al 63.2 % de la saturación, la medición del tiempo de respuesta se hizo por triplicado (Figura AV.1).

Se consideraron los puntos donde se interceptaba el tiempo de respuesta (20 a 25 s) y se realizó una regresión lineal para obtener una ecuación que estimara el 63.2 % de saturación, dando un tiempo de respuesta del electrodo de 23.46 s. (Figura AV.2).

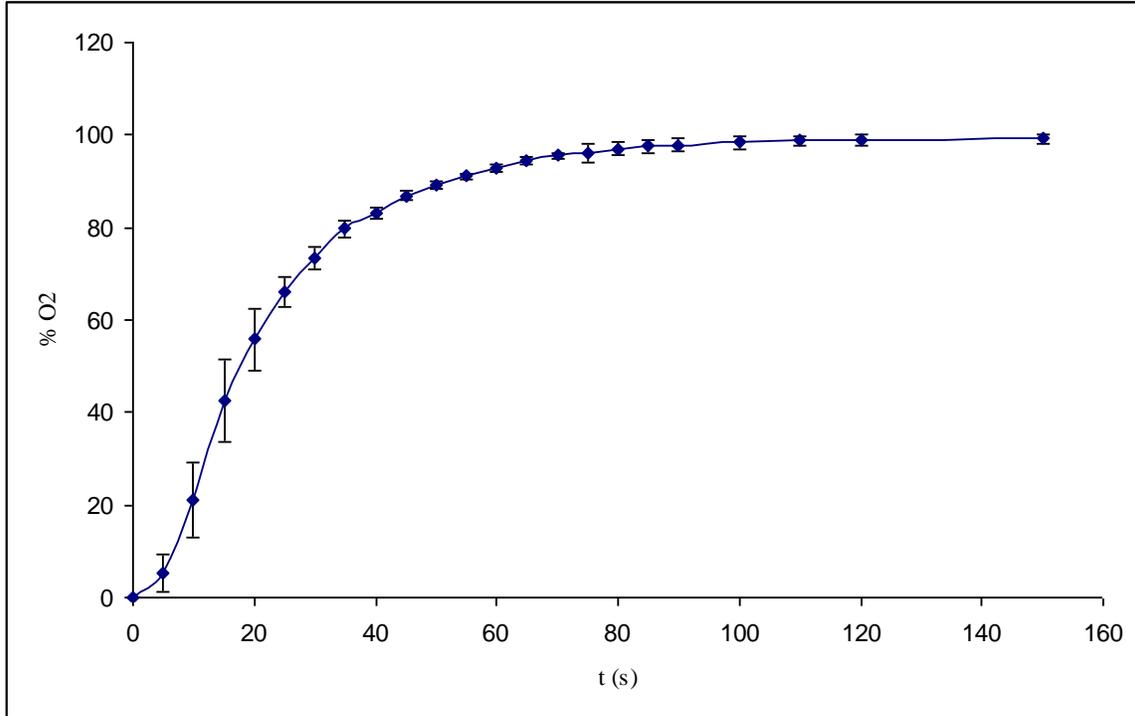


Figura AV.1 Tiempo que tardó el electrodo en pasar de una concentración de una solución de 0 a 100 % de oxígeno, para estimar el tiempo de respuesta

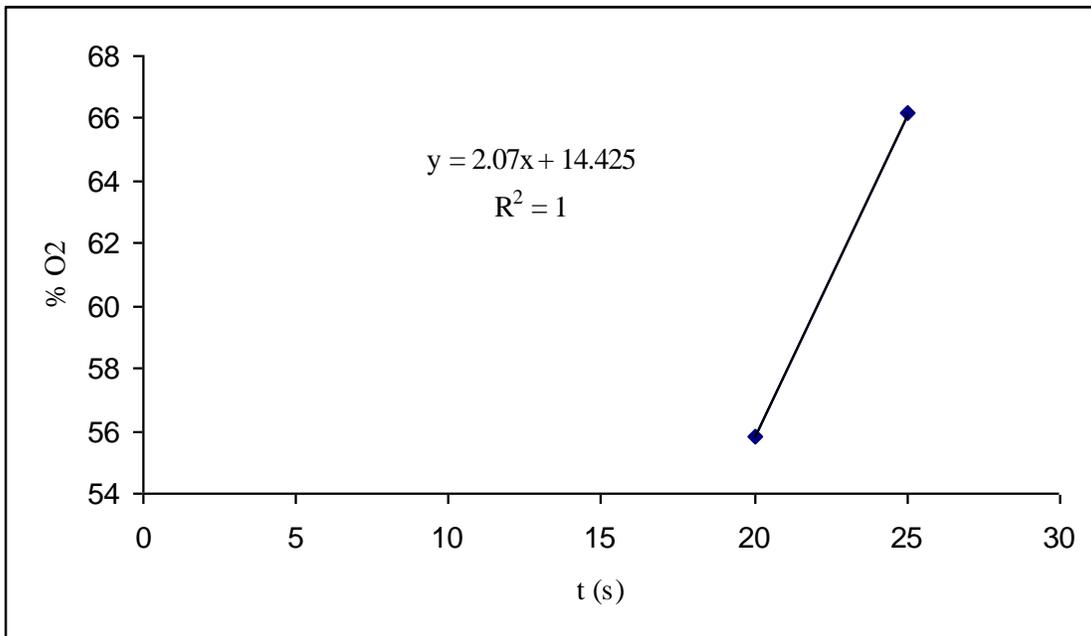


Figura AV.2. Tiempos donde se encontró el 63.2 % de saturación de oxígeno del electrodo, con esta gráfica se estimó el tiempo de respuesta

ANEXO VI Estimación de Pg/V en el biorreactor

Se estimó la potencia (P) en el reactor en vacío a las tres velocidades de agitación estudiadas y se midió la potencia gaseada (Pg) a las diferentes condiciones de operación del diseño experimental, finalmente la potencia real fue estimada a partir de la diferencia de $Pg-P$. En la Tabla AVI.1 se muestran las potencias obtenidas por unidad de volumen.

Tabla AVI.1. Potencias gaseadas por unidad de volumen obtenidas a las diferentes condiciones de operación en el biorreactor

rpm	vvm	Φ	$X (g/L)$	$I (Amp)$	$E (V)$	$Pg-P (W)$	$Pg/V (W/m^3)$
1000	0.5	0.2	0	1.4	11.33	8.57	12241.11
700	0.75	0.125	5	1.02	8.3	3.30	4707.86
700	0.75	0.125	0	0.95	8.15	2.57	3674.29
700	0.75	0.125	2.5	1.29	11.17	9.24	13198.29
1000	1	0.05	0	1.29	11.17	7.12	10165.82
1000	0.75	0.125	2.5	1.23	11.14	6.41	9155.68
700	0.75	0.125	2.5	0.94	8.11	2.45	3504.14
400	1	0.05	5	0.73	5.25	0.83	1189.29
700	0.75	0.2	2.5	1	8.25	3.08	4399.29
400	0.5	0.2	5	0.75	5.25	0.94	1339.29
400	1	0.2	0	0.95	8.15	4.74	6775.00
400	0.75	0.125	2.5	0.67	5.12	0.43	614.86
400	0.5	0.05	0	0.7	5.11	0.58	824.29
700	0.5	0.125	2.5	0.98	8.2	2.87	4093.57
700	0.75	0.125	2.5	0.93	8.132	2.39	3417.51
1000	0.5	0.05	5	1.3	11.5	7.66	10938.25
1000	1	0.2	5	1.32	11.33	7.66	10946.25
700	0.75	0.05	2.5	1	8	2.83	4042.14
700	1	0.125	2.5	1	8.3	3.13	4470.71

ANEXO VII Velocidades superficiales de las fases iónica y acuosa en la celda de Lewis

Velocidades superficiales de las fases acuosa e iónica obtenidas en la celda de Lewis modificada por medio del diseño de una partícula a diferentes velocidades de agitación en las fases.

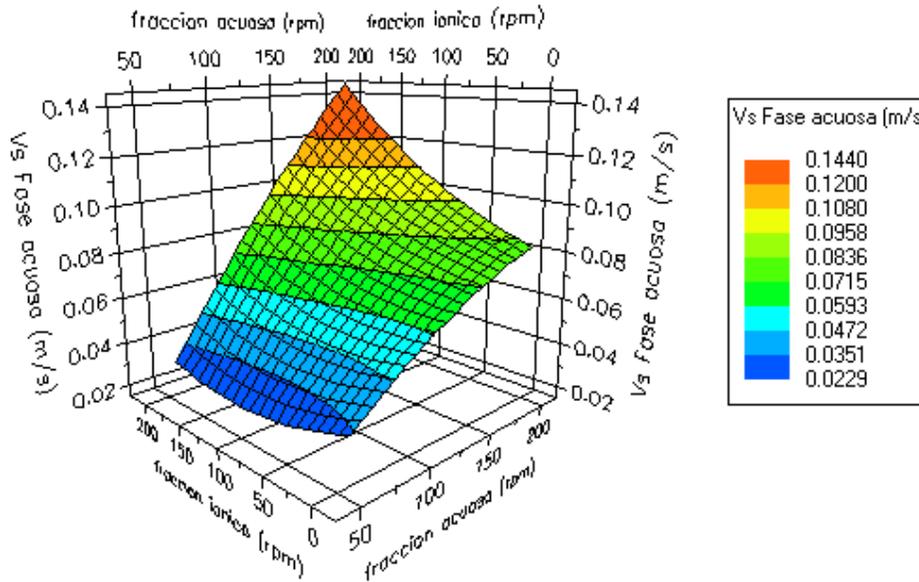


Figura A.VII.1. Velocidades superficiales de la fase acuosa a diferentes velocidades de agitación de las fases acuosa-iónica en la celda de Lewis de modificada

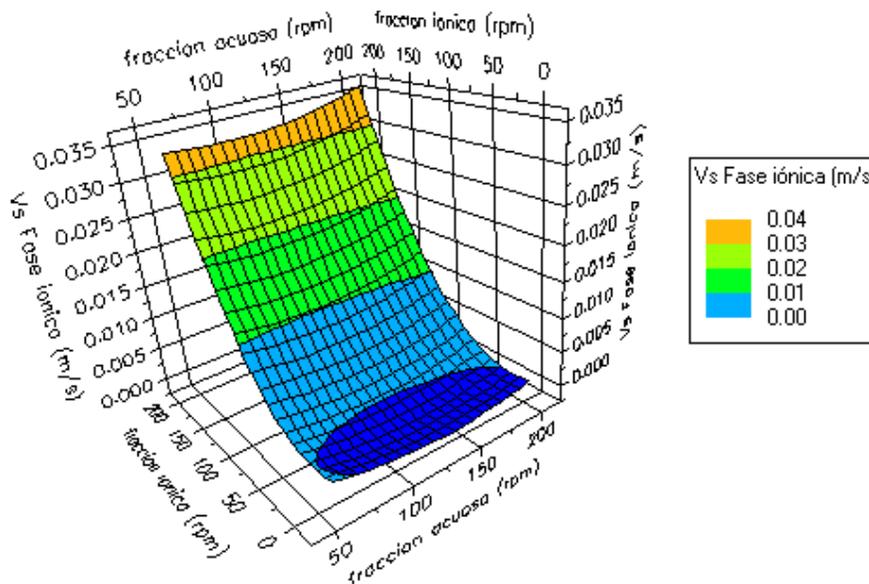


Figura A.VII.2. Velocidades superficiales de la fase iónica a diferentes velocidades de agitación de las fases acuosa-iónica en la celda de Lewis de modificada.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00121

Matrícula: 208381321

ANÁLISIS DE RÉGIMEN DE UN BIORREACTOR DE PARTICIÓN DE TRES FASES MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE TIEMPOS CARACTERÍSTICOS

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 2 del mes de septiembre del año 2010 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA
DR. ADRIAN GOMEZ DE JESUS
DRA. MARGARITA MERCEDES GONZALEZ BRAMBILA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: RODRIGO MELGAREJO TORRES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

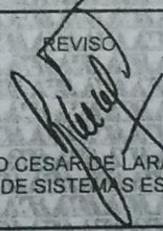
A PROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



RODRIGO MELGAREJO TORRES
ALUMNO

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARANSASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE



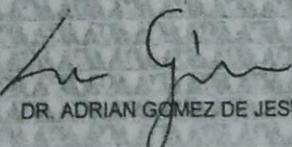
DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

VOCAL



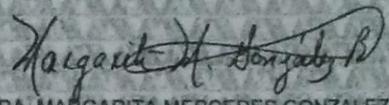
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA

VOCAL



DR. ADRIAN GOMEZ DE JESUS

SECRETARIA



DRA. MARGARITA MERCEDES GONZALEZ BRAMBILA