



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**BIOCONVERSIÓN DE CETONAS BICÍCLICAS UTILIZANDO
Escherichia coli TOP10 pQR239 EN MINIBIORREACTORES DE
100 ML**

TESIS

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

PEDRO LÓPEZ ORDAZ

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR: Dr. SERGIO HUERTA OCHOA

LECTOR: Dr. DANIEL TORRES MARTINEZ

MEXICO, D.F.

Noviembre 2012



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00113

Matricula: 2113801015

BIOCONVERSIÓN DE CETONAS
BICICLICAS UTILIZANDO
Escherichia coli TOP10
pQR239 EN BIORREACTORES DE
100 ml.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de noviembre del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. DANIEL TORRES MARTINEZ

siendo el primero asesor del alumno y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

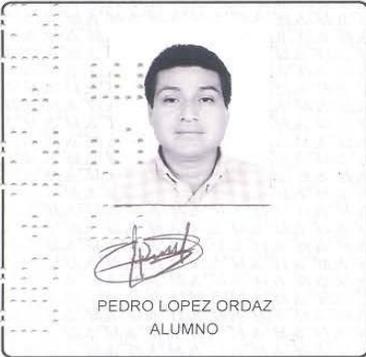
ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: PEDRO LOPEZ ORDAZ

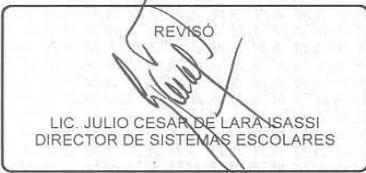
y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

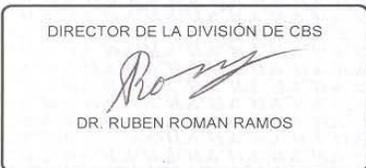
Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



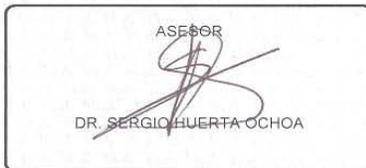
PEDRO LOPEZ ORDAZ
ALUMNO



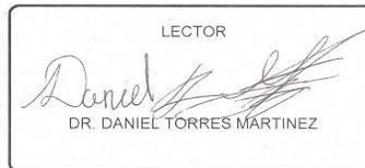
REVISÓ
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES



DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS
DR. RUBEN ROMAN RAMOS



ASESOR
DR. SERGIO HUERTA OCHOA



LECTOR
DR. DANIEL TORRES MARTINEZ

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue caracterizar experimentalmente la hidrodinámica y la transferencia de masa en un módulo de mini-biorreactores de 100 mL tipo tanque agitado (MMBR-100), con el fin de establecer las condiciones de operación para la bioconversión de la cetona bicíclica (\pm)-cis-biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona a su correspondientes lactonas, (1S,5R)-(-)-2-oxabicyclo [3.3.0]oct-6-en-3-ona y (1R,5S)-(-)-3-oxabicyclo[3.0.0]oct-6-2-ona, en un sistema bifásico (acuoso-aire) y multifásico (acuoso-líquido iónico-aire).

Para los estudios de hidrodinámica se determinó la potencia gaseada (P/V), flujo de aireación y tasa de agitación. La transferencia de masa (K_La) se estudió en el sistema bifásico y multifásico a diferentes condiciones de agitación, aireación y fracción de líquido iónico [OMA][BTA]: 1350 -1950 rpm, 1.4 vvm, 5% de líquido iónico, respectivamente.

La producción del biocatalizador se llevó en medio de cultivo (extracto de levadura 10 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, glicerol 10 g/L) a pH 7, con una solución de ampicilina de 0.1 g/L. Posteriormente, durante el cultivo la inducción de la enzima intracelular ciclohexanona monooxigenasa se logró adicionando una solución filtrada de L-arabinosa de 2 g/L, manteniendo la agitación a 150 rpm a una temperatura de 37 °C.

La bioconversión se llevó a cabo en mini-biorreactores de 70 mL, 0.67 g/L de cetona bicíclica y 3 g/L de biomasa a una temperatura de 30 °C. El menor diámetro de gota (d_{32}) se obtuvo a 20 % de fracción iónica y 1350 rpm. Se obtuvieron K_La 3 veces menores en comparación al sistema bifásico. La bioconversión en sistema multifásico permitió incrementar dos veces más la concentración de sustrato manteniendo niveles no inhibitorios en fase acuosa, logrando una bioconversión del 60 %. El MMBR-100 utilizado permitió evaluar la bioconversión de cetonas a diferentes condiciones de operación en los sistemas bifásicos y multifásicos, a bajos costos y en menor tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Planta Piloto 4 de Fermentación en Medio Sólido del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Que me permitió formarme en su posgrado a nivel Especialidad, por todas las facilidades proporcionadas para mi superación y desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento al proyecto: SEP-CONACyT-2007-80847

Quiero agradecer al Dr. Sergio Huerta Ochoa, por su dirección, amistad, asesoría, sus comentarios oportunos y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Daniel Torres Martínez, por su valioso tiempo, comentarios y correcciones de este trabajo.

A los doctores: Ernesto Favela Torres, Gerardo Saucedo Castañeda y Arely Prado Barragán por su incondicional amistad para mi desarrollo profesional, y que serán un ejemplo a seguir.

A MI EQUIPO DE TRABAJO

Al M. en C. Rodrigo Melgarejo Torres en particular de quien reconozco sus grandes enseñanzas que me brindó toda su atención, orientación en la planeación, ejecución, presentación y su persistente guía en la ejecución de esta tesis. Más que nada por su indisoluble soporte, estímulo, enseñanzas y cordialidad entregada.

A la M. en C. Dulce María Palmerin Carreño y Ing. Cheyco Martínez Peña, por su confianza y amistad.

A todos mis amigos y compañeros de esta planta que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de esta tesis y que tuvieron la mejor disposición para ello.

En especial Al Ing. Gregorio Nicolás Juárez Luna, por su calidad humana, su estimación y afecto mostrado durante el desarrollo de esta tesis.

A la Profa. Marlem Campero Castillo gracias por brindarme día a día alegría por su incondicional amistad y respeto; de lo mejor que tengo en la vida.

DEDICATORIA

A mi Sra. madre: IGNACIA ORDAZ TOLENTINO † que mediante su estímulo y visión procuró día a día mi superación personal, ya que con su Fe me vislumbró especial atención, le doy mi amor eterno.

A mi Sr. padre: ANSELMO LÓPEZ OROZCO por sus múltiples enseñanzas le doy mi respeto.

A mis hermanos:

Herlinda, Modesta, Anselmo, Ricardo, Basilia, Facundo, Maribel, Sergio Ernesto.

CONTENIDO GENERAL

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iv
CONTENIDO GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA	x
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1. Oxidación Baeyer – Villiger	2
1.2. Cofactores	5
1.3 Líquidos iónicos	7
1.3.1 Consideraciones para la selección del líquido iónico	8
1.3.2 Ventajas de los líquidos iónicos frente a otros disolventes	9
1.3.3 Aplicaciones industriales	9
1.3.4 Biocompatibilidad de los líquidos iónicos	10
1.3.5 El uso de líquidos iónicos en biocatálisis	10
1.4 Biorreactor de tanque agitado	11
1.4.1 Biorreactor	12
1.4.2 Biorreactor de partición	12
1.4.3 Aplicaciones de los biorreactores de partición	14
1.5 Mini-biorreactores	14
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN	16
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	18

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	20
CAPÍTULO 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Reactivos	25
6.2 Microorganismo	25
6.3 Liofilización del biocatalizador	25
6.4 Hidrodinámica de los mini biorreactores de 100 mL	26
6.5 Bioconversión	26
6.6 Calibración del electrodo	27
6.6.1. Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno	28
6.7 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$)	28
6.8 Determinación del diámetro de gota (d_{32})	29
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 Hidrodinámica y transferencia de masa del MMBR-100 mL, (P_g/V , d_{32} y $k_L a$)	32
7.1.1 Potencia gaseada por unidad de volumen	32
7.1.2. Determinación del $k_L a$	33
7.1.3. Determinación del d_{32}	34
7.2. Bioconversión en sistema bifásico (acuosa-aire)	35
7.2.1 Bioconversión sin inhibición	35
7.2.2 Bioconversión con inhibición por sustrato	36
7.2.3 Bioconversión con inhibición por oxígeno	37
7.2.4 Análisis global del sistema bifásico	38
7.3 Bioconversión en sistema multifásico (acuosa-aire y fracción iónica)	39
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La cepa recombinante <i>Escherichia coli</i> TOP10 pQR239 expresa la enzima intracelular ciclohexanona monooxigenasa en presencia de L-Arabinosa	4
Figura 2. Reacción de cetonas bicíclicas a lactonas presentando inhibición por sustrato y producto	4
Figura 3. Mecanismo de reacción para CHMO por óxido-reducción (Alphand y col., 2003)	6
Figura 4. Viabilidad de <i>E. coli</i> en diferentes líquidos iónicos (Torres Martínez, 2010).	11
Figura 5. MMBR – 100 mL	27
Figura 6. Determinación del k_La por el método dinámico	27
Figura 7. Efecto de la tasa de agitación y la fracción de fase dispersa en el consumo de potencia (P/V) en el MMBR – 100 mL.	32
Figura 8. Efecto de la tasa de agitación y la fracción de fase dispersa sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_La)	33
Figura 9. Efecto de la fracción iónica y la tasa de agitación sobre el d_{32}	34
Figura 10. Cinética de bioconversión sin inhibición por sustrato u oxígeno a 1350 rpm y 1.4 vvm (k_La 120 h^{-1}), 3 g/L de biomasa y 0.35 g/L de sustrato	35
Figura 11. Cinética de bioconversión presentando inhibición por [S] a 1350 rpm y 1.4 vvm (k_La 120 h^{-1}), 3 g/L de biomasa y 0.7 g/L de sustrato	36
Figura 12. Cinética de bioconversión presentando inhibición por $[O_2]$ a 1950 rpm y 1.4 vvm (k_La 360 h^{-1}), 3 g/L de biomasa y 0.35 g/L de sustrato	37
Figura 13. Gráfica comparativa de bioconversiones sin inhibición (●) y con inhibición por sustrato (■) y oxígeno (▲)	38
Figura 14. Cinética de bioconversión en sistema multifásico a 1350 rpm, 1.4 vvm, 5% de fracción iónica y una concentración de sustrato global de 0.7 g/L.	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Referencias comparativas en bioconversiones multifásicas	40
---	----

SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

Para la facilidad del lector, en este trabajo se muestran los significados de las nomenclaturas y símbolos 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 ($m^2/m^3 = m^{-1}$)

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

C_L Concentración de oxígeno disuelto en el biorreactor a cualquier tiempo (g_{O_2}/L)

C_L^* Concentración de saturación de oxígeno disuelto 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)

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)

k Es la constante de ganancia 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

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

L Unidades de volumen en litros

O_2^* Concentración máxima de saturación de oxígeno disuelto en el biorreactor
(g_{O_2}/L)

P_g/V Potencia gaseada por unidad de volumen (Watts m^{-3})

V Volumen de operación del biorreactor (m^3)

V_s Velocidad del fluido en cada fase en función de las velocidades de agitación
(m/s)

V_{vm} 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 de la fase estudiada (Kg/m^3)

ϕ Fracción iónica de la fase dispersa en el biorreactor (adimensional)

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

N_{Re} Número de Reynolds definido para la fase iónica y acuosa

ORM 3D Reflectancia óptica de tres dimensiones

MMBR-100 Mini-biorreactor de 100 mL

W Unidades de potencia (watts)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El estudio y control de reactores de partición permite un mejor manejo de ambiente celular, por medio de partición selectiva de moléculas, con esto se logrará un mayor rendimiento celular. También podrá tener un impacto positivo en las operaciones de separación, para la purificación de los productos de interés (Daugulis, 1997).

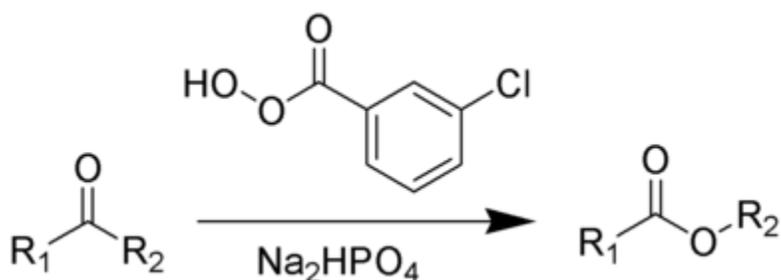
Desde los principios de los ochentas la estrategia de los procesos de bioconversión empleando la extracción líquido – líquido, para la integración de reacción y recuperación de productos en sistemas biológicos, ha sido muy estudiada. La recuperación de producto puede ser *in situ* ó *ex situ*. El concepto de un biorreactor de partición de dos fases puede ser aplicado al control de la liberación de sustratos tóxicos contenidos en una fase hacia una fase acuosa la cual contiene a las células de interés (Daugulis, 1997).

La biocompatibilidad del solvente orgánico es una de las características más importantes en estos procesos, es decir, hay que considerar que el microorganismo debe presentar tolerancia a la presencia del solvente (Daugulis 1997). El éxito de la extracción en una fermentación depende exclusivamente de las propiedades del solvente de extracción. Se han sugerido nuevas ideas para el uso de solventes orgánicos que no sean tóxicos para la célula (Bruce y Daugulis 1991).

1.1 OXIDACIÓN BAEYER-VILLAGER

La oxidación tipo Baeyer-Villiger es una reacción orgánica en la que se oxida una cetona cíclica para obtener su correspondiente lactona por tratamiento con peroxiácidos o peróxido de hidrógeno. Las principales características de la oxidación Baeyer-Villiger son su estéreo y quimoespecificidad. Esta reacción toma el nombre de dos químicos, el alemán Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Baeyer (1835-1917) y el químico suizo Víctor Villiger (1868-1934). En esta reacción, la cetona es atacada nucleofílicamente por el peróxido de hidrógeno, también llamando a este paso “intermediario de Criegee”. 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 cetonas.



Los reactivos normalmente empleados para llevar a cabo esta reacción son el ácido *m*-cloroperoxibenzoico (MCPBA), el ácido peracético, o el ácido peroxitrifluoroacético. El reactivo original en la publicación de 1899 es el ácido de Caro descubierto un año antes. Para evitar transesterificación o hidrólisis se añade con frecuencia un agente tampón (*Buffer*). Los más comunes son los de fosfato sódico y bicarbonato de sodio.

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 Turfit (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).

La oxidación Baeyer-Villiger también puede ser realizada por la acción de la enzima Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMO), ver Figura 1.

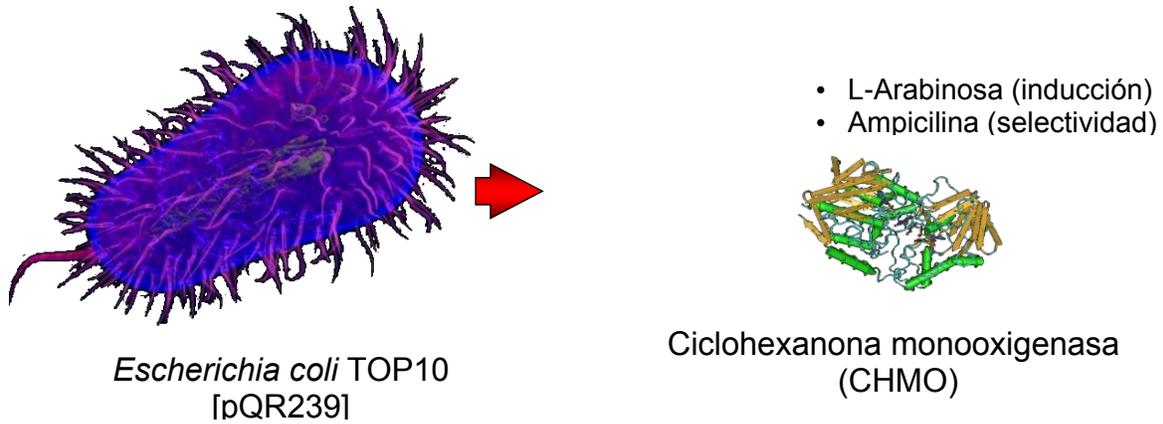
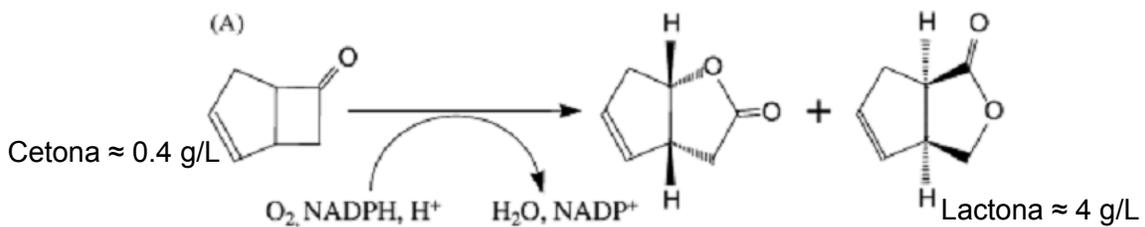


Figura 1. La cepa recombinante *Escherichia coli* TOP10 pQR239 expresa la enzima intracelular ciclohexanona monooxigenasa usando como inductor L-Arabinosa.

Se han investigado técnicas experimentales para utilizar esta enzima de modo que se siga conservando la enantioselectividad y el rendimiento en estas reacciones con menor producción de desechos tóxicos (química verde). Las principales dificultades son la especificidad de sustrato, la dependencia de la estequiometría, además de los costos de los cofactores como el NADPH y los costos asociados a BVMO.



Inhibición por sustrato y producto (Doig y col., 2001)

Figura 2. Reacción de cetonas bicíclicas a lactonas presentando inhibición por sustrato y producto.

1.2 Cofactores

Un gran número de enzimas requieren un componente adicional para poder desempeñar sus funciones catalíticas. Estos componentes se identifican con el término genérico cofactor, los cofactores pueden dividirse en tres grupos no bien definidos: a).- Grupos prostético, b).- Coenzimas y c).- Activadores metálicos.

Por lo general un grupo prostético se considera como un cofactor unido firmemente a la proteína enzimática, así por ejemplo, se consideran grupos prostéticos a la porción porfirinica de la hemoproteína peroxidasa, así como a la flavin – adenin dinucleotido asociado firmemente a la deshidrogenasa succínica. Una coenzima es una molécula orgánica pequeña y estable al calor que fácilmente se disocia de la proteína enzimática y que de hecho puede dializarse de ella. Son ejemplos de coenzimas el NAD^+ , el NADP^+ . El ácido de tiamina. Tetrahidrofolico y el pirofosfato.

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

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

De las enzimas que realizan este tipo de reacción (Baeyer-Villiger) las más estudiadas son las del tipo ciclohexanona-monooxigenasas (CHOMs). Estas enzimas tienen la característica de que usan NADPH que incorporan un átomo de oxígeno molecular al sustrato y el otro átomo es reducido en forma de agua. En los últimos años se han clonado y sobre expresado genes de ciclohexanona monooxigenasas (CHMO) en varios microorganismos (Willettts, 1997). Algunas de estas enzimas recombinantes del tipo BVMOs son: Ciclohexanona monooxigenasas (CHMO), Ciclopentanona monooxigenasas (CPMO), Ciclododecanona monooxigenasas (CDMO), Esteroide monooxigenasas (SMO), 4- Hidroxiacetofenona monooxigenasas (HAPMO).

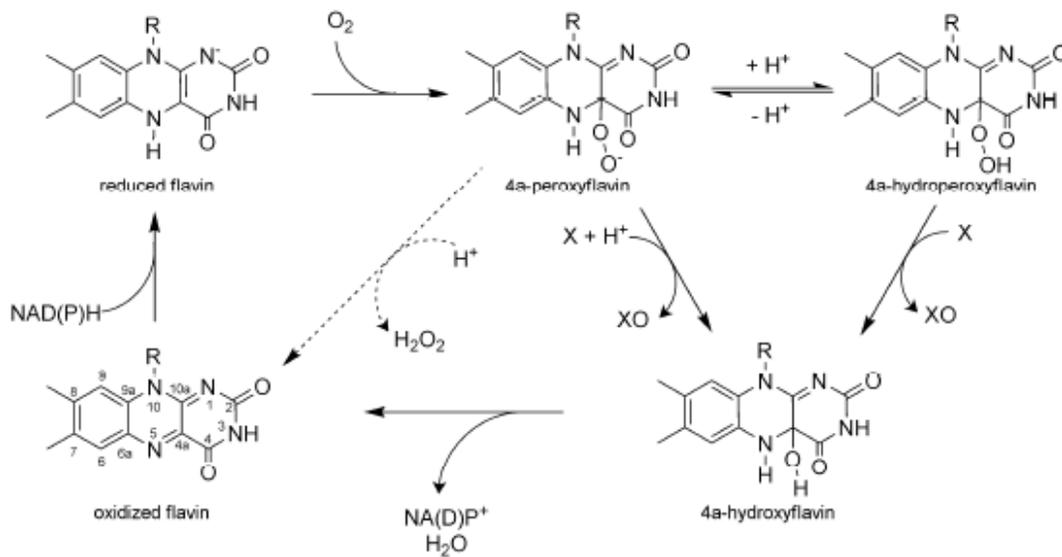


Figura 3. Mecanismo de reacción para CHMO por óxido-reducción (Alphand y col., 2003)

En una biotransformación se pueden emplear células completas o enzimas aisladas, que pueden también estar libres o inmovilizadas. La decisión del biocatalizador a utilizar depende de muchos factores, como por ejemplo su costo, del tipo de reacción, de la necesidad de emplear cofactores y de la escala en la cual la biotransformación se lleva a cabo. Muchas reacciones enzimáticas, en particular las oxidaciones y reducciones, requieren el uso de cofactores, por ejemplo el NAD y NADP. Estos cofactores son inestables y caros, por lo que es

necesario reciclarlos. Si se trabaja con células completas desaparece la necesidad de agregar y reciclar cofactores. Por otra parte, el uso de enzimas aisladas podría incrementar la productividad, ya que la tolerancia a la concentración de sustrato es mayor; sin embargo, es necesario agregar un exceso de NADPH que es muy caro ó implementar un sistema de regeneración de cofactores.

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

1.3 LÍQUIDOS IÓNICOS

Un Líquido iónico (LI) es un fluido constituido exclusivamente por iones, considerándose como tales a las sales con una temperatura de fusión por debajo del punto de ebullición del agua (100 °C) y que a menudo son estables. Los líquidos iónicos no tienen presión de vapor, son térmicamente estables y su polaridad, hidrofobicidad y miscibilidad en solventes pueden ser diseñados adecuadamente por modificaciones del catión o del anión.

En este trabajo se emplea a los líquidos iónicos como una estrategia para llevar la extracción *in situ* (remoción) del producto inhibitorio, teniendo un impacto positivo en el equilibrio de la reacción y haciendo que el biorreactor sea mucho más eficiente (Malinowski, 2001). Es posible utilizar células completas en la producción de compuestos enantioméricamente puros por biotransformación; sin embargo, la productividad de estos procesos es baja debido a la toxicidad de sustratos y productos (Pfruender y col., 2006).

Los biorreactores de partición pueden ser aplicados para controlar la liberación de un sustrato tóxico disuelto en una fase orgánica (solvente orgánico) a una fase acuosa que contiene a las células. Sin embargo los solventes orgánicos convencionales usados frecuentemente, son tóxicos para las células, explosivos y dañinos para el medio ambiente. Los solvente “verdes” tales como fluidos supercríticos y líquidos iónicos son alternativas prometedoras a los solventes orgánicos (Pfruender y col., 2004).

El líquido iónico [BMIM] [PF₆] ha sido usado efectivamente como reservorio de sustrato y para la extracción *in situ* de producto en la biotransformación de acetiltrimelísano (ATMS) a enantiómero(S) – 1- trimetilsililetanol (1- TMSE) catalizado por células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto es posible por la biocompatibilidad de [BMIM] [PF₆] al biocatalizador, permitiendo elevar la actividad y estabilidad de las células inmovilizadas. Dorland (2005) definió la biocompatibilidad como la cualidad de carecer de efectos tóxicos o perjudiciales sobre los sistemas biológicos.

1.3.1 Consideraciones para la selección del líquido iónico

Su polaridad es una propiedad que se aprovecha en reacciones químicas y bioquímicas, ya que pueden disolver un amplio rango de sustancias incluyendo compuestos orgánicos polares y no polares, así como compuestos inorgánicos y polímeros. Esto es importante porque permite diseñar líquidos iónicos para reacciones específicas, como son incrementar la solubilidad del sustrato o modificar la selectividad de la enzima (Yang y Pan, 2005).

La selección del líquido iónico es de crucial importancia para el desarrollo de una biotransformación exitosa, así como su biocompatibilidad es una de las características más importantes que deben ser tomadas en cuenta en la selección de la fase dispersa en biorreactores de partición (Malinowski, 2001).

1.3.2 Ventajas de los líquidos iónicos frente a otros disolventes

La presión de vapor de los líquidos iónicos a temperaturas y presiones moderadas es tan pequeña que pueden considerarse compuestos no volátiles. Esta propiedad es la principal justificación del interés de la “Química Verde” por encontrar en la familia de los líquidos iónicos disolventes que puedan sustituir a los compuestos orgánicos volátiles y desarrollar unos procesos químicos más limpios y sostenibles. La baja presión de vapor de estos compuestos es una característica que contrasta con las elevadas presiones de vapor de los disolventes orgánicos. Uno de los problemas ambientales de los disolventes orgánicos es su elevado potencial de contaminación de la atmósfera debido a su presión de vapor. Con el empleo de líquidos iónicos, en lugar de disolventes orgánicos, se evita la contaminación atmosférica debido a la enorme diferencia de volatilidades entre estos dos tipos de disolventes.

El número de líquidos iónicos es de varios órdenes de magnitud superior al número de disolventes, entre seiscientos y setecientos, utilizados en la industria. Cada uno de estos líquidos iónicos tiene unas propiedades determinadas dependiendo del anión y del catión que lo configuran. Como el número de posibles líquidos iónicos es tan elevado, puede diseñarse uno que reúna las propiedades más adecuadas para ser el disolvente “óptimo” de la reacción que se pretende efectuar. Cada reacción química tiene unas características específicas por lo que su ejecución en condiciones óptimas implica encontrar y sintetizar el disolvente apropiado. Propiedades tales como punto de fusión, densidad, viscosidad, capacidad de solvatación o acidez pueden seleccionarse alterando el anión y el catión.

1.3.3 Aplicaciones industriales

Los líquidos iónicos (LI) pueden considerarse como nuevos disolventes debido a sus propiedades: baja inflamabilidad, baja o nula volatilidad, estabilidad térmica y alta conductividad iónica. Por esta razón, sus principales aplicaciones serían sustituyendo a los disolventes orgánicos convencionales en reacciones bifásicas y en procesos de separación: líquido – líquido; sólido – líquido, y de iones metálicos.

También en el uso de pilas de combustible, electrolitos, para la industria química (<http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/1745/1/ali.pdf>). Además, se pueden utilizar en otras aplicaciones como en la extracción con fluidos supercríticos o en el desarrollo de nuevos procesos tecnológicos e industriales.

1.3.4. Biocompatibilidad de los líquidos iónicos

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

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

De los 10 líquidos iónicos estudiados del tipo imidazolium, piridinium y tetraalquil amonio ninguno de ellos resultó ser mutagénico mediante la prueba de Ames (Docherty y col., 2006). Por lo que los líquidos iónicos del tipo tetraalquil amonio son una opción como solventes en biocatálisis, por ejemplo el líquido iónico [OMA][BTA].

1.3.5. El uso de los líquidos iónicos en biocatálisis

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

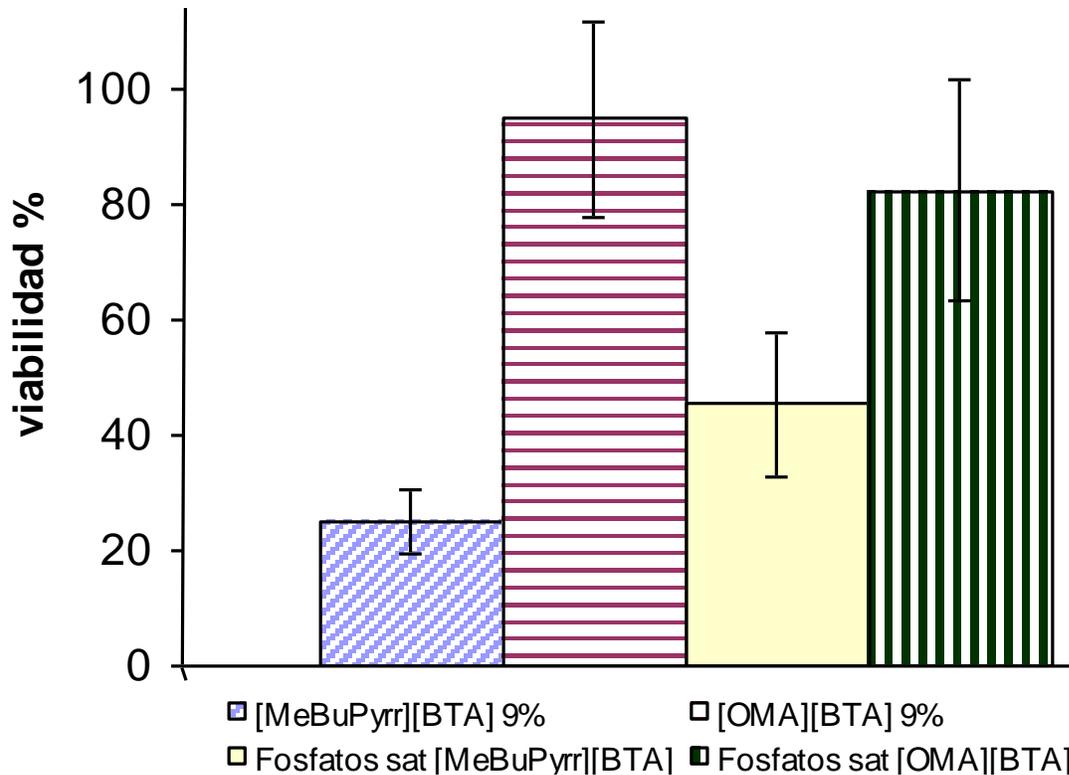


Figura 4. Viabilidad de *E. coli* en diferentes líquidos iónicos (Torres Martínez, 2010).

1.4 BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO

Son los que cuentan con un agitador eficiente para lograr que la composición y la temperatura de la masa reaccionantes tiendan a ser iguales en todas las zonas del reactor, es decir lograr una uniformidad de las propiedades. El diseño del agitador y su velocidad puede afectar las condiciones de mezclado. A esta categoría pertenecen los reactores de empleo más común en la industria química. La mayor parte, está equipado con algún medio de agitación (centrifugación, oscilación o sacudidas), así como elementos para la transferencia de calor (intercambiadores de calor de cubierta, externos e internos). Esta clase admite tanto la operación intermitente como la continua en amplias gamas de temperatura y presión. Con excepción de los líquidos muy viscosos, el reactor tanque con agitación produce un mezclado casi perfecto (retro mezclado).

1.4.1 Biorreactor

Un **biorreactor** es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológico. Lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable. Proporciona un ambiente bien definido para el crecimiento celular y ha sido aceptado por la industria desde hace mucho tiempo. Los aspectos de ingeniería están bien definidos y la información que se obtiene a partir de este equipo se puede aplicar directamente al salto de escala, ya que los tanques agitados de laboratorio pueden ser geoméricamente similares a los de nivel planta piloto y a los de escala industrial. Poner en marcha un biorreactor de tanque agitado completamente instrumentado incluye su limpieza, la preparación del medio, la esterilización, la calibración de sondas y la inoculación (Ratledge y Kristiansen, 2006)

Estos dispositivos se encuentran aún en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos. En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etcétera) al organismo o sustancia química que se cultiva. En función de los flujos de entrada y salida, la operación de un biorreactor puede ser de tres modos distintos: Lote (batch), lote alimentado (fed-batch), y continuo o quimiostato (Koshkin y Shirke, 1975).

1.4.2 Biorreactores de partición

Los reactores de partición permiten trabajar bajo condiciones sub-inhedoras incrementando los rendimientos de la reacción de oxidación (Baeyer-Villiger). Un biorreactor de partición se forma por la adición de un líquido 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 inmisible funciona como reservorio de sustrato tóxico, transmitiéndolo a la célula a niveles sub-inhibitorios, 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 inmisible y biocatalizador (Bruce y Daugulis, 1991).

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

Sin embargo, la etapa limitante podría ser el transporte de masa de sustrato u oxígeno (Torres-Martínez y col., 2009; Melgarejo-Torres y col., 2011). Las velocidades de transferencia de sustrato y oxígeno dependen de las propiedades físicas del fluido, temperatura, presión, composición del medio, condiciones de agitación, velocidad superficial del gas y de la configuración del biorreactor (Torres-Martínez, 2010).

1.4.3 Aplicaciones de los biorreactores de partición

Los biorreactores de partición pueden tener un gran potencial en cuanto a la posibilidad de aumentar la productividad de muchos bioprocesos, permiten la remoción biológica de compuestos orgánicos volátiles de aire contaminado. En la actualidad se han diseñado biorreactores de partición para el tratamiento de efluentes gaseosos a escala de laboratorio, como tanques agitados y biofiltros que contienen una fase no acuosa (Muñoz y col., 2007). En biocatálisis con células completas se han utilizado biorreactores de partición para evitar la inhibición por sustrato y producto.

Los biorreactores de partición de tres fases utilizando una fase orgánica son empleados en biocatálisis para remover los productos de inhibición selectivos que se encuentran en la fase acuosa. Esta clase de biorreactores ha demostrado ser efectiva para la degradación de altos niveles de contaminantes orgánicos, utilizándose en la remediación de aguas, suelos y aire. Por ejemplo, la fase orgánica permite disminuir la concentración de contaminantes que inhiben la degradación de tolueno, benceno y xilenos (Collins y Daugulis, 1997).

1.5 MINI BIORREACTORES

La evolución normal de todo proceso biotecnológico (desde su concepción hasta la operación a escala comercial del mismo) tiende a seguir las siguientes escalas o niveles de operación: nivel laboratorio, nivel semi-piloto o piloto y nivel de producción. En el nivel de laboratorio se pretende demostrar o alcanzar la factibilidad técnica del proceso; el nivel piloto o semi-piloto tiene como finalidad reafirmar la factibilidad técnica y visualizar la factibilidad económica del mismo y por último, el nivel de producción tiene como objetivo la comercialización redituable de dicho proceso. A nivel laboratorio, en el que la factibilidad técnica es premisa y la investigación básica es fundamental. Es en esta etapa en la que se deben estudiarse los efectos de las distintas variables de operación (calidad y composición del medio de cultivo, fuerza iónica o pH del mismo, tipos de microorganismos genéticamente manipulados o no, temperatura, concentración de

CO₂ y O₂ disueltos, fuerza de corte ejercida por la agitación, potencia de agitación, K_La del sistema de fermentación, etc.) sobre los rendimientos y concentración máxima de producto alcanzada. Por su parte, en el nivel piloto como en el comercial, se agregaran a los anteriores los Ingenieros Químicos, Ingenieros Bioquímicos o Biotecnólogos que serán los principales encargados de realizar el escalamiento de los datos (obtenidos a nivel laboratorio) a planta piloto y escala comercial (Reisman, 1993)

El éxito debe analizarse desde dos puntos de vista: el científico y el comercial o industrial. Para alcanzar el primero deben mantenerse en ambas escalas todos los parámetros que caracterizan al proceso, tales como velocidades de transferencia de masa y calor, velocidades de movimiento del fluido, gradientes de concentración y de temperatura. Números adimensionales tales como el número de Reynolds (Re), número de potencia (Np), etc. Mientras que el éxito industrial se alcanza cuando los volúmenes y costos de producción traen consigo ganancia y competitividad comercial a pesar que no se mantengan algunas relaciones de proceso en el escalamiento, éste es el éxito comercial, puede verse entonces desde el punto de vista tiempo y dinero (Johnston y Thring, 1957)

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

El diseño de bioprocesos requiere obtener información relevante en el menor tiempo posible y al menor costo. El uso de plataformas de mini-biorreactores es una alternativa para evaluar el efecto de las condiciones de operación en la bioconversión de cetonas bicíclicas a sus correspondientes lactonas utilizando líquidos iónicos como fase dispersa.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la bioconversión de cetonas bicíclicas en un sistema multifásico a bajo costo utilizando *Escherichia coli* TOP10 pQR239 en mini-biorreactores de 100 mL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el comportamiento hidrodinámico y transferencia de masa en los mini-biorreactores de 100 mL (P_g/V , K_{La} , d_{32}).
- Evaluar la bioconversión de cetonas bicíclicas a sus correspondientes lactonas en un módulo de mini-biorreactores de 100 mL en sistema bifásico y multifásico a diferentes condiciones de operación.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

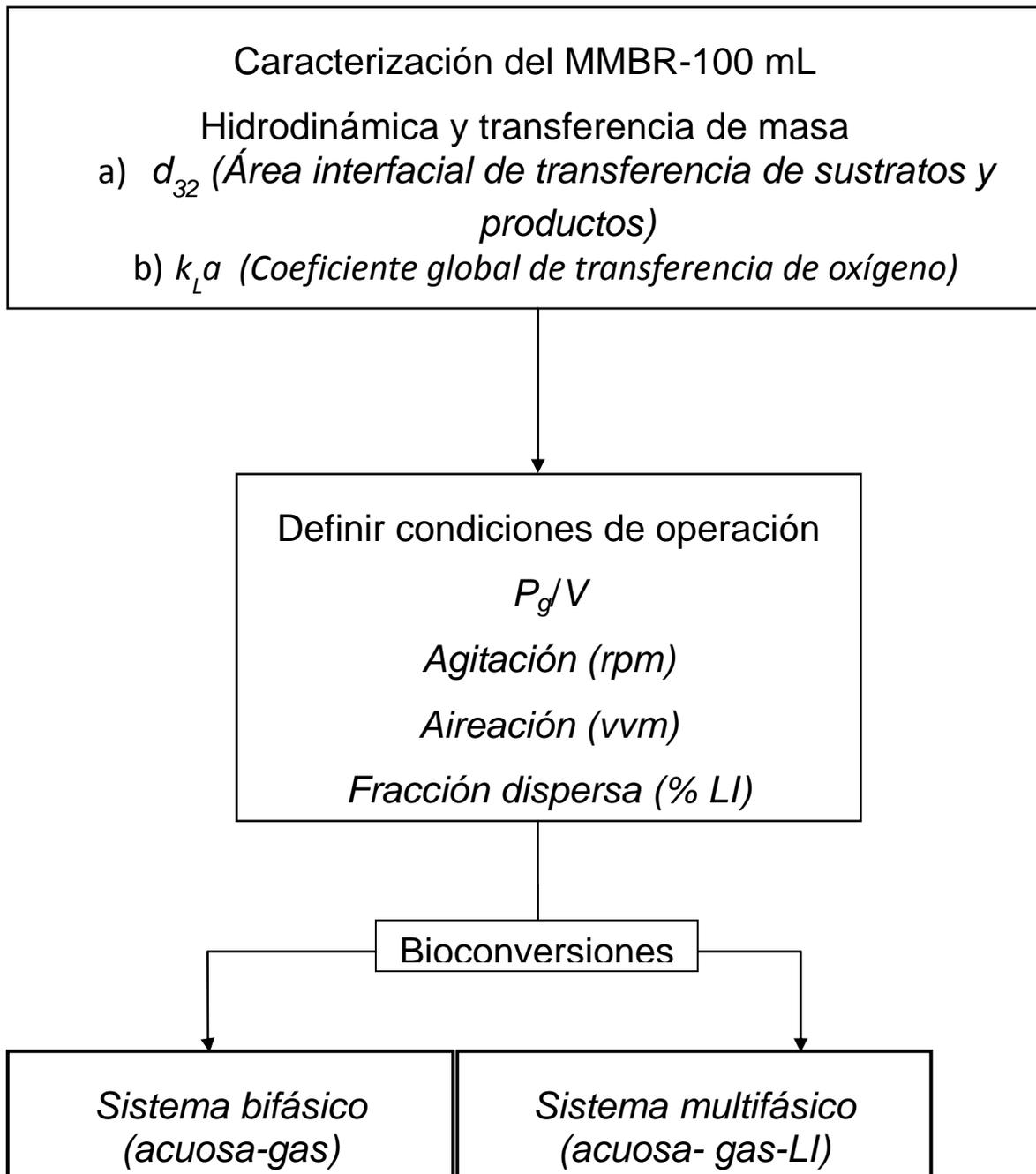
HIPÓTESIS

El uso de mini-biorreactores de 100 mL permitirá evaluar el efecto de las condiciones de operación en la bioconversión de cetonas bicíclicas a sus correspondientes lactonas obteniendo información relevante para estudios a otras escalas.

CAPÍTULO 5

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental, fue caracterizar la hidrodinámica y la transferencia de masa del MMBR-100 mL. Determinando experimentalmente las condiciones de operación, posteriormente realizar las bioconversiones en sistema bifásico y multifásico.



CAPÍTULO 6

MATERIALES

Y

MÉTODOS

6.1 REACTIVOS

Se utilizó cetona bicíclica [3.2.0] hept-2-to-6-one ($\geq 98\%$) y lactona bicíclica (1S,5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona ($\geq 99.0\%$) (Fluka, Switzerland) como estándares de sustrato y producto, respectivamente. También se utilizó Triptona de caseína, extracto de levadura, NaCl, and glicerol suministrado por Sigma Aldrich (EUA).

6.2 MICROORGANISMO

La cepa que se utilizó como biocatalizador para llevar a cabo la reacción tipo Baeyer-Villiger fue *Escherichia coli* TOP10 pQR239 (Doig y col., 2001), fue proporcionada por el Profesor John M. Ward del University College London (UCL) del Reino Unido. Para la producción del inóculo se utilizó el contenido de una ampollita liofilizada de *E. coli*, para cada uno de los matraces bafleados de 250 mL con 70 mL de medio de cultivo y 1.0 mL de ampicilina estéril. Los matraces se incubaron en agitación a 250 rpm durante 12 horas a 37°C. La biomasa se observó mediante el método de densidad óptica ($DO_{650\text{ nm}}$) con un espectrofotómetro Shimadzu 1800 U-V. A una densidad de 0.2 se indujo la CHMO con L-arabinosa. Las células se cosecharon cuatro horas después de la inducción de acuerdo a la metodología reportada por Doig y col. (2002). Una vez cosechadas las células, éstas se centrifugaron a 5500 rpm (centrífuga Beckman Coulter Allega 25R) durante 15 minutos a 4 °C y se re suspendieron en buffer de fosfatos 50 mM a pH 7, para un segundo lavado. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se almacenó a 4 °C para su posterior o inmediato uso.

6.3 LIOFILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

Para la conservación de las células se utilizó el método de liofilización. Empleando una concentración de 1 gb/L, se re suspendieron 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. El tiempo de liofilización fue

aproximadamente de 6 h. Una vez terminado este proceso, las ampollas se conservaron a temperatura ambiente y fueron utilizadas para inocular aproximadamente un matraz con 100 mL de medio de cultivo.

6.4 HIDRODINÁMICA DE LOS MINI BIORREACTORES DE 100 ML

Las tasas de agitación (750, 1050, 1350, 1650 y 1950 rpm) de los mini biorreactores se midieron con un Tacómetro, obteniendo así las lecturas en revoluciones por minuto. La potencia consumida (en Watts) se determinó con dos multímetros conectados directamente a los motores de las flechas de los impulsores, se midió directamente los volts y amperes de los motores a las diferentes condiciones de operación estudiadas. Se obtuvo un blanco de las mediciones con el biorreactor vacío para considerar las pérdidas que ocurren en el sistema de agitación. El diámetro de gota de la fase dispersa (5, 12.5 y 20 % v/v) se midió en un equipo de reflectancia óptica 3D ORM.

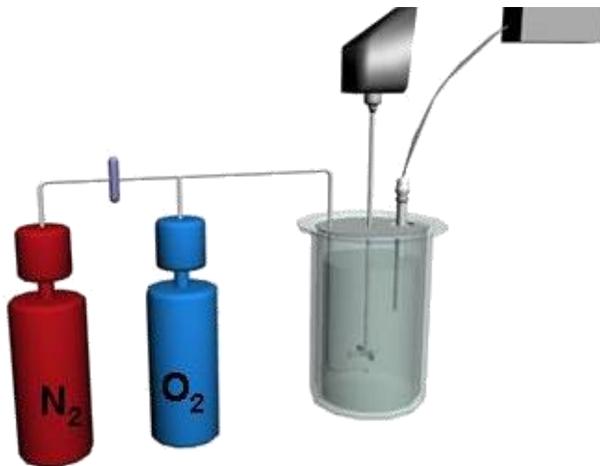
6.5 BIOCONVERSIÓN

El medio de reacción fue una solución de fosfatos 50 mM pH7, con 10 g L⁻¹ de glicerol. La bioconversión se llevó a cabo en volumen de operación de 70 mL, 0.67 g/L de sustrato y 3 g/L de biomasa a una temperatura de 30 °C. Se tomaron muestras cada 5 minutos durante 30 minutos y después cada hora hasta 6 h. Por cromatografía de gases se obtienen las áreas de sustrato y producto. La interpretación de datos se llevó a cabo en una hoja de cálculo en Excel.



Figura 5. MMBR-100 mL

6.6 COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA PARA OXÍGENO (K_{La})



Factores	Condiciones
Agitación	750, 1050, 1350, 1650 y 1950 rpm
Aireación	1.4vvm
Fracción iónica	5, 12.5 y 20 %

Figura 6. Determinación de k_{La} por el método dinámico

6.6 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 usando como referencia el 100 % de saturación de oxígeno disuelto en la solución.

6.6.1. Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno

Una vez calibrado el electrodo se empleó 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 0% de saturación y se paso 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.

6.7. COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO ($K_L a$)

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 se aseguró una medición más confiable. El método consistió en eliminar el gas del biorreactor con N₂ hasta alcanzar el 0 % a saturación de oxígeno disuelto, posteriormente se burbujeó 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 método propuesto de Fuchs y col. (1971), asociado a una regresión no lineal para estimar el $K_L a$. Las condiciones de operación que se usaron en este experimento fueron las mismas que se emplearon y se describieron previamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El modelo incluye el tiempo de respuesta del electrodo.

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

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

Fase acuosa

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

En el electrodo

La constante del electrodo se define como:

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

Donde:

C_E es la concentración medida por electrodo

C_L es la concentración del líquido

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

t_R es el tiempo de medición del coeficiente de transferencia de masa de O_2

$K_L a$ 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:

$$Y_E = \frac{C_L^* - C_E}{C_L^* - C_{EO}}$$

Y_E es la concentración adimensional de lectura del electrodo

Y sustituyendo los balances de masa en el biorreactor y el electrodo.

Sustituyendo ecuaciones 1,2 y 3.

$$Y_E = \frac{(K_e \exp^{-K_L a(t)} - K_L a \exp^{-K_e(t)})}{K_L a - K_e}$$

El cálculo de los $K_L a$'s se llevaron a cabo con una regresión no lineal empleando el algoritmo Levenberg-Marquardt, el cual se resolvió en PolyMath 5.

6.8. DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO DE GOTA (d_{32})

Para determinar el área de transferencia entre la fase acuosa y la fase líquido iónico (A), el diámetro promedio de gota *Sauter* d_{32} (ecuación #) fue medido usando un Medidor de Reflectancia Óptica (3D ORM) analizador de partículas

(MTS, Messtechnik Schwartz). Para observar el efecto de las condiciones de operación sobre el tamaño de gota se utilizó un diseño de composición central de 10 corridas. Los experimentos se realizaron en mini biorreactores de 100 mL. Con un volumen de operación de 70 mL. La medición del d_{32} para las 10 corridas se realizó por triplicado a 30 °C. el diámetro promedio de gota *Sauter* d_{32} de la fase dispersa se calculó con la ecuación.

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3 n_i}{\sum d_i^2 n_i}$$

Donde:

A es el área de transferencia de masa de la fase dispersa ($A = 6 \varphi / d_{32}$)

φ es la fracción iónica en el reactor

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

7.1 HIDRODINÁMICA Y TRANSFERENCIA DE MASA DEL MMBR-100 ML, (P/V , d_{32} Y $k_L a$)

Para llevar a cabo la caracterización hidrodinámica y los estudios de transferencia de masa, se realizaron experimentos a diferentes condiciones de operación determinando P/V , $K_L a$ y d_{32} .

7.1.1 Potencia gaseada por unidad de volumen

Los resultados obtenidos para los experimentos de hidrodinámica usando [OMA][BTA] a diferentes concentraciones se muestran en la Figura 7. Tal como se esperaba para la dispersión del líquido iónico, se observó un aumento sobre el valor de consumo de potencia (P/V) al incrementarse la tasa de agitación. El orden de magnitud de los valores de P/V fue similar a los alcanzados por Nielsen y *col.* (2003). Por otro lado, no se observó un efecto significativo de la fracción de fase dispersa sobre el consumo de P/V a diferentes condiciones de agitación.

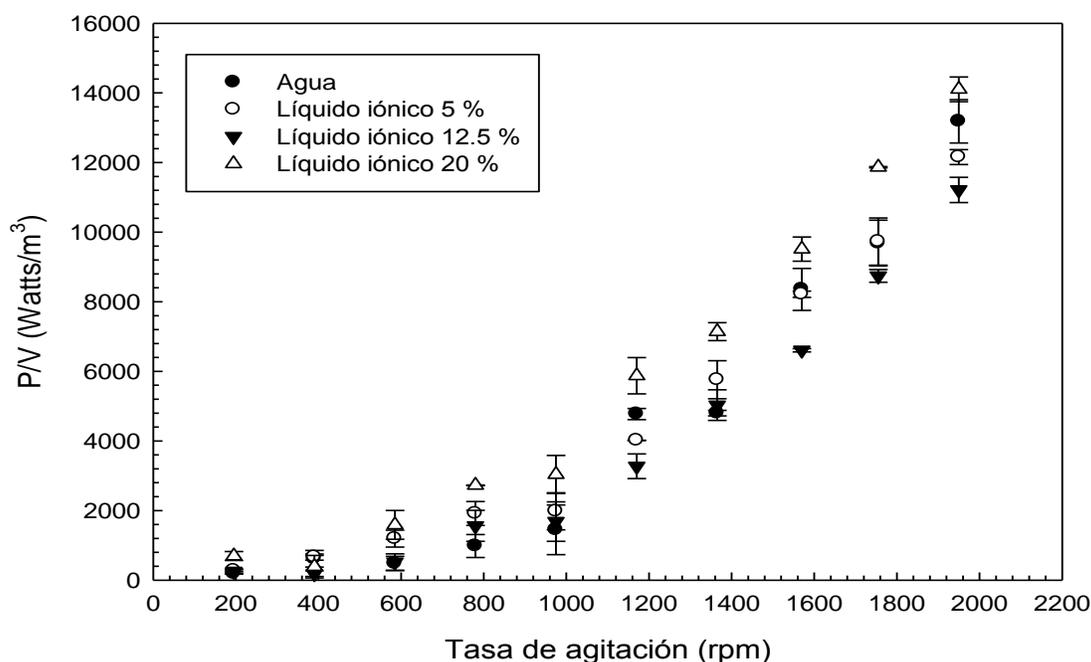


Figura 7. Efecto de la tasa de agitación y la fracción de fase dispersa en el consumo de potencia (P/V) en el MMBR – 100 mL.

7.1.2. Determinación del $k_L a$

El efecto de la la tasa de agitación y la fracción de fase dispersa ([OMA][BTA]) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) se muestra en la Figura 8.

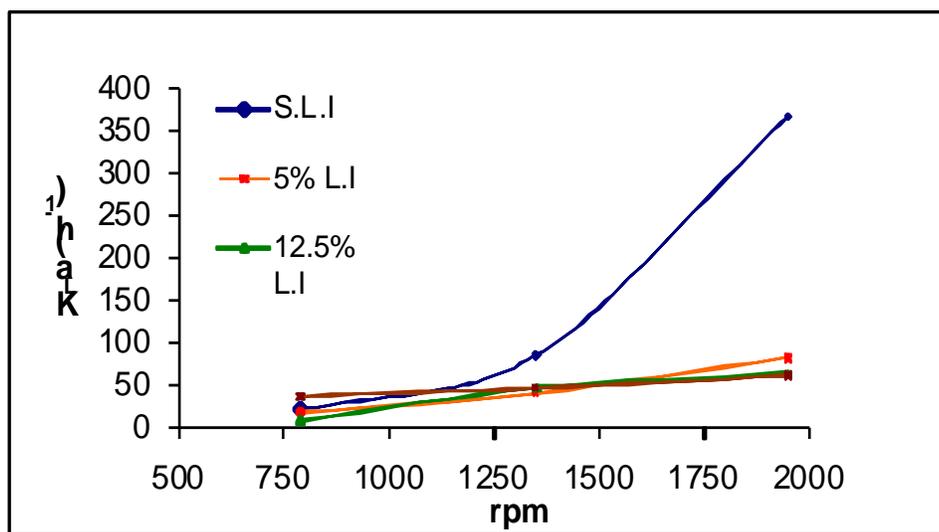


Figura 8. Efecto de la tasa de agitación y la fracción de fase dispersa sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L a$).

Se observa una disminución de los valores de $K_L a$ en presencia de la fracción de fase dispersa de líquido iónico. Sin embargo, no se observó un efecto significativo sobre el $K_L a$ cuando se incrementó la fracción de fase dispersa de 5 al 20% a diferentes condiciones de agitación. Los resultados obtenidos no concuerdan con los datos reportados por Nielsen y *col.* (2005) y Gomes y *col.* (2007), quienes mencionan que la adición de una fase orgánica incrementa el coeficiente de transferencia de masa de oxígeno al emplear una segunda fase líquida en un biorreactor de partición. Posiblemente debido a las propiedades fisicoquímicas del líquido iónico utilizado.

7.1.3 Determinación del d_{32}

El efecto de la tasa de agitación y la fracción de fase dispersa ($[OMA][BTA]$) sobre el tamaño de gota promedio *Sauter* (d_{32}) obtenido a diferentes fracciones iónicas se muestra en la Figura 9.

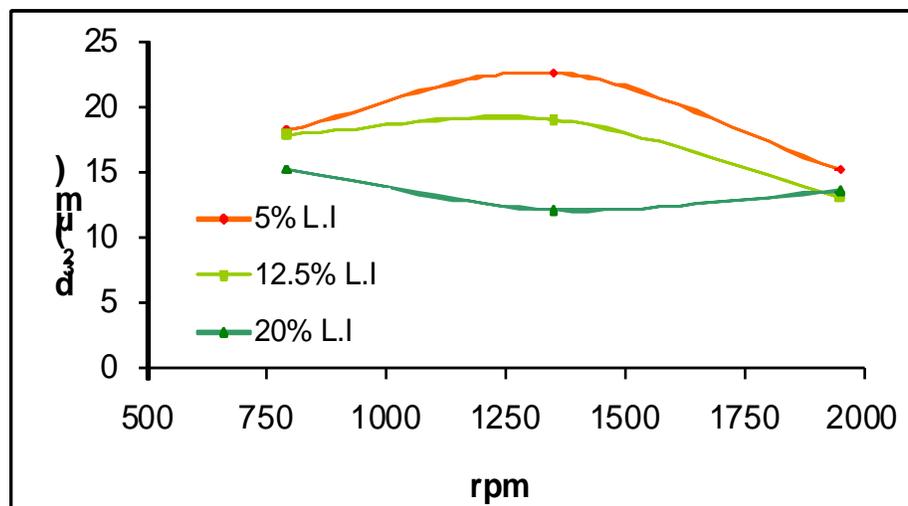


Figura 9. Efecto de la tasa de agitación y la fracción iónica sobre el d_{32} .

En sistemas donde se tiene una fase líquida dispersa en otra, es importante conocer el diámetro de gota debido a que a transferencia de masa es directamente proporcional al área de transferencia. En la Figura 10 se observa que a las tasas de agitación probadas no hay un cambio significativo en el d_{32} . Sin embargo, si se observó una disminución en los valores de d_{32} con el incremento de la fracción de fase dispersa de líquido iónico, esto puede ser debido a que al aumentar la fracción de líquido iónico se incrementa el contacto de la fase dispersa con el impulsor y se logran tamaños de gota más pequeños (Arellano, 2012). Otra variable importante a esta escala son los efectos de pared debido a la geometría del MMBR-100 mL.

7.2. BIOCONVERSIÓN EN SISTEMA BIFÁSICO (ACUOSA-AIRE)

Para estudiar la bioconversión en el sistema trifásico, primero se llevaron a cabo experimentos en el sistema bifásico (fase acuosa-aire) y poder observar efectos de inhibición por sustrato durante la bioconversión. En este tipo reacción BVMO ocurre inhibición por [S] y [O₂] a una concentración mayor a 0.4 g/L y a 1950 rpm.

7.2.1 Bioconversión sin inhibición

En la Figura 10 se presenta la cinética de bioconversión bajo condiciones de concentración no inhibitorias de [S] y [O₂].

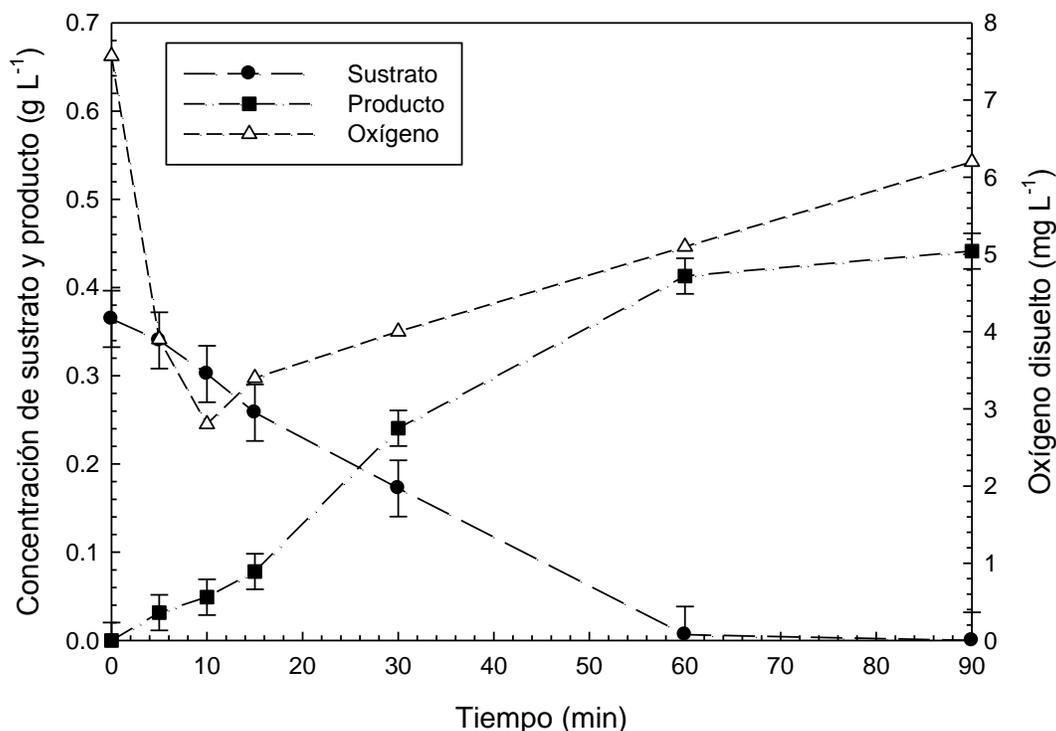


Figura 10. Cinética de bioconversión sin inhibición por sustrato u oxígeno a 1350 rpm y 1.4 vvm ($k_L a$ 120 h⁻¹), 3 g/L de biomasa y 0.35 g/L de sustrato.

A las condiciones de operación: tasa de aireación 1.4 vvm y una tasa de agitación de 1350 rpm (k_La 120 h^{-1}), y empleando 3.0 g/L de biomasa y 0.35 g/L de sustrato, se observó una bioconversión de 100%.

7.2.2 Bioconversión con inhibición por sustrato

En la Figura 11 se presenta la cinética de bioconversión bajo condiciones de inhibición por sustrato.

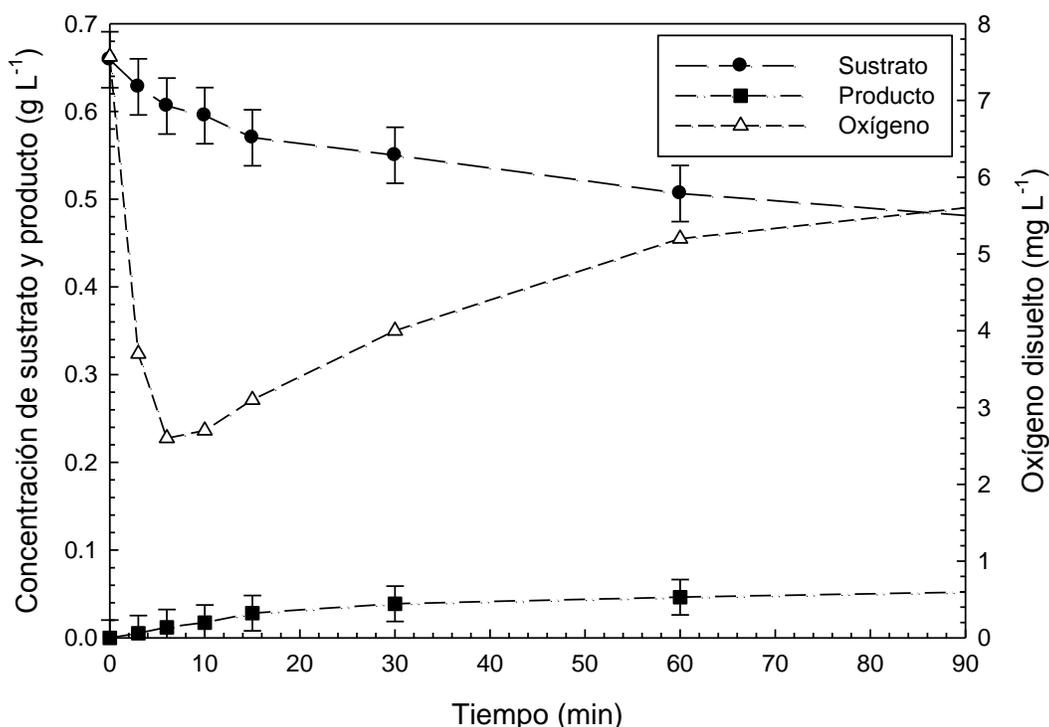


Figura 11. Cinética de bioconversión presentando inhibición por [S] a 1350 rpm y 1.4 vvm (k_La 120 h^{-1}), 3 g/L de biomasa y 0.7 g/L de sustrato

Las condiciones de operación fueron: tasa de aireación 1.4 vvm y una tasa de agitación de 1350 rpm (k_La 120 h^{-1}), y empleando 3.0 g/L de biomasa y la concentración de sustrato se aumentó al doble, 0.7 g/L. Se observó una notable reducción de la bioconversión. Alphandy *col.* (2003) reporta que el mecanismo de biorreacción Baeyer-Villiger presenta inhibición por sustrato y producto a una

concentración mayor a 0.4 g/L (Doig *et al.*, 2002b). Torres-Martínez y col, (2010) observó inhibición a 0.55 g/L.

7.2.3 Bioconversión por inhibición por oxígeno

En la Figura 12 se presenta la cinética de bioconversión bajo condiciones de inhibición por oxígeno.

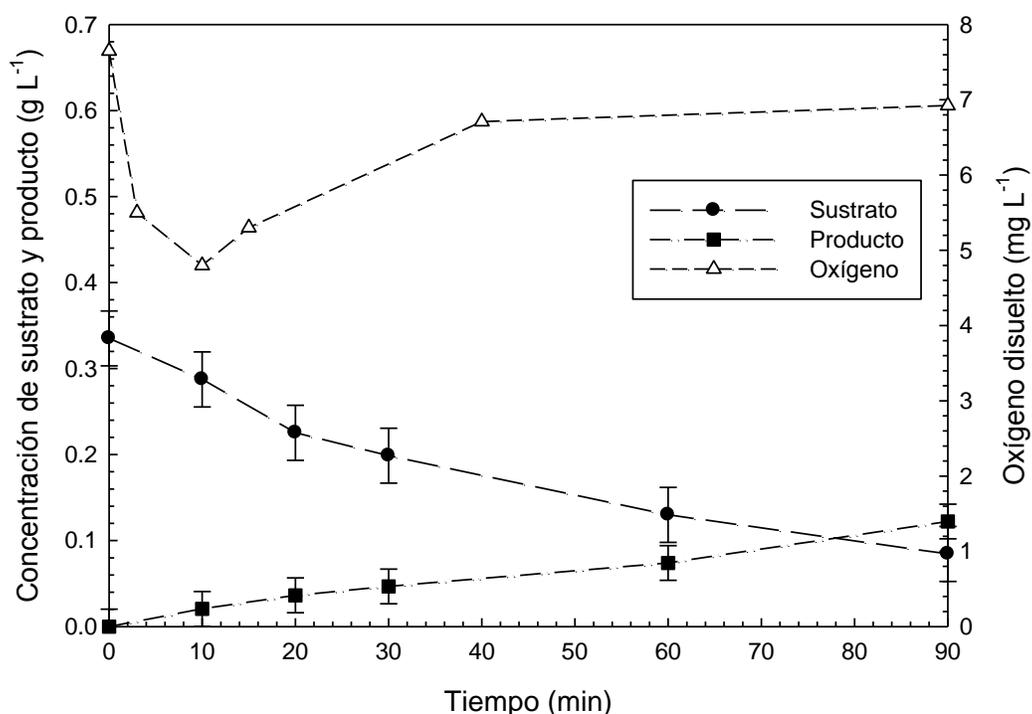


Figura 12. Cinética de bioconversión presentando inhibición por $[O_2]$ a 1950 rpm y 1.4 vvm ($k_L a$ 360 h⁻¹), 3 g/L de biomasa y 0.35 g/L de sustrato

Las condiciones de operación fueron: tasa de aireación 1.4 vvm y una tasa de agitación de 1950 rpm ($k_L a$ 360 h⁻¹), y empleando 3.0 g/L de biomasa y una concentración de sustrato de 0.35 g/L. No se consideró estudiar el estrés hidrodinámico debido a que dadas las condiciones del medio no se presenta crecimiento celular; además, el tiempo de bioconversión es corto. Por otro lado, se

observó que la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por arriba de 4.5 mg/L, debido posiblemente al incremento en la tasa de transferencia de oxígeno al aumentar el k_{La} y la inactivación de la CHMO por oxidación. Doig y col. (2001) reportan que la inducción de la CHMO en la célula debe tener concentraciones de O_2 disuelto por debajo del 10%. Bennett en 2004, observó que el exceso de O_2 provoca la oxidación de residuos de serinas de la CHMO, generando una distorsión conformacional permanente e inactivándola. Opperman y Reetz en 2010, diseñaron una CHMO plegando los amino ácidos superficiales susceptibles a oxidación al interior de la enzima y mantuvo actividad del 40% en H_2O_2 (0.2 M), mientras que la CHMO silvestre perdió toda actividad.

7.2.4 Análisis global del sistema bifásico

En la Figura 13 se presenta una gráfica comparativa de los experimentos en el sistema bifásico (fase acuosa-aire).

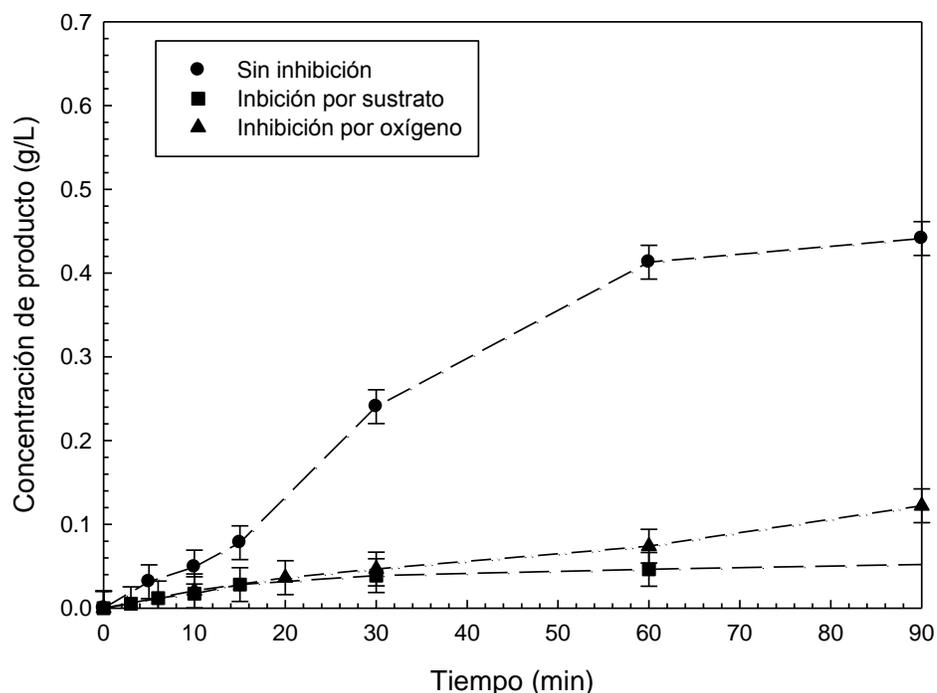


Figura 13. Gráfica comparativa de bioconversiones sin inhibición (●) y con inhibición por sustrato (■) y oxígeno (▲).

Se observa que la inhibición por sustrato al incrementar su concentración de 0.35 a 0.7 g/L, tuvo un mayor efecto que la inhibición por oxígeno cuando se incrementó el coeficiente de transferencia de masa de oxígeno ($k_L a$) de 120 a 360 h^{-1} al variar la tasa de agitación. Doig y col. (2003) también reportan bioconversiones del 100 % utilizando solamente 1 g/L de biomasa y 0.4 g/L de sustrato en un biorreactor de 1.0 L. Torres-Martínez (2010) obtuvo una bioconversión de 29 % utilizando 3 g/L de biomasa y 0.4 g/L de sustrato en un biorreactor de 1 L a 0.5 vvm, posiblemente el sistema estuvo limitado por oxígeno.

7.3 BIOCONVERSIÓN EN SISTEMA MULTIFÁSICO (acuosa, aire y líquido iónico)

Finalmente se llevaron a cabo la bioconversión en el sistema trifásico. Las condiciones de operación fueron: tasa de agitación 1350 rpm, 1.4 vvm, 5% de fracción iónica y 0.7 g/L de sustrato. En la Figura 14 se presenta la cinética de bioconversión en concentración total de sustrato y producto en el sistema.

Se observa una bioconversión del 61 % a las 6 horas. A pesar de utilizar 0.7 g/L de sustrato, no se presenta el efecto de inhibición de sustrato que se observó en el sistema bifásico, probablemente debido al efecto de partición del sustrato entre la fase acuosa y la fase iónica (dispersa). Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en la literatura (Tabla 1), podemos observar que la bioconversión obtenida en este trabajo fue ligeramente superior a la reportada por Torres Martínez (2010) con 5% de la misma fase dispersa ([OMA][BTA]) pero utilizando 5 g/L de biomasa y 0.55 g/L de sustrato. Sin embargo, Simpson y col. (2001) reportaron una bioconversión del 70 % utilizando 10 % de polímero (OPTIPORE-493) como fase dispersa y 17 g/L de biomasa en matraces agitados con 20 g/L de sustrato global.

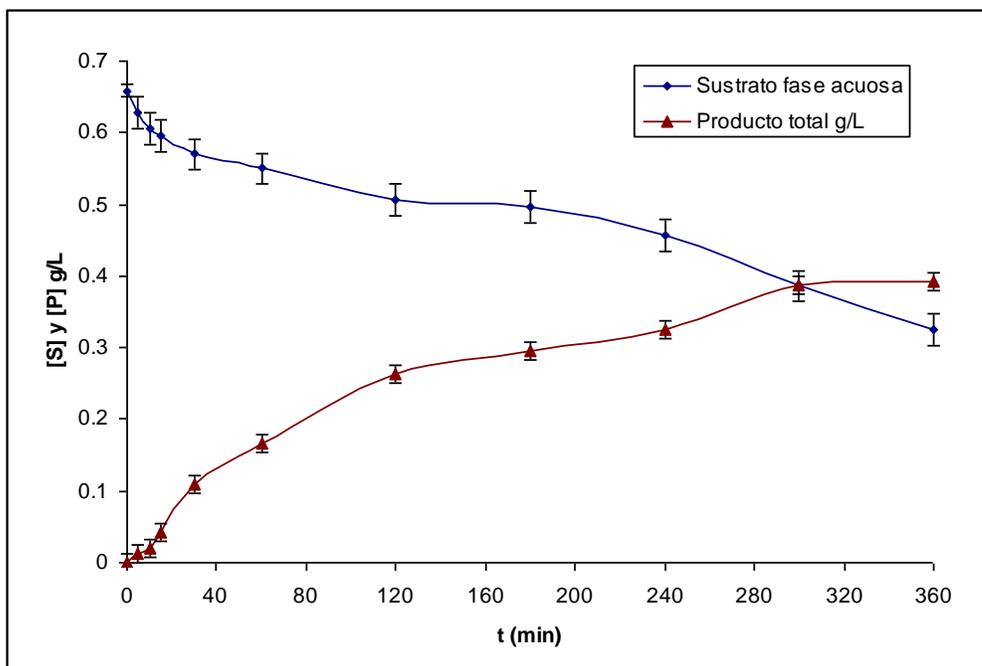


Figura 14. Cinética de bioconversión en sistema multifásico a 1350 rpm, 1.4 vvm, 5% de fracción iónica y una concentración de sustrato global de 0.7 g/L.

Tabla 1. Referencias comparativas en bioconversiones multifásicas

REFERENCIA	CONDICIONES	FASE DISPERSA	CONVERSIÓN
Simpson y col., 2001	20 g/L Sustrato 17 g/L Biomasa Matraces agitados	OPTIPORE L – 493 10%	70 %
Torres Martínez., 2010	0.55 g/L Sustrato 5 g/L Biomasa Reactor de 1 L a 1.0 vvm	[OMA][BTA] (5 %)	55%
Este trabajo	0.7 g/L Sustrato 3 g/L Biomasa MMBR-100 mL a 1.4 vvm	[OMA][BTA] (5 %)	61%

Es importante mencionar que el MMBR-100 utilizado en este trabajo permitió evaluar la bioconversión de cetonas a diferentes condiciones de operación en los sistemas bifásicos y multifásicos, a bajos costos y en menor tiempo.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. El menor diámetro de gota (d_{32}) se obtuvo a 20 % de fracción iónica y 1350 rpm, 1.4 vvm, a estas condiciones se tuvo la mayor área disponible para transferencia de sustrato y producto de fase iónica a acuosa. La aireación puede tener un efecto coalescente en el líquido iónico.
2. Se obtuvieron K_La 3 veces menores al adicionar el 5% de la fase dispersa en relación a la fase acuosa.
3. La bioconversión en el sistema bifásico sin inhibición por sustrato y O_2 fue del 100 %.
4. La bioconversión en sistema multifásico permitió incrementar dos veces más la concentración de sustrato en el sistema manteniendo niveles no inhibitorios en fase acuosa, logrando una bioconversión del 60 %.
5. El MMBR-100 permitió evaluar la bioconversión de cetonas a diferentes condiciones de operación en los sistemas bifásicos y multifásicos, a bajos costos y en menor tiempo.

Perspectivas

- ✓ Este trabajo aporta bases para incrementar la productividad de lactonas mediante la fracción iónica.
- ✓ Estas condiciones de operación podrían ser usadas para estudiar la bioconversión en otras escalas mayores.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Aiba S., Shoda M. and Nangatani M. 1968. Kinetics of production Inhibition Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 10: 845-864.
2. Alphand V., Carrea G., Wohlgemunth 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.
3. Arellano González M. Angel. 2012. Estudio de transporte de momento y masa de un biorreactor de partición de tres fases (agua, aire y líquido iónico), utilizando dinámica de fluidos computacionales (CFD), para escalamiento descendente. Tesis de Maestría en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana, México. D.F.
4. 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.
5. Bennet, A 2004. Mechanism of Oxidative Inactivation of *Acinetobacter sp.* NCIMB 9871. Cyclohexanone Monooxygenase. J. Undergraduate Research. 6(1)
6. Colling Ratledge and Bjorn Krinstiansen. 2006. Biotecnología básica segunda edición, Editorial Acriba, S.A. Zaragoza (España).
7. Collins L. D. and Daugulis A. J. 1997. Characterization and optimization of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol. *Appl. Microbiology and Biotechnology*. Vol. 48: 18-22.
8. Docherty K. M., Heberler S.Z., Kulpa C.F. An assessment of ionic liquid mutagenity using the Ames Test. *Green Chemistry*, 8:560-567.
9. Doig S., O' Sullivanb M., Patelb S. and Wardb J. 2001. Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 28:265-274.
10. Doig S., Pickering S., Lye G. J. and Woodley J. 2002. The use of micro-scale processing technologies for quantification of biocatalytic Baeyer-

- Villiger oxidation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 80(1): 42-49.
11. Dorland. 2005. Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. 30^o Edición, Elsevier España, S.A. Madrid España. pp.234.
 12. Gomes N., Aguedo M., Teixeira J. and Belo I. 2007. Oxygen mass transfer in in a biphasic medium: influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 35:380-386
 13. Jonnston and Thring. 1957. "Pilot plants models and scale – up methods". Mc Graw – Hill Book Company, N.Y., Toronto, London.
 14. Koshkin N. I. Shirke vich M.G. 1975. Manual de Física Elemental, Editorial Mir. ISBN. Pag. 74,76, 85-86.
 15. Latala A., Stepnowski P., Nedzi M., Mroziak W. 2005. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae *Oocytissubmarina* and *Cyclotellameneghiniana*. *Aquatic Toxicology*, 73:91-98.
 16. Lou WY, Zong MH, Smith T.J. 2006. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of methyltrimethoxysilane for efficient synthesis of enantiopure (S)-1-trimethylsilyl ethanol. *Green Chemistry*, 8:147-155.
 17. Malinowski J. J., 2001. Two- phase partitioning bioreactors in fermentation technology. *Biotechnology Advances*, Vol. 19: 525-538.
 18. Melgarejo Torres Rodrigo. 2010. Análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases mediante la determinación de tiempos característicos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
 19. Moo-Yung M, Blanch H. W. 1981. Design of biochemical reactors mass transfer criteria for simple and complex systems. *Adv. Biochem. Eng.*, 19:1-69.

20. Muñoz R., Villaverde S., Guieysse B., Revah S. 2007. Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds. *Biotechnology Advances*, 25:410-422.
21. Operman D.J., Reetz MT. 2010. Towards practical Baeyer-Villiger monooxygenases: design of cyclohexanone monooxygenase mutants with enhanced oxidative stability, 10;11(18):2589-96
22. Nielsen D. R., Daugulis A.D., Mc Lellan P.J. 2003. A Novel Method of simulation Oxygen Mass Transfer in Two-phase partitioning Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 91: 773 -777.
23. Nielsen D. R., Daugulis A.D., Mc Lellan P.J. 2005. A Restructured Framework for modeling Oxygen Mass Transfer in Two-phase partitioning Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 83(6): 735-742
24. Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I. 2003. Anti- microbial activities of ionic liquids. *Green Chemistry*, 5:52-56.
25. Pfruender H., Jones R., Weuter-Botz D. 2006. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 124:182-190.
26. 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.
27. Reisman, H. B. 1993. Problems in scale – up of biotechnology production processes. *Critical Rev. in Biotech.* 13 (3): 195 – 253.
28. Simpson, H.D., Alphand, V., Furstoss, R. 2001. Microbiological transformations: Asymmetric biocatalysed Baeyer-Villiger oxidation: improvement using a recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst in the presence of an adsorbent resin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 16(2): 101-108.
29. Song C.E. 2004. Enantioselective chemo- and bio catalysis in ionic liquids. *Chemical Communications*, 9:1033-1043.

30. Stepnowsky P., Zaleska A. 2005. Comparison of different advanced oxidation process for the degradation of room temperature ionic liquids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 170:45-50.
31. Torres-Martínez D., Melgarejo-Torres R., Gutiérrez-Rojas M., Aguilera-Vazquez 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. 42: 376- 383.
32. Torres-Martínez Daniel. 2010. Biotransformación de cetonas cíclicas empleando líquidos iónicos en un bioreactor de partición. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UAMI.
33. Yang Z. and Pang W. 2005. Ionic liquids: Green solvents for non-aqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 37: 19-28.
34. Wright J. C., Hu T, McLachlan J. L., Needham J. and Walter J. A. 1996. Biosynthesis of DTX-4: confirmation of a polyketide pathway proofs a Baeyer-Villiger oxidation step, and evidence for an unusual carbon deletion process. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118: 8757-8758.
35. Zhao G., Zhou L., Li Y., Liu X., 2009. Enhancement of phenol degradation using immobilized microorganisms and organic modified montmorillonite in a two-phase partitioning bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 169:402-410.
36. Zilouei H., Guieysse B., Mattiasson B. 2008. Two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of high concentrations of pentachlorophenol using *Sphingobium chlorophenicum* DSM 8671. *Chemosphere*, 72:1788-1794.