

Mecanismos de Transferencia de Masa, Cinético y de Desactivación de un Biorreactor de Partición de Tres Fases Empleando Células Completas

Rodrigo Melgarejo-Torres^{1*}, Carlos O. Castillo-Araiza ², Mariano Gutiérrez-Rojas¹, Sergio Huerta-Ochoa¹

¹*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México D.F., México.*

²*Grupo de Procesos de Transporte y Reacción en Sistemas Multifásicos. Dpto. de IPH, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, México D.F., México.*

E-mail: rmt_melto2003@yahoo.com.mx

RESUMEN

La bioconversión de la cetona bicíclica ((±)-cis-biciclo [3.2.0] hept-2-en-6-ona) a su correspondiente lactona (reacción tipo Baeyer-Villiger) puede llevarse a cabo mediante células completas utilizando la cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239, la cual sintetiza la enzima intracelular ciclohexanona monooxigenasa (CHMO). Este tipo de biotransformaciones se favorece con la adición de una segunda fase líquida (líquido iónico) empleando un biorreactor de partición de tres fases (BPTF) incrementando la productividad específica del proceso. En esta revisión, resumimos los aspectos más importantes de los fenómenos involucrados que se presentan en un BTPF. La velocidad de biotransformación de la cetona bicíclica considerando inhibición por sustrato y exceso de oxígeno puede predecirse mediante el desarrollo de un modelo micro cinético. De los estudios de hidrodinámica del sistema trifásico en la bioconversión de la cetona bicíclica se obtienen correlaciones matemáticas para expresar el coeficiente de transferencia de oxígeno y el diámetro promedio *Sauter*, d_{32} , en función de las variables de operación (agitación, aireación y fracción de fase dispersa). El desarrollo un modelo matemático que considera tanto los fenómenos de transferencia de masa, hidrodinámica del sistema, así como la cinética de biotransformación y desactivación celular hace posible predecir y describir la biotransformación de cetonas bicíclicas a lactonas. Llevando a cabo un análisis de régimen en el biorreactor de partición a través de la determinación de los tiempos característicos de los mecanismos involucrados permite definir la etapa limitante del sistema. Finalmente mediante la integración de todos estos elementos, se pueden desarrollar estrategias de técnicas de escalamiento ascendente o descendente que sirvan de base para escalar este tipo de bioprocesos.

Palabras clave: *Biorreactor de partición, transferencia de masa, micro cinética, desactivación celular, líquidos iónicos.*

ABSTRACT

The bioconversion of the bicyclic ketone ((±)-cis-bicyclo [3.2.0] hept-2-in-6-one) to their corresponding lactones (Baeyer-Villiger reaction) can be performed using whole-cell using the strain *Escherichia coli* TOP10 pQR239, which synthesizes the intracellular enzyme cyclohexanone monooxygenase (CHMO). This type of biotransformation is favored with the addition of a second liquid phase (ionic liquid) using a three phase (aqueous-ionic liquid-air) partitioning bioreactor (TFPB) by increasing the specific productivity of the process. In this review, we summarize the most important aspects of the involved phenomena that occur in a BTPF. The biotransformation rate of the bicyclic ketone taking into account both substrate inhibition and inactivation by excess of oxygen can be predicted through the development of micro kinetic model of the reaction. Hydrodynamic studies in the three-phase system during the bioconversion of the bicyclic ketone, mathematical correlations can be obtained to express the oxygen transfer coefficient and the *Sauter* mean diameter, d_{32} , in terms of operation variables (agitation, aeration, and dispersed phase fraction). The development of a mathematical model that considers mass transfer phenomena, hydrodynamics, as well as the bioconversion kinetics and cell deactivation makes it possible to predict and describe the biotransformation of bicyclic ketones to lactones. Carrying out a regime analysis in the partitioning bioreactor through the determination of the characteristic times of the involved mechanisms defines the limiting step of the system. Finally through the integration of all these elements, new strategies can be developed for scaling up or down, which serve as a basis to scale this type of bioprocesses.

Key words: *Partitioning bioreactor, mass transfer, micro kinetics, cell deactivation, ionic liquids*

BIOCONVERSIÓN DE LACTONAS

Las lactonas, compuestos orgánicos del tipo éster cíclico, son importantes en alimentos, medicina y cosmética. Algunas de ellas se aplican en medicina como antiinflamatorios debido a su actividad citotóxica *in vitro* contra células de melanoma de ratón y cáncer de pulmón humano

(Arakawa *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2008). Además, un cierto tipo de lactonas se utiliza en la industria alimentaria como un componente esencial de sabor en el añejamiento de bebidas alcohólicas como whisky, coñac y brandy, entre otros (Boratynski *et al.*, 2013). La bioconversión de cetonas en ésteres y lactonas fue descrita hace más de un siglo por Adolf von Baeyer & Victor

Artículos

Villiger (Baeyer & Villeger, 1899). La oxidación Baeyer-Villiger (BV) de cetonas cíclicas o acíclicas permite su transformación a la correspondiente lactona por oxidantes como el ácido peroxibenzoico y peróxido de hidrógeno. Estos oxidantes son intrínsecamente inestables y tóxicos que presentan falta de enantioselectividad (Strukul, 1998; Renz & Meunier, 1999). Hay rutas químicas y de biosíntesis que son utilizadas para llevar a cabo la oxidación BV, siendo la biosíntesis la más atractiva debido a su menor costo de energía al efectuar la reacción a temperaturas bajas, con poco o sin uso de solventes orgánicos, y una mayor quimio y enantioselectividad debido a la utilización de enzimas (Persson & Bornscheuer, 2003; Clouthier & Pelletier, 2012). La oxidación BV mediante biocatálisis se puede llevar a cabo

utilizando enzimas como la ciclohexanona monooxigenasa, CHMO, en sistemas de células enteras (Lee *et al.*, 2007). La CHMO de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 es una enzima bien conocida (Donoghue *et al.*, 1976). En la última década, se logró incrementar la tasa de oxidación de cetonas cíclicas mediante la clonación del gen que codifica la CHMO para obtener la cepa *Escherichia coli* TOP10 pQR239 (Doig *et al.*, 2001). La CHMO utiliza oxígeno molecular para mediar la oxigenación nucleofílica de cetonas lineales o cíclicas a sus lactonas correspondientes. Sin embargo, se observó inhibición por sustrato y producto para esta conversión utilizando células enteras con biciclo [3.2.0]hept-2-en-6-ona (Doig *et al.*, 2003); en particular, la reacción es inhibida

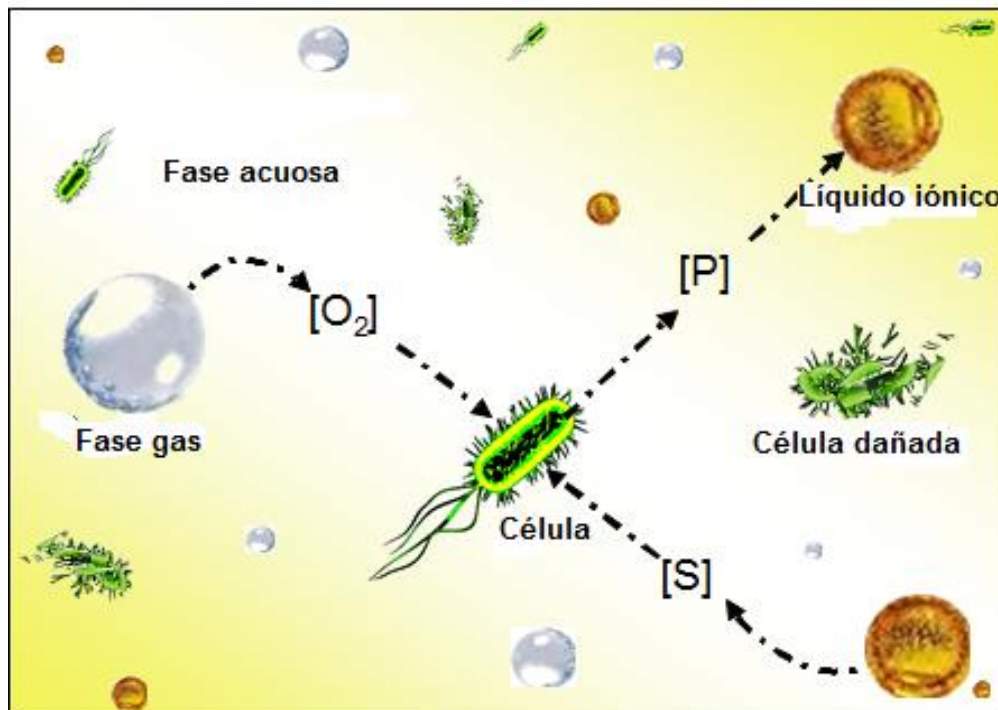


Fig. 1. Descripción de la transferencia de masa, cinética y pérdida de mecanismos de viabilidad de células que ocurre dentro de un biorreactor de partición de tres fases (Melgarejo-Torres *et al.*, 2015)

por concentraciones de cetona por encima de 0.4 g/L y lactonas regio-isoméricas combinadas a concentraciones por encima de 3.5 g/L. Por otro lado Bennett (2004) reportó que el exceso de oxígeno disuelto (OD) en el medio de reacción, provoca la formación de ácido sulfónico y un cambio permanente en la estructura de la enzima, debido a la oxidación de grupos SH de dos serinas periféricas en el sitio activo (Walsh & Latham, 1986), ocasionando así una inactivación por un exceso DO.

Se han propuesto diversas estrategias para evitar este tipo de limitaciones durante la bioconversión, tales como: alimentación continua de sustrato y la remoción de producto *in situ* usando resinas Lewatit (Geitner *et al.*, 2007); la encapsulación del biocatalizador para prevenir la oxidación de CHMO (Bučko *et al.*, 2011); el uso de líquidos iónicos (IL) como una fase inmiscible que funciona como depósito de sustrato y retiro del producto *in situ*, manteniendo el biocatalizador (células enteras) en la fase acuosa (Pfruender *et al.*, 2006); la co-inmovilización de CHMO en un soporte (Relizyme™ HA403) activado con glutaraldehído (Mallin *et al.*, 2013); cambiar la estructura molecular de la CHMO para ocultar las serinas susceptibles a la oxidación dentro de la enzima (Opperman & Reetz, 2010); entre otros. Sin embargo, una de las principales limitaciones en los sistemas heterogéneos de estas estrategias es la dificultad en el control de la transferencia de masa de sustrato, producto y oxígeno que impacta directamente en la productividad y la relación costo-beneficio.

Entre las alternativas para superar la inhibición de sustrato y de producto, además de la oxidación de la enzima Baeyer-Villiger monooxigenasa (BVMO) (Pfruender *et al.*, 2006; Geitner *et al.*, 2010; Bučko *et al.*, 2011), el concepto de biorreactores de partición parece tener un gran potencial para mejorar la productividad de muchos bioprocesos (Malinowski, 2001). La remoción de compuestos inhibitorios producidos durante el curso de una fermentación o bioconversión puede tener un efecto muy positivo sobre la tasa de reacción celular y puede también conducir a modos más eficientes de operación del biorreactor en términos de productividad y rendimiento que de otra forma no sería posible (Fig. 1). Por otro lado, recientes investigaciones involucrando biorreactores de partición se han enfocado también al suministro de sustratos tóxicos o poco solubles a una fase acuosa que contiene células. La estrategia utilizada consiste en la adición de un solvente orgánico biocompatible como una segunda fase líquida, el cual actúa como un reservorio del sustrato tóxico. Mediante la adecuada selección del solvente, es posible transferir este sustrato a la célula a niveles sub-inhibitorios basado solamente en el equilibrio de partición y la demanda metabólica de las células (Daugulis, 1997).

La productividad de la biocatálisis oxidativa en un sistema multifásico puede estar limitada por transporte de masa (oxígeno, sustrato y producto). Las tasas de transferencia de oxígeno y sustrato dependen de las propiedades físicas de los fluidos, temperatura, presión,

composición del medio, agitación, velocidad superficial del aire y configuración del biorreactor. Las tasas de transferencia de sustrato y producto en un sistema multifásico son función del diámetro de gota promedio *Sauter* (d_{32}), el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$), coeficientes de partición del sustrato y producto, y la solubilidad del oxígeno en el medio. Para un reactor de partición específico y el medio para la biorreacción, es posible incrementar el área superficial líquido-líquido, el $k_L a$, y consecuentemente las tasas de transferencia de masa, usando mayores tasas de agitación y aireación; sin embargo, esto causa consumos de potencia altos e incrementa de manera significativa los costos de operación. Altas tasas de agitación también constituyen una limitación cuando se usan células sensibles al estrés hidrodinámico.

Los líquidos iónicos pueden ser utilizados como un reservorio de sustrato y a la vez el solvente de extracción de producto *in situ* en un biorreactor de partición, sustituyendo a los solventes orgánicos y por lo tanto aumentando la eficiencia del proceso (De Gonzalo *et al.*, 2012). Opperman *et al.* (2011) revisó el uso de líquidos iónicos para sistemas de dos fases y su aplicación para la purificación, extracción y biocatálisis. Recientemente, se han publicado diferentes aplicaciones de líquidos iónicos en sistemas de dos fases para procesos de bioconversión (Dong-Xiang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, la productividad de la bioconversión tipo Baeyer-Villiger en un

sistema multifásico podría estar limitada por bajas tasas de transferencia de masa a través de las inter-fases (gas- líquido o líquido-líquido). Las tasas de transferencia de masa de sustrato y producto a través del área interfacial líquido-líquido dependen de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa. La determinación experimental *in situ* de coeficientes volumétricos de transferencia de masa en un biorreactor de partición es compleja. Sin embargo, pueden ser obtenidos mediante el estudio de mecanismos de transferencia de solutos a través de la interfase de líquido-líquido (Lewis, 1954) y la determinación de coeficientes globales de transferencia de masa usando un área interfacial constante. Al Dahham & Wicks (1996) resumen las modificaciones por varios autores a la Celda de Lewis para determinar coeficientes de transferencia de masa de los solutos a través de la interface en diferentes sistemas de dos fases (Woodley *et al.*, 1991; Biswas *et al.*, 1998; Srivastava *et al.*, 2000; Apreotesei *et al.*, 2003). Sin embargo, los reportes sobre la determinación de coeficientes de transferencia de masa en sistemas agua-líquidos iónicos son escasos.

HIDRODINÁMICA DE SISTEMAS BIFÁSICOS EN TANQUES AGITADOS

La predicción de transferencia de masa y calor y las tasas de reacción en sistemas agitados líquido-líquido requieren del conocimiento del área interfacial volumétrica. Cuando dos líquidos inmiscibles se mezclan, se

forma una dispersión en la que ocurren simultáneamente fenómenos de rompimiento y coalescencia de gotas. Eventualmente se establece un equilibrio dinámico local para el cual el tamaño de gota promedio y la distribución de tamaños de gota dependerán de las propiedades físicas de los líquidos, la fracción en volumen de la fase dispersa y de las condiciones de agitación (Calabrese *et al.*, 1986). Actualmente hay poca información disponible que relacione la hidrodinámica y el comportamiento de las fases de los procesos de bio-conversión bifásica en tanques agitados. El conocimiento del tamaño promedio de gota (d_{32}) y la distribución de tamaños de gota, en particular, es indispensable para la estimación del área interfacial volumétrica, a :

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

y de la tasa de transferencia de soluto entre las fases. Esta información, junto con los datos cinéticos de la reacción, es crítica para el diseño y operación del biorreactor. A la fecha, se conoce poco de cómo la distribución de tamaños de gota varía como una función del diseño y operación del reactor (Cull *et al.*, 2002).

En el estudio de la hidrodinámica de estos sistemas hay dos aspectos importantes a considerar. Uno es la uniformidad espacial, es decir, que el tamaño de gota promedio y la distribución del tamaño de gota debe ser independiente de la posición dentro del biorreactor. Se deberá determinar la velocidad

mínima de agitación en la cual la dispersión generada sea visualmente uniforme. El segundo aspecto es el tiempo, t_c , requerido para alcanzar el equilibrio termodinámico (rompimiento-coalescencia) después del cual el tamaño de gota promedio o la distribución de tamaños de gota no cambian (Pacek *et al.*, 1999). Este tiempo puede ser estimado a partir de la siguiente ecuación:

$$t_c = \frac{V}{Fl \cdot N \cdot D^3} \quad (2)$$

Las propiedades fisicoquímicas del medio pueden tener influencia en el tamaño de gota promedio y en la distribución del tamaño de gota. Cuando la viscosidad de la fase dispersa es pequeña, la fuerza de resistencia al rompimiento proviene únicamente de la tensión interfacial (Nienow, 2004). No obstante, una viscosidad alta de la fase dispersa, como es el caso de los líquidos iónicos, puede tener una influencia importante sobre el tamaño de gota promedio y la distribución del tamaño de gota (Calabrese *et al.*, 1986). Varios autores han correlacionado el diámetro promedio de gota Sauter (d_{32}) con el número de Weber, N_{We} , como se observa a continuación:

$$\frac{d_{32}}{D} = K_1 We^{-0.6} \quad (3)$$

donde:
$$We = \frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma}$$

Se han derivado relaciones similares para tomar en cuenta la disipación de la energía

viscosa de la fase dispersa durante el mecanismo de rompimiento:

$$\frac{d_{32}}{D} = K_2 We^{-0.6} \left[1 + K_3 V_i \left(\frac{d_{32}}{D} \right)^{1/3} \right]^{0.6} \quad (4)$$

donde:
$$V_i = \frac{\mu_d ND}{\sigma}$$

La ecuación (4) está limitada al caso de dispersiones diluidas, lo cual es una restricción importante desde el punto de vista práctico. Por lo tanto, el tamaño promedio de gota (d_{32}) y la distribución de tamaños de gota varían con el tipo de impulsor, fracción de la fase dispersa y propiedades del fluido (viscosidad, densidad, tensión interfacial).

TIPO DE IMPULSOR

Pacek *et al.* (1999) estudiaron la influencia del tipo de impulsor sobre el tamaño promedio de gota y la distribución de tamaño de gota para fases dispersas viscosas y no viscosas a fracciones volumen de 1 y 5% en recipientes agitados. Se encontró que para la misma tasa de disipación de energía específica promedio, impulsores con bajo número de potencia (tipo “*esfuerzos cortantes ultra-altos*” o “*flujos altos*”) produjeron tamaños de gota similares en el equilibrio, los cuales son mucho más pequeños que aquellos encontrados para dos impulsores que presentan “*esfuerzos cortantes altos*”, y números de potencia altos, esto es, la turbina Rushton estándar y otro impulsor de disco de seis paletas. Considerando que la tasa de

disipación de energía está confinada al volumen de barrido del impulsor, estos tamaños de gota en el equilibrio pueden ser correlacionados sólo de manera aproximada. Los impulsores con bajo número de potencia también alcanzan el equilibrio más rápidamente y la distribución de tamaño de gota en la dispersión producida es más cerrada que las producidas cuando se agita con turbinas tipo Rushton y el impulsor de disco de seis paletas. Los autores enfatizan la necesidad de un nuevo análisis del flujo en la región del impulsor y la inclusión de modelos avanzados de coalescencia.

Lovick *et al.* (2005) estudiaron la distribución de tamaños de gota utilizando agua y keroseno en un tanque agitado. Los autores encontraron que el tamaño de gota promedio a la altura del impulsor decrece con la velocidad del impulsor. Esta observación fue confirmada por Quadros y Baptista (2003) al estudiar la influencia del número de Weber sobre el tamaño de gota promedio y el área interfacial (ver Fig. 1) utilizando un impulsor de cuatro paletas.

FRACCIÓN DE LA FASE DISPERSA

Se ha reportado (Marcelis *et al.*, 2003) que para sistemas aceite-agua la fracción volumen no debe de exceder el 40% o se podría presentar una inversión de fases, es decir, la fase dispersa (aceite) convertirse en la fase continua. También se recomienda limitar la fracción volumen a niveles no mayores de 25% para fluidos originalmente no-Newtonianos, o bien que se conviertan en no-Newtonianos durante el proceso debido a la influencia de la

biomasa en la viscosidad de la dispersión. El efecto de la fracción de las fases sobre el diámetro promedio de gota se ha representado bajo la forma de un incremento lineal o una función de una potencia de la fracción volumen de la fase dispersa, ϕ ,

$$\frac{d_{32}}{D} = K_4(1 + K_5\phi) \cdot We^{-0.6} \quad (5)$$

Desnoyer *et al.* (2003) realizaron un estudio experimental de la distribución de tamaños de gota a altas relaciones de fases en dispersiones utilizando dos sistemas líquido-líquido, uno de baja y otro de alta tasa de coalescencia. Los autores intentaron representar sus resultados tomando en cuenta la dependencia de los exponentes obtenidos en función de la fracción de la fase dispersa (usando interpolación polinomial), así que las correlaciones resultantes cambian significativamente obteniéndose:

$$\frac{d_{32}}{D} = f(\phi) \cdot We^{-n(\phi)/2} \quad (6)$$

Los resultados mostraron que para cada fracción volumen estudiada, el diámetro promedio de la dispersión es una función decreciente de la ley de potencia del número de *Weber* con un exponente igual a -0.6 a bajas relaciones de fase. Sin embargo, para ambos sistemas estudiados el exponente del número de *Weber* es una función decreciente de la relación de fases. Estos resultados revelan la existencia de un mecanismo más complejo en condiciones de relación de fase altas. Quadros

& Baptista (2003) desarrollaron un nuevo modelo para predecir el área interfacial en un reactor continuo líquido-líquido, el cual puede potencialmente ser usado para diferentes configuraciones de reactores y sistemas de reacción. El modelo propuesto (ecuación 7) revela mejores resultados cuando se compara a las correlaciones reportadas en la literatura y puede ser usado en un intervalo amplio de velocidades de agitación comprendiendo el régimen de flujo transitorio y turbulento.

$$a = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{C_1}{We \cdot \phi}\right)^2\right]^{1/2}} (C_2\phi^2 + C_3\phi) \quad (7)$$

Las constantes C_1 , C_2 y C_3 son constantes ajustables referidas a las variables de operación normalizadas para cada tipo de impulsor. Çelik *et al.* (2004) estudiaron la biotransformación de 2-feniletanol a fenilacetaldehído en un sistema de dos fases. Debido a que el sistema utilizado no fue suficiente para eliminar el efecto de la inhibición por sustrato, los autores reportaron muy atractivo el uso de sistemas de dos fases operados en modo "lote alimentado" consecutivos, logrando incrementar la concentración de fenilacetaldehído de 4 a 7 g/L después de tres "fed-batches" consecutivos. Desafortunadamente, los autores no reportan estudios hidrodinámicos del sistema estudiado.

SISTEMAS TRIFÁSICOS

El uso de células enteras en biorreactores de partición (biodegradación de sustratos

tóxicos, biosíntesis orgánica, entre otros) requiere la adición de aire al sistema formándose un sistema trifásico líquido-líquido-gas. Estos sistemas provocan un replanteamiento de la hidrodinámica de las dispersiones líquido-líquido y de la transferencia de masa de sistemas convencionales líquido-gas. Para un sistema de biodegradación de sustratos tóxicos, Nielsen *et al.* (2003) desarrollaron una correlación empírica (ecuación 8) para representar el coeficiente de transferencia de oxígeno como una función de las condiciones de operación y la fracción orgánica (n-hexadecano) en dispersiones de dos fases, orgánica-acuosa. Los resultados mostraron que ante un incremento en la fase dispersa (fase orgánica), el coeficiente de transferencia de masa ($k_L a$) decrece, mientras que la tasa de transferencia de oxígeno se incrementa hasta un valor óptimo:

$$k_L a = \delta \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta (1 - \phi)^\gamma \quad (8)$$

Galindo *et al.* (2000) reportaron que la aireación causó un drástico incremento en el tamaño promedio de gota para un sistema de tres fases (aire-aceite-medio), el cual fue mayor que el que podría esperarse por la reducción en la energía de disipación debida a la aireación. Por otro lado, el tamaño promedio de burbuja se redujo significativamente cuando se incrementó la fracción de aceite hasta un 15 %, observándose un fenómeno importante de burbujas dentro de las gotas viscosas.

SISTEMAS MULTIFASES

Se han reportado fermentaciones (Galindo *et al.*, 2000; Córdova-Aguilar *et al.*, 2001) en las cuales la fuente de carbono está en forma de aceite inmiscible en agua y existe micelio involucrado creciendo en una fase acuosa, ocasionando un sistema de cuatro fases (aceite-medio de cultivo-aire-biomasa). Para este tipo de sistemas de cuatro fases empleando *Trichoderma harzianum*, Galindo *et al.* (2000) reportaron que cuando la biomasa se incrementó, se encontró un decremento en el tamaño promedio de gota y burbuja. Debido, posiblemente, a la influencia de la biomasa en la viscosidad de la dispersión. La complejidad del fenómeno rompimiento-coalescencia en dispersiones aunado a la posibilidad de operar los biorreactores de partición en sistemas "lote alimentado" incrementa la necesidad de mayores estudios hidrodinámicos de sistemas multifásicos

ESTUDIOS CINÉTICOS

A pesar de que se han realizado estudios experimentales que pretenden proponer un mecanismo básico de bioconversión que incluya estructura molecular de CHMO, actividad catalítica y tasas de reacción (Sheng *et al.*, 2001; Malito *et al.*, 2004; Torres-Pazmiño *et al.*, 2010), poco se conoce sobre el modelado cinético considerando fenómenos simultáneos de inhibición de sustrato, producto y oxígeno. Se han publicado algunos modelos cinéticos pseudo-empíricos siguiendo un enfoque tipo Michaelis-Menten para describir la formación de

producto y consumo de sustrato en la cinética de la monooxigenasa (Hogan & Woodey, 2000; Torres-Pazmiño *et al.*, 2008; Bučko *et al.*, 2011). Sin embargo, estos modelos no toman en cuenta reacciones elementales para el oxígeno como un segundo sustrato en la bioconversión. El uso de este tipo de modelos cinéticos reduce el número de parámetros cinéticos; sin embargo, los valores estimados de los parámetros cinéticos dependen de la concentración de catalizador y se vuelven independientes del tamaño del reactor y su configuración geométrica, proporcionando incertidumbre en el escalamiento de la bioconversión de cetonas. En este sentido el desarrollo de un modelo cinético basado en un mecanismo de la reacción elemental describiendo la bioconversión tipo Baeyer-Villiger permite describir, comprender y encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo este tipo de bioconversión pero principalmente para el diseño y escalamiento (Fig. 2).

ESCALAMIENTO

Los estudios hidrodinámicos son críticos para determinar los criterios de escalamiento y deberán ser validados en el cambio de escala.

Podgórska & Baldyga (2001) estudiaron los efectos del escalamiento sobre la distribución de tamaños de gota de dispersiones líquido-líquido en recipientes agitados. Los autores desarrollaron un modelo multifractal capaz de predecir la distribución de tamaños de gota transitorios de dispersiones en tanques

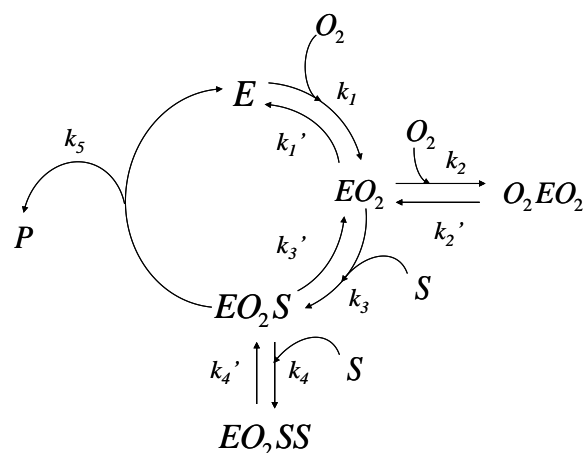


Fig. 2. Mecanismo de reacción propuesto para la bioconversión de cetonas considerando inhibición de sustrato (S) y la inactivación por oxígeno (O_2) (Melgarejo-Torres *et al.*, 2015)

agitados, el cual se utilizó para probar cuatro métodos de escalamiento: (i) igual potencia por unidad de masa y geometría constante, (ii) igual tiempo de circulación promedio y geometría constante, (iii) igual potencia por unidad de masa, igual tiempo promedio de circulación y geometría no constante, e (iv) igual velocidad tangencial del impulsor y geometría constante. El modelo demostró que para sistemas de rápida coalescencia los criterios (i) y (iii) generaron cambios menores en la distribución de tamaño de gota por efecto del escalamiento, mientras que para los sistemas de coalescencia lenta, ninguno de los criterios produjo resultados satisfactorios.

ESCALAMIENTO DESCENDENTE

En general, para la estrategia de escalamiento descendente en biorreactores se han reportado técnicas que dependen del fenómeno a reproducir; por ejemplo, mezclado,

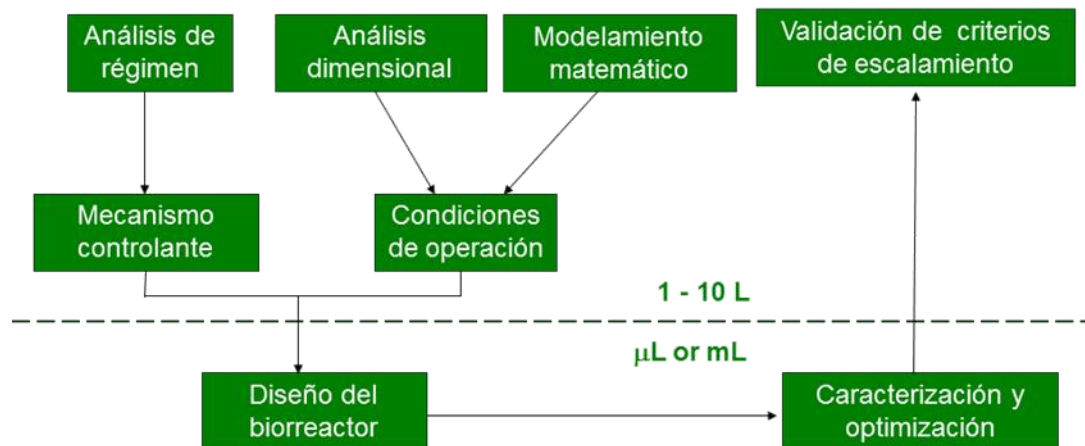


Fig. 3. Estrategia de escalamiento descendente para un biorreactor de partición de tres fases (Melgarejo-Torres *et al.*, 2011)

tiempo de residencia de las burbujas y esfuerzos cortantes, entre otros. Las reglas son similares a las identificadas para el escalamiento ascendente tratando de identificar los efectos que las variables de operación tengan sobre el proceso. En la práctica, es posible distinguir cuatro diferentes enfoques para el escalamiento ascendente: métodos fundamentales, métodos semi-fundamentales, análisis dimensional, y reglas heurísticas del pulgar (Nielsen *et al.*, 2003).

El análisis dimensional combinado con el análisis del régimen y experimentos a pequeña escala ha sido utilizado para resolver problemas de escalamiento (Fig. 3). El escalamiento descendente del mecanismo de la tasa limitante basado en análisis del régimen es una herramienta poderosa (Sweere *et al.*, 1987; Luyben, 1993).

El análisis del régimen está basado en la comparación de tiempos característicos para los diferentes mecanismos involucrados en el

proceso biológico. El tiempo característico para un cierto proceso, que se modela como de primer orden, es definido como el recíproco de la constante de la tasa de reacción. Para procesos que no son de primer orden el tiempo característico puede ser calculado como el cociente entre la capacidad (contenido volumétrico de la especie considerada) y el flujo (la tasa de consumo volumétrico de la especie) (Nielsen *et al.*, 2003).

El uso del análisis del régimen es una herramienta útil. Es posible predecir la tasa limitante del proceso. Se requieren cuatro etapas para su uso en el escalamiento descendente (Baganz, 2007): (i) análisis del régimen del proceso a gran escala, (ii) simulación del mecanismo de la tasa limitante a escala laboratorio, (iii) optimización y modelamiento del proceso a escala laboratorio, y (iv) optimización del proceso a escala de producción por traslación de las condiciones de laboratorio. El propósito del análisis del régimen es ganar respuestas a la pregunta: ¿Cuál es el

régimen controlante? ¿Qué mecanismo del proceso es la tasa limitante? Si el proceso es controlado por un simple mecanismo es llamado régimen puro. Si el proceso es controlado por más mecanismos es llamado régimen mezclado. El análisis tiene que permitir cambios en escala, cambios en los parámetros de procesos y el curso del proceso. Para llevar a cabo el análisis del régimen también es necesario considerar que el régimen controlante puede cambiar durante el proceso. Del resultado del análisis del régimen puede concluirse que mecanismos requieren investigación a pequeña escala. El criterio más importante para el experimento de laboratorio es que represente las condiciones en la escala de producción. La tercera etapa en el proceso de optimización a escala laboratorio, aunque limita, también aplica. La cuarta etapa es trasladar nuevamente los resultados a la escala de producción. El éxito del escalamiento depende del éxito del diseño representativo de los experimentos de escalamiento descendente.

La etapa del análisis del régimen a la simulación experimental está basada generalmente en tiempos característicos. Un análisis de los problemas de ingeniería está basado en números adimensionales, aunque, una descripción completa vía números adimensionales podría ser imposible. Esto sólo puede usarse en escalamiento descendente en combinación con modelos mecanísticos, similitud y análisis del régimen.

En contraste al análisis dimensional, el análisis mecanístico está basado en los

mecanismos involucrados. Las tasas de estos mecanismos son expresadas en términos de parámetros característicos (fluxes, presiones, tiempo, longitudes). Se emplean relaciones de la misma forma que para los números adimensionales. Para obtener el mismo comportamiento de sistemas a diferentes escalas el sistema tiene que ser similar. Hay cuatro principios de similitud básica: geométrica, mecánica, térmica, química.

Es importante establecer una aproximación sistemática (Li *et al.*, 2006) para desarrollar un modelo de escalamiento descendente de un proceso de cultivo celular. Los métodos y técnicas de escalamiento descendente de reactores de tanque agitado de nivel laboratorio a escala de mililitros son diversos (tiempo de mezclado, consumo de potencia equivalente y dinámica de fluidos, entre otros). Por ejemplo, Oniscu *et al.* (2002) presentan experimentos sobre la eficiencia del mezclado en medios aireados para un reactor agitado a escala laboratorio con impulsor de doble turbina. Sus resultados, en comparación con los sistemas no aireados, indican que la variación del tiempo de mezclado (una herramienta útil en el escalamiento) con los parámetros estudiados son muy diferentes debido al mecanismo de flujo complejo de la dispersión gas líquido, mecanismo que cambia con las propiedades del caldo de fermentación. También Betts *et al.* (2006) realizaron un escalamiento descendente para un reactor de tanque agitado instrumentado a 10 mL para la producción de plásmidos de DNA de *E. coli* DH5 α . Sobre la

base de un consumo de potencia equivalente se obtuvieron tasas de crecimiento específico y rendimiento de producción de plásmidos de DNA similares demostrando la posibilidad de un escalamiento descendente a 10 mL con su equivalente a 7 L. Weuster-Botz *et al.* (2005) haciendo uso del desarrollo tecnológico actual basado en simulaciones electromagnéticas, así como en simulaciones computacionales de dinámica de fluidos optimizaron las condiciones de operación de reactores de tanque agitado de 10 mL arreglados en bloques de 48 unidades. También Delvigne *et al.* (2006) propusieron métodos para el diseño de escalamiento descendente de biorreactores agitados mediante el uso de modelos estocásticos de mezclado y circulación. Los modelos estocásticos resultaron confiables para estudiar el efecto del escalamiento sobre la hidrodinámica de los reactores agitados. El modelo estocástico es afectado directamente por la escala de tiempo y para correr las simulaciones los autores tuvieron que especificar el tiempo tomado para hacer la transición.

Para poder reproducir experimentalmente los fenómenos que se presentan a escalas piloto o industrial a escala de mililitros, se ha propuesto la combinación de diferentes tipos de reactores para simular gradientes, tal como lo reportan Papagiani *et al.* (2003), quienes diseñaron un biorreactor tubular con recirculación para simular los gradientes de pH y oxígeno disuelto que ocurren a escalas mayores (10-200 L). El tiempo de circulación fue

utilizado como una medida del tamaño del reactor. El biorreactor tubular con recirculación simuló a sus correspondientes reactores de tanque agitado, resultando una herramienta valiosa para estudios de escalamiento descendente. Estos mini biorreactores pueden ser caracterizados de igual manera que los de mayor escala tal como lo reportan Wang *et al.* (2003) quienes diseñaron y caracterizaron un mini biorreactor (20 mL) de columna con recirculación, demostrando que aún a esa pequeña escala el mini biorreactor de columna pudo ser caracterizado en términos de retención de gas, velocidad de circulación del líquido y propiedades de transferencia de masa de acuerdo a sus correlaciones previas propuestas por la columna a escala mesa de laboratorio y piloto.

Los estudios hidrodinámicos son críticos para determinar los criterios de escalamiento que deberán ser validados en el cambio de escala. Sin embargo, hay poca información publicada sobre la hidrodinámica en biorreactores de partición y tiene que definirse una base confiable para el escalamiento ascendente y descendente de estos procesos. Cull *et al.* (2002) reportaron estudios de escalamiento descendente sobre la hidrodinámica de reactores biocatalíticos de dos fases con un cambio de escala de 25 (75 L a 3 L). Observaron que manteniendo constante la potencia por unidad de volumen fue la base más viable para el escalamiento, dando virtualmente valores idénticos de d_{32} y de distribución de tamaños de gota. Anteriormente, Podgórska &

Baldyga (2001) estudiaron los efectos del escalamiento sobre la distribución de tamaños de gota de dispersiones líquido-líquido en recipientes agitados. Los autores desarrollaron un modelo multifractal capaz de predecir la distribución de tamaños de gota transitorios de dispersiones en tanques agitados, que se utilizó para probar cuatro métodos de escalamiento. El modelo consideró también coalescencia rápida y lenta de las dispersiones.

La conversión de cetonas usando células completas mediante un biorreactor de partición (TPPB) de tres fases (aire-agua-iónico líquido) parece una propuesta prometedora ya que esta tecnología conduce a un incremento en las tasas de consumo de sustrato (Collins & Daugulis, 1997) evitando la inhibición de sustrato/producto y, principalmente, dando un mejor control de los fenómenos de transferencia de masa (Eibes *et al.*, 2010). Melgarejo-Torres *et al.* (2011) estudiaron el uso de un TPPB manteniendo el biocatalizador en la fase acuosa y usando líquidos iónicos (IL) como fase inmiscible. Específicamente, un análisis del régimen para la oxidación de la cetona bicíclica bicyclo [3.2.0] hept-2-a-6-lactona bicíclica (1S,5R)-(-)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona con células enteras basadas en la cepa *E. coli* TOP10 pQR239 con imida bis (trifluoromethylsulfonyl) de trioctylmethylammonium ([OMA][BTA]) como IL, esto permitió observar un incremento en las tasas de consumo evitando la inhibición de sustrato/producto. Desde este punto de vista, el establecimiento de diseño, escalamiento ascendente o descendente, optimización y

directrices operativas requieren la comprensión del funcionamiento de proceso (Bordel *et al.*, 2010). Por lo tanto, el modelado del TPPB toma en cuenta la interacción entre los fenómenos de transporte de masa y cinéticos junto con la pérdida de viabilidad celular, lo cual es obligatorio.

Hasta la fecha hay pocos estudios (Devinny & Ramesh, 2005) que expliquen a través de la compleja interacción entre los fenómenos de transporte de masa junto con la cinética y la pérdida de viabilidad celular en un TPPB teniendo en cuenta la inclusión de un solvente orgánico pesado en el sistema de modelado matemático. Por ejemplo, Mahanty *et al.* (2008) propuso un modelo cinético de degradación de pireno en un biorreactor de partición; sin embargo, lo hicieron sin tomar cuenta los mecanismos de transferencia de masa involucrados. Bordel *et al.*, (2010) modelaron el transporte de gas-líquido de VOC en un biorreactor de partición y describen adecuadamente los mecanismos de transporte de masa, pero el modelado cinético no se consideró. Para tratar flujos de aire contaminado en un biorreactor de tanque agitado continuo, Mohammad (2007) describe las tendencias de la simulación del modelo pero falla al comparar con los datos experimentales.

REFERENCIAS

Al-Dahhan MH & Wicks CE (1996) Modified contactor for experimental studies of mass transfer and chemical reaction across a

Artículos

- liquid-liquid interface. *Ind. Eng. Chem. Res.* 35: 3812-3816.
- Alphand V & Furstoss R (2000) Microbiological transformations 44. Optimization of a new Baeyer–Villigerase activity: application to the stereospecific oxidation of 3-phenylcyclobutanone. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 9: 209-217.
- Apreotesei G, Tudose R & Kadi H (2003) Mass transfer resistance in liquid-liquid extraction with individual phase mixing, *Chem. Eng. Process.* 42: 909-916.
- Arakawa NS, Gobbo-Neto L, Ambrosio SR, Antonucci GA, Sampaio SV, Tallarico MP, Said S, Schmidt TJ & Batista Da Costa F (2013) *Phytochem.* 96: 92–100.
- Baeyer A & Villiger V (1899) Einwirkung des Caro'schen Reagens auf Ketone. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 32(3): 3625–3633.
- Baganz F (2007) Notas de curso “Rapid fermentation process design”. UCL, Reino Unido
- Bennett A (2004) Mechanism of Oxidative Inactivation of *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871. Cyclohexanone Monooxygenase. *Journal of Undergraduate Research.* 6(1).
- Betts JI, Doig SD & Baganz F (2006) Characterization and application of a miniature 10 mL stirred-tank bioreactor, showing scale-down equivalence with a conventional 7 L reactor. *Biotechnol. Prog.* 22(3): 681-688
- Biswas RK, Habib MA, Ali MR & Haque MZ (1998) Kinetics of Mn²⁺ extraction in the acidic chloride D2EHPA-kerosene system using the constant Interfacial Area Stirred Cell Technique. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 41(3): 121-127.
- Boratynski F, Smuga M & Wawrzenczyk C (2013) Lactones 42: Stereoselective enzymatic/microbial synthesis of optically active isomers of whisky lactone. *Food Chem.* 141(1):419-27.
- Bordel S, Hernandez M, Villaverde S & Muñoz R (2010) Modelling gas–liquid VOCs transport in two-liquid phase partitioning bioreactors. *Int. J. Heat Mass Tran.* 53: 1139–1145.
- Bučko M, Schenk Mayerova A, Gemeinera P, Vikartovska A, Mihovilovic M & Lacik I (2011) Continuous testing system for Baeyer–Villiger biooxidation using recombinant *Escherichia coli* expressing cyclohexanone monooxygenase encapsulated in polyelectrolyte complex capsules. *Enzyme Microb. Technol.* 49: 284–288.
- Calabrese RV, Chang TPK & Dang PT (1986) Drop break-up in turbulent stirred-tank contactors. Part I: Effect of dispersed-phase viscosity. *AIChE J.* 32: 657-666.
- Çelik D, Bayraktar E & Mehmetoğlu Ü (2004) Biotransformation of 2-phenylethanol to

Artículos

- phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system. *Biochem. Eng. J.* 17: 5–13
- Clouthier CM & Pelletier JN (2012) Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 41: 1585–605.
- Collins LD & Daugulis AJ (1997) Biodegradation of phenol at high initial concentrations in twophase partitioning batch and fed-batch bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 155–162.
- Córdova-Aguilar MS, Sánchez A, Serrano-Carreón L & Galindo E (2001) Oil and fungal biomass dispersion in a stirred tank containing a simulated fermentation broth. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 1101–1106.
- Cull SG, Lovick JW, Lye GJ & Angeli P (2002) Scale-down studies on the hydrodynamics of two-liquid-phase biocatalytic reactors. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 25: 143-153
- Daugulis, JA (1997) Partitioning bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 8: 169-174
- De Gonzalo G, Rodriguez C, Rioz-Martinez A & Gotor V (2012) Improvement of the biocatalytic properties of one phenylacetone monooxygenase mutant in hydrophilic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 50: 43-49.
- Delvigne F, Destain J & Thonart P (2006) A methodology for the design of scale-down bioreactors by the use of mixing and circulation stochastic models. *Biochem. Eng. J.* 28(3): 256-268
- Devlinny JS & Ramesh J (2005) A phenomenological review of biofilter models. *Chem. Eng. J.* 113: 187–196.
- Desnoyer C, Masbernat O & Gourdon C (2003) Experimental study of drop size distributions at high phase ratio in liquid-liquid dispersions. *Chem. Eng. Sci.* 58: 1353-1363
- Doig S, O'Sullivan M, Patel S & Ward J (2001) Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 265–274.
- Doig S, Simpson H, Alphand V, Furstoss R & Woodley J (2003) Characterization of a recombinant *Escherichia coli* TOP10 [pQR239] whole-cell biocatalyst for stereoselective Baeyer–Villiger oxidations. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 347–355.
- Dong-Xiang W, Yi-Xin G, Hai-Qing W & Shan-Jing Y (2011) 11a-Hydroxylation of 16 α ,17-epoxyprogesterone by *Rhizopus nigricans* in a biphasic ionic liquid aqueous system. *Bioresour. Technol.* 102: 9368–9373.
- Donoghue NA, Norris DB & Trudgill PW (1976) The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardia globerulea* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur. J. Biochem.* 63(1):175–192.

Artículos

- Eibes G, McCann G, Pedezert A, Moreira MA, Feijoo G & Lema JM (2010) Study of mass transfer and biocatalyst stability for the enzymatic degradation of anthracene in a two phase partitioning bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 51: 79–85.
- Galindo E, Pacek AW & Nienow AW (2000) Study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth of up to four phases. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 213–21
- Geitner K, Kirschner A, Rehdorf J, Schmidt M, Mihovilovic MD & Bornscheuer UT(2007) Enantioselective kinetic resolution of 3-phenyl-2-ketones using Baeyer–Villiger monooxygenases. *Tetrahedron: Asymmetry.* 18: 892–5.
- Geitner K, Rehdorf J & Snajdrova R (2010) Scale-up of Baeyer–Villiger monooxygenase-catalyzed synthesis of enantiopure compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88: 1087–1093.
- Hinze JO (1955) Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion. *Processes. AIChE J.* 1(3): 289–295.
- Hogan CM & Woodley JM (2000) Modelling of two enzyme reactions in a linked cofactor recycle system for chiral lactone synthesis. *Chem. Eng. Sci.* 55: 2001–2008.
- Lee WH, Park JB, Park K, Kim MD & Seo JH (2007) Enhanced production of ϵ -caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* harboring cyclohexanone monooxygenase gene. *Appl. Microbiol. Biot.* 76: 329–38.
- Lewis J (1954) The mechanism of mass transfer of solutes across liquid-/liquid interfaces: Part 1: The determination of individual transfer coefficients for binary systems. *Chem. Eng. Sci.* 248–259.
- Li F, Hashimura Y, Pendleton R, Harms J, Collins E & Lee B (2006) A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes. *Biotechnol. Prog.* 22(3): 696–703
- Liu Y, Chen D, Yan Y, Peng C & Xu L (2011) Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents, *Bioresour. Technol.* 102: 10414–10418.
- Lovick J, Mouza AA, Paras SV, Lye GJ & Angeli P (2005) Drop size distribution in highly concentrated liquid-liquid systems in stirred tanks using a light back scattering method. *J. Chem. Technol. Biot.* 80: 545–552.
- Luyben KCAM (1993) Regime analysis for the scale-down of biotechnological processes. *Bioreactor Performance*, 15–17/3
- Mahanty B, Pakshirajan K & Dasu V (2008) Biodegradation of pyrene by *Mycobacterium*

Artículos

- frederiksbergense in a two-phase partitioning bioreactor system. *Bioresour. Technol.* 99: 2694–2698.
- Malinowski JJ (2001) Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. *Biotechnol. Adv.* 19: 525-538.
- Malito E, Alfieri A & Fraaije MW (2004) A. Mattevi, Crystal structure of a Baeyer–Villiger monooxygenase. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(36): 13157-13162.
- Mallin H, Wulf H & Bornscheuer UT (2013) A self-sufficient Baeyer–Villiger biocatalysis system for the synthesis of ϵ -caprolactone from cyclohexanol. *Enzyme Microb. Technol.* 53: 283– 287.
- Marcelis CLM, van Leeuwen M, Polderman HG, Janssen AJH & Lettinga G (2003) Model description of dibenzothiophene mass transfer in oil/water dispersion with respect to biodesulfurization. *Biochem. Eng. J.* 16: 253-264
- Melgarejo-Torres R, Torres-Martinez D, Gutierrez-Rojas M, Gomez de Jesus A, Lye GJ & Huerta-Ochoa S (2011) Regime analysis of a Baeyer–Villiger bioconversion in a three-phase (air–water–ionic liquid) stirred tank bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 58–59: 87–95.
- Melgarejo-Torres R, Castillo-Araiza CO, Dutta A, Bény G, Torres-Martinez D, Gutiérrez-Rojas M, Lye GJ & Huerta-Ochoa S (2015) Mathematical model of a three phase partitioning bioreactor for conversion of ketones using whole cells. *Chem. Eng. J.* 260: 765-775.
- Melgarejo-Torres R, Castillo-Araiza CO, López-Ordaz P, Torres-Martínez D, Gutiérrez-Rojas M, Lye GJ & Huerta-Ochoa S (2014) Kinetic mathematical model for ketone bioconversion using *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Chem. Eng. J.* 240: 1-9.
- Mohammad HF (2007) A model for treating polluted air streams in a continuous two liquid phase stirred tank bioreactor. *J. Hazard. Mater.* 148: 453–458.
- Nielsen DR, Daugulis AJ & McLellan PJ (2003) A novel method of simulating oxygen mass transfer in two-phase partitioning bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 735-742.
- Nienow A.W. (2004) Break-up, coalescence and catastrophic phase inversion in turbulent contactors. *Adv. Colloid Interfac.* 108:95-103.
- Oniscu C, Galaction AI & Cașcaval D (2002) Modelling of mixing in stirred bioreactors 3. Mixing time for aerated simulated broths. *Roum. Biotechnol. Lett.* 7(4): 817-828
- Opperman DJ & Reetz MT (2010) Towards practical Baeyer–Villiger-monooxygenases: Design of cyclohexanone monooxygenase mutants with enhanced oxidative stability. *Chem. Bio. Chem.* 18: 2589–2596.
- Opperman S, Stein F & Kragl U (2011) Ionic liquids for two-phase systems and their

Artículos

- application for purification, extraction and biocatalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 493–499.
- Pacek AW, Chamsart S, Nienow AW & Bakker A (1999) The influence of impeller type on mean drop size and drop size distribution in an agitated vessel. *Chem. Eng. Sci.* 54: 4211-4222.
- Papagianni M, Matthey M & Kristiansen B (2003) Design of a tubular loop bioreactor for scale-up and scale-down of fermentation processes. *Biotechnol. Prog.* 19(5): 1498-1504
- Persson M & Bornscheuer UT (2003) Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 22: 21–27.
- Pfruender H, Jones R & Weuster-Botz V. (2006) Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *J. Biotechnol.* 124:182-190.
- Podgórska W & Baldyga J (2001) Scale-up effects on the drop size distribution of liquid-liquid dispersions in agitated vessels. *Chem. Eng. Sci.* 56: 741-746
- Quadros PA & Baptista CMSG (2003) Effective interfacial area in agitated liquid-liquid continuous reactors. *Chem. Eng. Sci.* 58: 3935-3945
- Renz M & Meunier B (1999) 100 Years of Baeyer-Villiger oxidation of ketones. *Eur. J. Org. Chem.* 1: 737–750.
- Sheng D, Ballou DP & Massey V (2001) Mechanistic studies of cyclohexanone monooxygenase: chemical properties of intermediates involved in catalysis. *Biochemistry-US.* 40: 11156-11167.
- Srivastava P, Hahr O, Buchholz R & Worden M (2000) Enhancement of mass transfer using colloidal liquid aphrons: measurement of mass transfer coefficients in liquid-liquid extraction. *Biotechnol. Bioeng.* 70(5): 525-532.
- Strukul G (1998) Transition metal catalysis in the Baeyer-Villiger oxidation of ketones. *Angew. Chem.* 37: 1198–1209.
- Sweere APJ, Luyben KCAM & Kossen NWF (1987) Regime analysis and scale-down: Tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 386-398
- Taylor PG, Loo OAD, Bonilla JA & Murillo R (2008) Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. *Fitoterapia.* 79: 428–432.
- Torres-Pazmiño DE, Baas BJ, Janssen DB & Fraaije MW (2008) Kinetic mechanism of phenylacetone monooxygenase from

Artículos

- Thermobifida fusca*, *Biochemistry-US*.47: 4082–4093.
- Torres-Pazmiño DE, Dudek HM & Fraaije MW (2010) Baeyer–Villiger monooxygenases: recent advances and future challenges. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(2): 138–144.
- Walsh CT & Latham J (1986) Mechanism based inactivation of the flavoprotein cyclohexanone monooxygenase by S-oxygenation. *J. Protein Chem.* 5:79–87.
- Wang S, Arimatsu Y, Koumatsu K, Furumoto K, Yoshimoto M, Fukunaga K & Nakao K (2003) Gas holdup, liquid circulating velocity and mass transfer properties in a mini-scale external loop airlift bubble column. *Chem. Eng. Sci.* **58**: 3353 – 3360
- Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT & Arnold M (2005) Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **28**(2): 109-119
- Woodley JM, Brazier AJ & Lilly MD (1991) Lewis cell studies to determine reactor design data for two-liquid-phase bacterial and enzymic reactions. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 133-140.