



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE UN BIORREACTOR SÓLIDO/GAS EN LA
SÍNTESIS ORGÁNICA DE PROPIONATO DE ISOBUTILO”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. en B. Luis Eduardo García Martínez

Matricula: 20173801639

Comité tutorial

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Dr. Guillermo Quijano Govantes

Jurado

Dr. Victor Sanchez Vazquez

Dr. Sergio Alejandro Medina

Dr. Guillermo Quijano Govantes

Dr. Edmundo Castillo Rosales

Iztapalapa, Ciudad de México, 11 de mayo de 2022

legm@xanum.uam.mx, eduardo17@hotmail.com



Evaluación de un biorreactor sólido/gas en la síntesis orgánica de propionato de isobutilo.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 11 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. VÍCTOR SANCHEZ VAZQUEZ
- DR. SERGIO ALEJANDRO MEDINA MORENO
- DR. GUILLERMO QUIJANO GOVANTES
- DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DR. LUIS EDUARDO GARCIA MARTINEZ

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

Aprobar

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



LUIS EDUARDO GARCIA MARTINEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALVA ESPINO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. VÍCTOR SANCHEZ VAZQUEZ

VOCAL

DR. SERGIO ALEJANDRO MEDINA MORENO

VOCAL

DR. GUILLERMO QUIJANO GOVANTES

SECRETARIO

DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) Nivel Competencia Internacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Y se agradece al CONACyT por la beca otorgada (570335) para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
2.Generalidades	16
2.1 Biocatálisis en la síntesis orgánica.....	16
2.2 Biocatalizadores	17
2.2.1 Lipasas.....	19
2.3 Ésteres	19
3. ANTECEDENTES	21
3.1 Biocatálisis sólido/gas (GS)	21
3.2 Biocatalizadores	23
3.2.2 Células completas como biocatalizador	24
4. JUSTIFICACIÓN	26
5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVOS	27
7. ANÁLISIS TEORICO	28
7.1 Metodología	28
7.1.1 Modelado.....	28
7.1.2 Modelo Pseudo Heterogéneo	31
7.1.3 Cinética	35
7.2 RESULTADOS	45
7.2.1 Análisis termodinámico.....	45
7.2.2 Análisis Cinético	49
7.2.3 Estudió integral del bioreactor sólido/gas	57
7.2.3.1 Análisis macroscópico.....	57
7.2.3.2 Análisis microscópico	59
7.2.3.3 Dinámica de fluidos	59
7.2.3.4 Transferencia de calor y masa	60
7.3 Conclusiones parciales.	63
8. PARTE EXPERIMENTAL	69
8.1 Metodología	69
8.1.1 Biocatalizador	69

8.1.2 Propagación del microorganismo.....	69
8.1.3 Medio para producción de lipasas.....	70
8.1.4 Crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> por cultivo en medio sólido.....	71
8.1.5 Actividad enzimática.....	71
8.1.6 Cinética de actividad enzimática.....	72
8.1.7 Actividad de agua (a_w).....	73
8.1.8 Síntesis del éster con solvente orgánico y líquido libre de solventes.....	73
8.1.9 Síntesis del Isobutil propionato en el sistema SG.....	74
8.1.10 Sistema sólido/gas.....	74
8.1.10.1 Componentes del sistema.....	76
8.1.11 Análisis de compuestos.....	77
8.2 Resultados.....	78
8.2.1 Crecimiento de biomasa en medio sólido.....	78
8.2.2 Análisis de respirometría en crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> en medio sólido.....	80
8.2.3 Actividad enzimática.....	80
8.2.4 Cinética de actividad enzimática.....	82
8.2.5 Síntesis del éster con solvente orgánico (SO) y un medio libre de solventes (LLS).....	83
8.2.6 Producción del éster en sistema SG.....	85
8.3 Conclusiones parciales.....	86
9. CONCLUSIONES GENERALES.....	87
10. PERSPECTIVAS.....	88
11. BIBLIOGRAFÍA.....	89
12. ANEXOS.....	97

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos termodinámicos, cinéticos y de transporte involucrados en el reactor de lecho empacado SG	28
Figura 2. Estrategia de la modelo usada para analizar el comportamiento del biocatalizador en el reactor	30
Figura 3. a) mecanismo de reacción para la síntesis de isobutil propionato considerando un paso de inhibición por alcohol. b) Mecanismo de reacción simplificado. <i>A, B, P, W E</i> representan el ácido propiónico, alcohol isobutílico, propionato de isobutilo y agua respectivamente	41
Figura 4. a) Concentración de los componentes de la reacción calculados en fase gas a diferente temperatura con una fracción molar en líquido de 1, b) concentración de los componentes de la reacción calculados en fase gas a diferente temperatura a diferente fracción molar en líquido 0-1 para ambos reactantes. C) relación molar alcohol:ácido calculada a diferente temperatura respecto a la fracción molar en líquido de los reactantes (0.1 0.9)	46
Figura 5. Valores de la constante de equilibrio en la síntesis e hidrólisis de propionato de isobutilo a diferente temperatura	47
Figura 6. Efecto de la relación molar y temperatura en la conversión	47
Figura 7. Gráfico de paridad comparando las concentraciones de la especie <i>i</i> observadas contra las calculadas por el modelo. Las líneas punteadas representan una desviación de 5 % a la línea de paridad	59
Figura 8. Diagrama de dispersión que compara las velocidades de reacción inicial predichas por el modelo cinético desarrollado con las velocidades de reacción iniciales predichas al: a) ignorar el efecto del parámetro el mecanismo de adsorción en el modelo cinético y b) variar el parámetro cinético alrededor de su intervalo de confianza. Se agrega como referencia una línea continua con una pendiente de 1 y una intersección con el eje y de 0. Las líneas discontinuas indican una desviación de +-15 % con respecto a la línea de referencia	54
Figura 9. Efecto de la relación molar y temperatura en la conversión a tres valores de a_w ; a)0.2, b) 0.6 y C). La sabana de superficie se obtuvo a las 5 h de reacción	55
Figura 10. Efecto de la temperatura y la relación molar alcohol:ácido en: a) la velocidad inicial de reacción, b) fracción de sitios libres en la enzima, c) resistencia termodinámica	56
Figura 11. Efecto de la temperatura del enfriante, temperatura de entrada y flujo volumétrico de entrada en la conversión a la salida del reactor. Con condiciones de relación molar alcohol-ácido 1:4, a_w 0.2, óptimas identificadas en el análisis termodinámico y cinético. a) 1.2 L h ⁻¹ , b) 2.4 L h ⁻¹ and c) 4.8 L h ⁻¹	58
Figura 12. a) predicción de perfil de fracción vacía y número de Darcy, b) predicción de perfil de velocidad del componente radial por las ecuaciones de Navier-Stokes Darcy-	64

Forchheimer (NSDF) a 3 flujos volumétricos de entrada, y su respectiva aproximación considerando flujo pistón	
Figura 13. Predicción de perfiles de temperatura axial por el modelo pseudo heterogéneo a diferente: a) temperatura del enfriante, b) flujo volumétrico a la entrada, c) concentración de reactantes a la entrada. Las simulaciones se realizaron con las condiciones de operación que dan la máxima conversión dada por el análisis macroscópico: a_w 0.2, y relación molar alcohol:ácido	65
Figura 14. Predicciones de perfiles de conversión axial por el modelo pseudo heterogéneo a diferente: a) temperatura del enfriante, b) flujo volumétrico a la entrada, c) concentración de reactantes a la entrada. Las simulaciones se realizaron con las condiciones de operación que dan la máxima conversión dada por el análisis macroscópico: a_w 0.2, y relación molar alcohol:ácido 4:1	66
Figura 15. Respuesta transitoria a la salida del reactor: a) velocidad de reacción a dos diferentes concentraciones de reactantes a la entrada, b) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1 \times C_{i0}$, c) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1000 \times C_{i0}$. Las condiciones de operación en estas simulaciones fueron: $a_w = 0.2$, $T_c = 316$ K, $Q_o = 1.2$ Lh ⁻¹ , $T_o = 305$ K y alcohol:ácido ratio de 4:1	67
Figura 16. Predicciones en pseudo estado estacionario a lo largo del reactor: a) velocidad de reacción a dos diferentes concentraciones de reactantes a la entrada, b) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1 \times C_{i0}$, c) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1000 \times C_{i0}$. Las condiciones de operación en estas simulaciones fueron: $a_w = 0.2$, $T_c = 316$ K, $Q_o = 1.2$ Lh ⁻¹ , $T_o = 305$ K y alcohol:ácido ratio de 4:1	68
Figura 17. Esquema del sistema SG	76
Figura 18. Frasco de reactantes y tapa	78
Figura 19. Imágenes en estereoscopio de los anillos de cerámica, la izquierda es el soporte antes del crecimiento de la levadura y la de la derecha es con la biomasa adherida	79
Figura 20. Producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> en sólido, a) Tasa de producción de CO ₂ , b) Producción de CO ₂	81
Figura 21. Actividad enzimática durante el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> cuantificado en: a) el extracto, b) biomasa en soporte	84
Figura 22. Síntesis de propionato de isobutilo utilizando <i>Y. lipolytica</i> soportada en anillos de cerámica como biocatalizador utilizando un solvente orgánico □ y líquido libre de solventes □, respecto a la concentración del producto (símbolo relleno) y la conversión (símbolo vacío)	85
Figura 23. Seguimiento de reactantes y producto en la síntesis de propionato de isobutilo en fase gas	86

Índice de tablas

Tabla 1. Características de biocatalizadores	18
Tabla 2. Datos de isobutil propionato	20
Tabla 3. Reacciones llevadas a cabo con células en sólido/gas	26
Tabla 4. Pasos de reacción, número de Horiuti y las respectivas velocidades de reacción que participan en la esterificación de ácido propiónico e isobutanol	38
Tabla 5. Funciones termodinámicas de estado en la síntesis de propionato de isobutilo	38
Tabla 6. Parámetros de transporte efectivos utilizados en el modelo del reactor SG	40
Tabla 7. Balance molar en términos del extenso de reacción	43
Tabla 8a. Dimensiones del reactor utilizado en el modelo	44
Tabla 8b. Condiciones de operación usadas en el modelo del reactor	44
Tabla 9. Parámetros cinéticos y su intervalo de confianza correspondiente con 95 % de nivel de confianza	51
Tabla 10. Medio de cultivo para producción de lipasas	70
Tabla 11. Curva patrón de <i>p</i> -nitrofenol	72
Tabla 12. Valor de actividad de soluciones salinas saturada	75
Tabla 13. Equipo de sistema sólido/gas	75
Tabla 14. comparación de crecimiento en anillos de cerámica	80
Tabla 15. Actividad enzimática en cultivo de <i>Y. lipolytica</i> en líquido, de biomasa y medio	82
Tabla 16. Comparación de fuente de ácidos grasos en actividad enzimática	82
Tabla 17. Datos del éster producido durante la reacción en sistema SG	86

NOMENCLATURA

Letras romanas

		p_{vw}°	Presión de vapor estándar del agua pura, kPa
α_s	Área interfacial por unidad de volumen, $m_s^2 m_s^{-3}$	r	Posición radial, m
a_w	Actividad de agua (p_{vw}/p_{vw}°).	R_g	Constante universal de los gases = $8.314 J mol^{-1} K^{-1}$
A'	Factor pre exponencial, $mol kg_{cat}^{-1} h^{-1}$	r_i	Velocidad de reacción específica del compuesto i , $mol kg_{cat}^{-1} h^{-1}$
C_i	Concentración molar del compuesto i en la fase fluida, $mol m_f^{-3}$	R	Radio del tubo, m
$C_{i,ss}$	Concentración molar del compuesto i en la fase fluida en estado estacionario, $mol m_f^{-3}$	t	Tiempo, h
C_{is}	Concentración molar del compuesto i en la fase sólida, $mol m_s^{-3}$	T	Temperatura, K
$C_{is,ss}$	Concentración molar del compuesto i en la fase sólida en estado estacionario, $mol m_s^{-3}$	T_o	Temperatura de entrada, K
C_{io}	Concentración de entrada del compuesto i en la fase fluida, $mol m_f^{-3}$	T_c	Temperatura de enfriante, K
C_{pf}	Capacidad calorífica del fluido, $kJ (kg_f K)^{-1}$	T_s	Temperatura del sólido, K
C_{ps}	Capacidad calorífica del sólido, $kJ (kg_f K)^{-1}$	T_{ss}	Temperatura del fluido en estado estacionario, K
Da	Número de Darcy	$T_{s,ss}$	Temperatura del sólido en estado estacionario, K
D_{effr}	Coefficiente efectivo de dispersión radial $m_r^2 h^{-1}$	v_z	Componente axial de velocidad intersticial, $m h^{-1}$
D_{effz}	Coefficiente efectivo de dispersión axial, $m_r^2 h^{-1}$	v_{z0}	Componente axial de velocidad intersticial en la entrada del lecho, $m h^{-1}$

d_p	Diámetro de partícula, m	v_{zss}	Componente axial de velocidad intersticial, $m h^{-1}$
d_t	Diámetro de reactor, m	X_i	Conversión del compuesto, i
E_a	Energía de activación, $kJ mol^{-1}$	x_i	Fracción molar del compuesto i
h_g	Coefficiente de transporte interfacial, $kJ m_s^{-2} h^{-1}$	Y_i	Rendimiento del compuesto i
h_w	Coefficiente de transferencia de calor en la pared, $kJ m_r^{-2} h K^{-1}$	z	Posición axial, m
k	Constante de reacción, $mol (mol_E h^{-1})$	Letras griegas	
K_{eq}	Constante de equilibrio	α, β	Parámetros de Ergun
ΔG°	Energía libre de Gibbs, $kJ mol^{-1}$	ΔH_j^o	Entalpia de reacción del paso j , $kJ mol^{-1}$
k_{effr}	Conductividad térmica radial, $kJ (m_r hK)^{-1}$	ΔG_r°	Energía libre de Gibbs estándar, $kJ mol^{-1}$
k_{effz}	Conductividad térmica radial, $kJ (m_r hK)^{-1}$	e	Fracción vacía, $m_f^3 m_r^{-3}$
k_g	Coefficiente de transporte interfacial $m_f^3 m_s^{-2} h^{-1}$	q	Fracción de sitios
K_A	Constante de equilibrio de adsorción del componente A, $m_f^3 mol^{-1}$	μ_f	Viscosidad dinámica, $kg_f (m_f h)^{-1}$
K_{IW}	Constante de equilibrio de adsorción del componente W	ν	Numero estequiométrico
K_I	Constante de equilibrio de adsorción del componente I, $mol m_f^{-3}$	ξ	Extenso de reacción
K_{IB}	Constante de equilibrio de adsorción del componente IB, $mol m_f^{-3}$	r_B	Densidad de empaque, $kg_{cat} m_r^{-3}$
K_P	Constante de equilibrio de adsorción del componente P, $mol m_f^{-3}$	ρ_{cat}	Densidad de catalizador, $kg_{cat} m_f^{-3}$
K_{IBB}	Constante de equilibrio de adsorción del componente IBB, $mol m_f^{-3}$	r_f	Densidad del fluido, $kg_f m_f^{-3}$
L	Largo del reactor, m	ρ_s	Densidad del sólido $kg_s m_f^{-3}$

n_i	Concentración molar del compuesto i , $mol\ m_f^{-3}$	σ	Número de Horiuti
n_i^i	Concentración molar inicial del compuesto i , $mol\ m_f^{-3}$		Subindices
n_i^{eq}	Concentración molar del compuesto i en el equilibrio, $mol\ m_f^{-3}$	cat	Catalizador
N_T	Concentración de sitios catalíticos, $mol_E\ kg_{cat}^{-1}$	eff	Efectivo
P	Presión, kPa	exp	Experimental
p^o	Presión a condiciones estándar = 1bar	f	Fluido
p_i	Presión parcial del compuesto i	i	Compuesto i
p_i^o	Presión parcial de vapor	o	entrada
p_{tot}	Presión total, kPa	p	Partícula
p_{vw}	Presión de vapor al equilibrio en solución, kPa	r	Reactor
		s	Sólido

Resumen

En la actualidad, la biocatálisis sólido/gas (SG) es una disciplina biotecnológica atractiva para llevar a cabo reacciones biocatalíticas de síntesis para producir compuestos orgánicos de alto valor para las industrias farmacéutica, alimentaria, de aromas, entre otras. El diseño del biorreactor SG es, sin embargo, el principal reto para su aplicación a gran escala. En este sentido, aunque un modelado adecuado es la herramienta de ingeniería más confiable para diseñar una tecnología de reacción, no existe en la actualidad un modelo matemático para este tipo de biorreactor. Con este fin, este trabajo tiene como objetivo desarrollar un modelo pseudo-continuo para un reactor de lecho empacado para biocatálisis SG. Como caso de estudio, se implementa la esterificación de ácido propiónico e isobutanol con lipasas de *Candida antarctica* debido a la importancia del producto (propionato de isobutilo) en el mercado de compuestos aromáticos. La propuesta y construcción del modelo matemático se basan en principios de ingeniería de reactores. Así, el modelo pseudo-continuo se aplica para realizar un análisis de sensibilidad paramétrica y otro de superficie de respuesta. Los resultados obtenidos elucidaron el potencial que tiene la tecnología SG para la esterificación de ácido propiónico e isobutanol en lipasas comerciales compatibles. La termodinámica mostró, por un lado, cómo la conversión de equilibrio se ve afectada principalmente por a_w . Las conversiones en el equilibrio se vieron favorecidas con valores de a_w cercanos a cero y proporciones de alcohol:ácido alrededor de 1:4 o 4:1. La cinética indicó que las tasas de bioconversión se vieron favorecidas con una a_w de alrededor de 0,2, y valores de la proporción de alcohol a ácido cercanos a 1:4 o 4:1. A nivel del biorreactor SG, la dinámica de fluidos favoreció la transferencia de calor a través del lecho, evitando la aparición de puntos calientes. Una temperatura de reacción alrededor de 316 K llevó a la mayor conversión a través del lecho. Las velocidades de reacción se vieron favorecidas a al aumentar la concentración de entrada de reactantes. El análisis de sensibilidad paramétrica contribuyó a comprender la compleja interacción microscópica entre la termodinámica, la cinética y los fenómenos de transporte en las condiciones de operación estudiadas y las características de la geometría definida. Por otro lado, el análisis de superficie de respuesta

permitió identificar la ventana de operación donde el biocatalizador cumple con su desempeño macroscópico óptimo sin tener el conocido costo computacional debido al tiempo requerido para resolver modelos pseudo-continuos que dan cuenta de la heterogeneidad y dinámica de fluidos del biorreactor. Además, en este trabajo se diseñó, construyó y operó un prototipo experimental del sistema de reacción SG a escala banco para llevar a cabo la reacción de esterificación. Debido a su actividad lipasa, como biocatalizador se utilizaron células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab inmovilizadas y liofilizadas en anillos raschig de cerámica. Como gas acarreador se utilizó nitrógeno el cual arrastra los reactantes en fase gas a través del lecho empacado. A la salida del reactor se instaló un sistema de recuperación del producto y reactantes que no reaccionaron mediante burbujeo con metanol a -5 °C. Se llevó a cabo una evaluación preliminar del sistema de biorreacción SG. Se evaluó la actividad enzimática de la levadura *Y. lipolytica* y su capacidad de llevar a cabo a la reacción en condiciones acuosas y en el sistema de reacción SG. Se elucidó que este biocatalizador puede catalizar la reacción de esterificación tanto en fase acuosa como en fase gaseosa. Los resultados experimentales, aunque preliminares, sugieren al igual que el estudio teórico que el biorreactor SG es una tecnología prometedora que se debe seguir estudiando en trabajos futuros con el objetivo de robustecer el modelo del reactor desarrollado y llevar a cabo su escalamiento, incluso considerando otro tipo de biorreacciones y diferentes biocatalizadores. Los resultados teóricos permitieron diseñar, construir y operar un prototipo experimental del sistema de reacción gas/sólido para lo cual se diseñó y montó un sistema de reacción SG para llevar a cabo la reacción de esterificación. Los resultados mostraron el potencial de las células completas de *Y. lipolytica* como biocatalizador en la esterificación de ácido propiónico e isobutanol y al sistema con la capacidad de llevar este tipo de reacción en fase gaseosa, siendo el biorreactor SG una alternativa prometedora en la que es necesario seguir con la caracterización experimental para validar el modelo propuesto y llevar a cabo otro tipo de reacciones y diferentes biocatalizadores.

1. INTRODUCCIÓN

La síntesis catalítica de compuestos orgánicos de alto valor agregado mediante el uso de biocatalizadores es una alternativa a la síntesis química, evitando la obtención de subproductos no deseados o tóxicos, requiriendo condiciones de operación cercanas a las condiciones ambientales de presión y temperatura (Kuperkar et al., 2014). El uso de biocatalizadores es en su mayoría aplicado en sistemas de reacción en fase acuosa, sin embargo, está limitado al uso de reactantes orgánicos solubles en agua (Penka Nikolova & Ward, 1993). Una alternativa son los llamados sistemas de reacción “no convencionales”, que son aquellos que utilizan una fase diferente a la acuosa, como el uso de fluidos super críticos, solventes orgánicos o un medio libre de solventes. Los sistemas no convencionales permiten incrementar el rendimiento al producto deseado, tener control de la cantidad de agua del sistema, eliminar el uso de solventes, y es posible llevar a cabo reacciones en donde intervienen moléculas no solubles en agua, entre otras características (Halling, 1994).

Dentro de estos sistemas no convencionales está la biocatálisis sólido/gas (SG) donde un biocatalizador, que se encuentra en fase sólida, convierte selectivamente reactantes a productos en fase gaseosa (L. M. Kulishova & Zharkov, 2017) facilitando la operación en continuo del biorreactor (Sylvain Lamare, 1993). Estas características hacen que este sistema sea atractivo dentro de un proceso en una posible aplicación industrial.

La biocatálisis SG se ha convertido en un campo atractivo en biotecnología para el desarrollo de tecnologías destinadas a producir compuestos de alto valor para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Ali et al., 2007; Cordero-Soto et al., 2020; dos Santos et al., 2017; Fomuso & Akoh, 2002; Halim et al., 2009; Watanabe et al., 2005). Una revisión reciente publicada por nuestro grupo de investigación identificó al biorreactor de lecho empacado SG como una de las tecnologías más prometedoras para su aplicación a gran escala (Cordero-Soto et al., 2020). El biorreactor SG presenta varias ventajas operativas y fenomenológicas en comparación con los sistemas biocatalíticos de base líquida convencionales y no convencionales, por ejemplo: (1) el biocatalizador tiene mayor termoestabilidad al estar en condiciones de baja cantidad de agua es menor el efecto de desnaturalización por efecto de la temperatura lo que mantiene sus estructura (Grizon et al., 2004; Sylvain Lamare et al., 2004); y (2) el uso de reactantes en fase gaseosa mejora el

transporte de cantidad de movimiento, calor y masa al ser acarreados por un fluido en fase gaseosa con una viscosidad menor respecto a un líquido (Cantone et al., 2007). Estas ventajas favorecen las velocidades de reacción y minimizan los mecanismos de inhibición cinética (Létisse et al., 2003). Además, de no generar residuos tóxicos tener un menor consumo de energía comparado con procesos químicos. (Cantone et al., 2007; Cordero-Soto et al., 2020).

El diseño del biorreactor SG es uno de los principales retos para su aplicación a gran escala. Su implementación en la industria se ha visto obstaculizada por la falta de comprensión de la compleja interacción entre la termodinámica, la cinética y los fenómenos de transporte en los biorreactores SG (Bont et al., 1983; Debeche et al., 2005; L. Kulishova et al., 2010; Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., and Legoy, 1992; Pires et al., 2002; Sanádi et al., 2012; Trivedi et al., 2006). Si bien el modelado matemático es fundamental para llevar a cabo el diseño conceptual del biorreactor SG, hasta donde se sabe, no existe hoy un modelo desarrollado para esta tecnología con aplicación en esterificación. La mayoría de los trabajos sobre biocatálisis SG se han centrado en evaluar el efecto de las condiciones de operación en el rendimiento cinético de diferentes tipos de biocatalizadores destinados a producir ésteres de cadena corta (Debeche et al., 2005; Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., and Legoy, 1992; Pires et al., 2002; Sanádi et al., 2012), alcoholes (L. Kulishova et al., 2010) y productos químicos de alto valor agregado (Bont et al., 1983; Grizon et al., 2004; Trivedi et al., 2006).

En este tipo de sistemas el uso de enzimas como biocatalizadores es el más reportado en la literatura, sin embargo, el uso de células completas de microorganismos es una opción viable y atractiva, ya que su proceso de purificación es menos complejo, y por lo tanto costoso, que aquél que se tiene con enzimas puras que además son menos estables (Penka Nikolova & Ward, 1993).

Con base en lo anterior, es necesaria la correcta caracterización de este tipo de sistema involucrando los fenómenos de transporte y las características de la reacción a nivel termodinámico y cinético, además de evaluar otras fuentes de biocatalizador para hacerlo más viables y atractivo para su aplicación. Para lograr esto el presente se organiza en dos secciones, una que aborda la caracterización de un biorreactor SG escala banco mediante modelado utilizando datos experimentales de la literatura. Se evalúa la termodinámica de la reacción de esterificación. Además, que se evaluó una fuente de biocatalizador diferente a

las enzimas, el uso células completas de un microorganismo, la levadura *Yarrowia lipolytica* 2.2ab. en el que se evaluó su potencial para llevar a cabo la reacción y se establecieron las condiciones de cultivo y preparación de este biocatalizador en la obtención de un compuesto orgánico de interés para la industria farmacéutica y alimentaria, como lo es el propionato de isobutilo. Para lograr esto, el presente trabajo se organiza en dos secciones, una que abordara la termodinámica de la reacción de esterificación, evaluando el efecto de la actividad de agua y el cambio de fase de los reactantes de líquido a gas. Así como la cinética de la reacción en donde se prone un mecanismo de reacción Bi-Bi Ping-Pong (dos Santos et al., 2017; Kuperkar et al., 2014; Marty et al., 1992; Varma & Madras, 2010; Veny et al., 2014; Yadav & Lathi, 2006). Finalmente se propone un modelo de reactor que considera el transporte de cantidad de movimiento, calor y masa, acoplados con la cinética. y termodinámica de la reacción. Y en la segunda parte, mediante el diseño y construcción de un sistema de reacción SG escala banco, en el que se evaluó una fuente de bioactalizador diferente a enzimas puras, mediante el uso de células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab evaluando su potencial para llevar a cabo al reacción y establecer las condiciones del cultivo y preparación como biocatalizador en la síntesis de propionato de isobutilo, un compuesto orgánico de interés en la industria alimentaria.

2.Generalidades

2.1 Biocatálisis en la síntesis orgánica

En la biocatálisis se utilizan microorganismos o parte de ellos para incrementar la velocidad de la reacción para la obtención de compuestos de interés que satisfacen las necesidades humanas bajo un principio de sostenibilidad (Arroyo et al., 2014). En general los catalizadores de naturaleza biológica ofrecen una variedad de usos en diferentes campos de producción, como ácidos orgánicos (Arzumanov et al., 2000), aditivos de alimentos (Choi et al., 2015), mentol (Santoro et al., 2011), etileno (Kende, 1993) en áreas de biorremediación (L. Kulishova et al., 2010), entre otros.

Desde hace varias décadas la biocatálisis se ha convertido en una herramienta esencial en la síntesis orgánica de distintos compuestos de alto valor agregado para industrias como la

farmacéutica, alimentaria y de perfumes. Las enzimas son las más reportadas como catalizador para llevar a cabo este tipo de síntesis, esencialmente por su alta actividad, regioselectividad, quimioselectividad y estereoselectividad (Schulze & Wubbolts, 1999), sin embargo, su aplicación presenta desventajas como altos costos y relativa inestabilidad bajo algunas condiciones industriales (Zaks & Dodds, 1997). Dentro de la aplicación de la biocatálisis, el uso células completas es una alternativa prometedora debido a que pueden llevar a cabo reacciones de varias etapas, además de proteger a las enzimas del medio de reacción. Aunado a lo anterior se debe destacar que económicamente a nivel de aplicación, el precio de las células completas es significativamente más barato que el de las enzimas libres (de Carvalho, 2017).

En la **Tabla 1** se presentan características de los biocatalizadores utilizados en diversas formas en las que es posible utilizarlas, donde destaca el interés en el uso de células completas por sus características y potencial.

Algunos ejemplos del potencial catalítico de las células completas es en la aplicación de reacciones como: hidroxilación de esteroides (S. A. A. Shah et al., 2013), metilación de flavonoides (Kim et al., 2013), transformación de terpenos (Dulce M. Palmerín-Carreño et al., 2016), obtención de ácido cítrico (Arzumanov et al., 2000), antibióticos (Bizukoje & Ledakowicz, 2008; Hurst, 1966; Jørgensen et al., 1995).

2.2 Biocatalizadores

El uso de células completas y enzimas libres, pero esencialmente estas últimas, han sido utilizadas para la producción de ésteres en sistemas no convencionales por la alta actividad, selectividad y alta especificidad a distintas condiciones de reacción como la actividad de agua, temperatura y presión (Kuperkar et al., 2014). En los siguientes puntos se hace una revisión sobre el uso en particular de enzimas lipasas y en células completas durante la bioconversión de ésteres. Así también se presenta una revisión sobre los materiales que normalmente se han utilizado como soportes tanto para enzimas libres como para células completas en la literatura.

Tabla 2. Características de biocatalizadores (Woodwardl, 1985).

Biocatalizador	Forma	Ventajas	Desventajas
Enzimas	Cualquiera	Equipo simple, manejo simple, mejores productividades debido a mayor tolerancia a la concentración	Cuando la reacción utiliza cofactor, éste requiere regenerarse, estabilidades enzimáticas limitadas
	Disueltas en agua	Altas actividades enzimáticas	Posibles reacciones secundarias, sustratos lipofílicos insolubles, requiere extracción
	Suspendidas en solventes orgánicos	Fácil de implementar, fácil manejo, sustratos lipofílicos solubles, fácil recuperación de enzimas	Actividades reducidas
	Inmovilizadas	Fácil recuperación de enzimas	Posible pérdida de actividad durante inmovilización
Células completas	Cualquiera	El cofactor se regenera dentro de la célula, no requiere purificación de enzimas	Equipo costoso, manejo de volúmenes más grandes, baja productividad debido a la tolerancia a la baja tolerancia a la concentración, baja tolerancia a solventes orgánicos, reacciones secundarias debido a un metabolismo no controlado
	En crecimiento (Mitosis)	Mayores actividades	Requiere mayor biomasa, mejorar el metabolismo, mayores subproductos, dificultad en el control del bioproceso
	En reposo (sin mitosis)	Más fácil de manejar, metabolismo reducido, menos subproductos	Menores actividades
	Inmovilizadas	Es posible el reuso	Menores actividades

2.2.1 Lipasas

Las lipasas (EC.3.1.1.3, triacil glicerol hidrolasasas) son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces del éster de triglicéridos; en condiciones termodinámicas favorables son también capaces de catalizar reacciones de síntesis como la esterificación o amidación (Patrick Fickers et al., 2011). Los microorganismos son la fuente más común de lipasas seguido de células de mamíferos y plantas. Su sustrato natural son cadenas largas de ácidos grasos y triacilgliceroles (Yahya et al., 1998). Las reacciones catalizadas por lipasas tienen mayor interés con respecto a los métodos de química sintética, especialmente en la producción de sabores naturales y fragancias, esto debido a la estereo y regio selectividad de la mayoría de las lipasas, además de su grado de pureza en los productos y su aceptación en la industria de alimentos (Rocha et al., 1999).

2.3 Ésteres

Los ésteres son una de las clases de compuestos orgánicos más importantes en la industria química, son sintetizados por procesos químicos principalmente: esterificación, acidólisis, alcoholólisis, glicerólisis y trans-esterificación (Güvenç et al., 2002). Por su composición y propiedades fisicoquímicas tienen diversas aplicaciones en la industria cosmética, de alimentos, fragancias y farmacéutica como solvente, plastificante, perfume, saborizante y en medicina (Rocha et al., 1999).

Como se mencionó una forma de obtener estos compuestos es mediante su síntesis por esterificación, en esta reacción los sustratos son un alcohol y un ácido carboxílico, que en presencia de un catalizador reaccionan para producir un éster (Kuperkar et al., 2014). Debido al interés en estos compuestos la síntesis de ésteres utilizando células completas se ha llevado desde hace varios años. Williams et al., en 1988 reportan el uso de *Candida utilis* en la síntesis de acetato de etilo.

2.3.1 Isobutil propionato

El propionato de isobutilo es un éster de bajo peso molecular, tiene un aroma frutal y se produce naturalmente en manzana, melón, uvas, este éster da el sabor a ron en bebidas, dulces y productos horneados; y es sintetizado por la esterificación de ácido propiónico e isobutanol

(Izci & Hosgün, 2007). En la **Tabla 2** se muestran algunas características del compuesto como su concentración en alimentos y bebidas y el consumo per cápita del éster.

Este éster se ha sintetizado por catálisis química en donde se ha reportado el uso de amberlita 15 en reacción de esterificación (Izci & Hosgün, 2007), y en síntesis por reacción de transesterificación utilizando el mismo catalizador (Steinigeweg & Gmehling, 2004). Otra vía de obtención ha sido la extracción de ésteres de plantas, pero este método es muy costoso (Güvenç et al., 2002).

Se han llevado han cabo estudios de comparación entre el uso de enzimas y células completas; por ejemplo, en la oxidación de ciclohexanonas Zambianchi et al., (2004) obtuvieron una productividad similar entre una monooxigenasa pura y células de *Escherichia coli* TOP10 sobre expresando esta enzima, aunque al utilizar el medio de cultivo para la conversión la pureza fue mayor en la enzima que en la célula (bajando de 98 a 85 %).

Tabla 2. Datos de propionato de isobutilo (Burdock, 2005).

Reporte de uso (ppm)		
Categoría	Usual	Máxima
Bebidas alcohólicas	3	5
Productos horneados	23.97	31.29
Diario congelado	5.61	8.56
Gelatinas, pudin	17.5	40
Bebidas no alcohólicas	3.68	5.45
Dulces suaves	22.91	30
Consumo		
Anual:	121.67 lb	
Individual:	0.1031	mg/kg/día

3. ANTECEDENTES

3.1 Biocatálisis sólido/gas (GS)

En los biorreactores sólido/gas (SG), mediante un gas acarreador los reactivos saturados en fase gas se transportan continuamente a través de un biorreactor de lecho empacado con un biocatalizador en fase sólida (Cordero-Soto et al., 2020). La mayoría de las investigaciones sobre biocatálisis SG han centrado su investigación en evaluar el efecto de las condiciones de operación en el rendimiento termodinámico y cinético de diferentes tipos de biocatalizadores destinados a producir ésteres de cadena corta (Debeche et al., 2005; Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., and Legoy, 1992; Pires et al., 2002; Sanádi et al., 2012), alcoholes (L. Kulishova et al., 2010) y productos químicos de alto valor (Bont et al., 1983; Grizon et al., 2004; Trivedi et al., 2006). En particular, estas investigaciones han evaluado la sensibilidad de la biorreacción SG a condiciones de operación como la actividad termodinámica del agua (a_w), la actividad del sustrato (a_i), la temperatura (T) y la presión total (P). La condiciones de operación depende del biocatalizador y la reacción a llevar a cabo en el biorreactor SG, variando de (Cordero-Soto et al., 2020): a_w de 0.1 a 1, temperatura de 303 a 473 K y presión de 0.001 a 1 bar. La variación de estas condiciones de operación influye en el rendimiento microscópico del biorreactor SG, incluido el microambiente del biocatalizador. Por ejemplo, durante una reacción una a_w cercana a 0,8 desplazó el equilibrio termodinámico la reacción al favorecer la reacción inversa (de ahora en adelante también llamada hidrólisis) en lugar de la reacción directa (de aquí en adelante también llamada síntesis) durante la esterificación (Yahya et al., 1998). Por ejemplo, Kuperkar et al., en 2014 en la síntesis de propionato de isobutilo en un sistema líquido libre de solventes, reporta el efecto de la actividad de agua en la conversión, aumentando la formación del producto al bajar la cantidad de agua presente en el sistema de reacción, por lo que un ambiente con valores de a_w controlados han promovido la reacción biosíntesis del compuesto de interés (Cordero-Soto et al., 2020; L. M. Kulishova & Zharkov, 2017; Yahya et al., 1998).

La actividad catalítica tienen una fuerte dependencia de la temperatura, la velocidad de reacción inicial crece exponencialmente con el aumento de temperatura hasta que la

termoinactivación se hace significativa (Kulishova & Zharkov, 2017). Parvaresh et al., en 1992 evaluaron el efecto de la temperatura en la transesterificación de metil propionato utilizando una enzima lipasa porcina y una cutinasa, encontrando las mayores actividades a 338 y 353 K, respectivamente. Sin embargo, mostraron que para las lipasas porcinas el rendimiento se ve afectado al trabajar con temperaturas mayores a 338 K, obteniendo conversiones menores al 50 % a 373 K. Este efecto en la reducción de la conversión además de deberse a la termo inactividad de la enzima, (Pierre Marchand et al., 2009; Nagayama et al., 2010; Parvaresh, F. et al., 1992; Sanádi et al., 2012). Sanádi et al., en 2012 evaluaron la síntesis de acetato de etilo por esterificación con una lipasa b de *Candida antarctica* en un rango de temperatura de 303-333 K en donde a 323 K se obtuvo la mejor conversión que fue de 92 %, aunque al trabajar a una temperatura de 313 K se obtienen en porcentajes de conversión muy similares al óptimo (91 %). No obstante, también se observó que a 333 K la conversión se redujo al 37 % mostrando un efecto de inactivación de la lipasa. Por lo que llevar la conversión a 313 K permitirá menos requerimientos de energía. La presión también influyó en la actividad de los compuestos implicados durante la reacción, una presión total baja favorece la aplicación de compuestos menos volátiles al reducir su punto de ebullición. Mizobuchi y Nagayama en 2015 observaron cómo se podían mantener bioconversiones más grandes a lo largo del tiempo bajo presiones operativas más bajas que la atmosférica, lo que a su vez llevó a operar el biorreactor a concentraciones más altas respecto a la presión atmosférica.

Aunque el efecto de las condiciones operativas sobre la respuesta macroscópica de los biorreactores SG ha sido evaluado por varios autores (Cordero-Soto et al., 2020), pocos trabajos se han centrado en analizar la cinética de la biosíntesis o evaluar el impacto de los fenómenos de transporte en el rendimiento del biocatalizador. La mayoría de los trabajos se han realizado aplicando tecnologías basadas en líquidos, incluido el uso de solventes orgánicos (Monot et al., 1991; Palmerín-Carreño et al., 2016), reactivos puros (Bhavsar & Yadav, 2018; Güvenç et al., 2002) o fluidos supercríticos (dos Santos et al., 2017; Lozano et al., 2004; Varma & Madras, 2010).

Lamare & Legoy en 1995, (S Lamare et al., 2001) evaluó el impacto de los fenómenos de transporte en la ampliación de un biorreactor SG para la producción de ésteres naturales sobre

una enzima comercial (Novozym® 435). Aunque su análisis fue heurístico, indirectamente dilucidó la influencia de la termodinámica y la dinámica de fluidos en la transferencia de calor y masa y, por lo tanto, en la tasa de producción del producto deseado al observar diferentes rendimientos cinéticos del biocatalizador en dos sistemas biocatalíticos SG: el laboratorio y biorreactor de lecho compacto a escala preindustrial. El reactor a escala de laboratorio dio lugar a una operación isotérmica favoreciendo la termodinámica y la cinética de biorreacción; sin embargo, durante el funcionamiento del biorreactor a escala preindustrial, importantes gradientes de temperatura (15 - 20 K) afectaron el rendimiento del biocatalizador.

Debido a que en un reactor biológico sólido/gas no se hace uso de solventes, teniendo interacción directa del sustrato con las enzimas es posible llevar a cabo la caracterización del comportamiento cinético del biocatalizador (Sylvain Lamare et al., 2004), que es esencial tanto para entender mejor su comportamiento catalítico como para el escalamiento.

La cinética de la síntesis de propionato de isobutilo mediante catálisis se ha descrito mediante un modelo pseudo homogéneo siguiendo el formalismo de Michaelis-Menten de la forma conocida como Bi-Bi Ping Pong, esto en concentraciones bajas de agua en el reactor (Izci & Hoşgün, 2007). En un sistema de fluido super crítico se (Varma & Madras, 2010) llevaron a cabo un estudio cinético de la formación de propionato de isobutilo mediante una lipasa, reportando valores de V_{\max} de $122 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Así también se han llevado a cabo estudios cinéticos buscando comportamientos intrínsecos reduciendo las resistencias a la transferencia de masa durante la biosíntesis disminuyendo el tamaño de partícula del biocatalizador, como lo reportado por Maury et al., en 2005, utilizando una lipasa encapsulada e inmovilizada en sílice gel

3.2 Biocatalizadores

Como se mencionó, el uso de enzimas lipasas puras como biocatalizador en reacciones de síntesis de esteres es lo más reportado. Existen diversos microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) que pueden producir lipasas con diferentes propiedades enzimológicas y especificidad del reactante. La producción de esta enzima se puede promover mediante la optimización del medio de cultivo, y otros factores como pH, temperatura, aireación pueden

afectar la producción extracelular de lipasas. Respecto al medio de cultivo, la presencia de algunos compuestos como ácidos grasos, triglicéridos y surfactantes, han mostrado inducir la secreción de lipasas (A. Domínguez et al., 2003). Específicamente la síntesis de lipasa Lip2p es altamente regulada por sus condiciones de cultivo, como la naturaleza de la fuente de carbono y nitrógeno. Un medio que contenga glucosa, glicerol o nitrógeno mineral no promueve la síntesis de lipasas, sin embargo, permite un crecimiento celular rápido, por el contrario, limitaciones en la fuente de carbono, y fuentes de nitrógeno complejas como caseína y triptona aumentan significativamente el rendimiento en la producción de lipasa. Además, también es altamente favorecida la producción de esta enzima en presencia de sustratos hidrofóbicos como ácidos grasos, metil ésteres y aceites (Fickers et al, 2011).

3.2.2 Células completas como biocatalizador

Existen pocos estudios que hacen uso de células completas en sistemas de reacción SG. Se tienen algunos reportes sobre el uso de células completas (inmovilizadas) de las bacterias *Mycobacterium* PY1 y *Xanthobacter* PY2 para la oxidación de alcanos en estado gaseoso, específicamente propileno y eteno, en donde se reporta un efecto de la actividad de agua sobre la oxidación de los alquenos, específicamente un efecto negativo al reducir la actividad para este tipo de reacción de oxidación. Otros microorganismos que también se han utilizado son *Methylocystis* sp, *Pischia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodococcus erythropolis*; pero principalmente en biorremediación de gases (Lamare et al., 2004). La **Tabla 3** muestra algunos ejemplos del uso de células en sistemas SG, en donde se destaca la aplicación de éstas a reacciones de óxido-reducción.

Dentro de estos microorganismos esta *Yarrowia lipolytica*, que es una levaduras ampliamente usada como modelo de estudio por sus características de secreción de proteínas, dimorfismo, degradación de sustratos hidrofóbicos, producción de lípidos, entre otros (Coelho et al., 2010; P Fickers et al., 2005). La levadura puede producir y excretar enzimas como proteasas, fosfatasas y lipasas, específicamente la lipasa Lip2p se reporta extracelular asociada a la membrana (Liu et al., 2015), también se ha encontrado la presencia de las lipasas I y lipasa II en *Saccharomycopsis lipolytica* (Ota et al., 1982). Se ha reportado la actividad de esta levadura en la síntesis de ésteres como metil ésteres e iso-octil palmitato (Patrick Fickers et al., 2011).

Tabla 3. Reacciones llevadas a cabo con células en sistema SG.

Microorganismo	Reacción	Referencia
<i>Mycobacterium</i> PY1 y <i>Xanthobacter</i> PY2	Oxidación de alcanos	(Hamstra et al., 1987)
Saccharomyces	Óxido-reducción de alcoholes	(Grizon et al., 2004)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Oxidación de butanol	(P. Marchand et al., 2008)
<i>Escherichia coli</i> recombinante	Deshalogenación de 1-clorobutano	(Pierre Marchand et al., 2009)

Białecka-Florjańczyk et al. (2012) llevaron a cabo la esterificación de 2-feniletil acetato utilizando la biomasa de esta levadura en un sistema de reacción en fase líquida, obteniendo porcentajes de bioconversión de 78 % y mostrando la actividad de la lipasa directamente de la biomasa de la levadura.

La producción de lipasas en *Y. lipolytica* es afectada por diferentes factores del medio, la fuente de nitrógeno es una de las más importante, algunos trabajos han mostrado que los sustratos lipídicos promueven la formación de lipasas, y la glucosa puede reprimir su producción. En cuanto a la fuente de nitrógeno la peptona es una mejor fuente que urea o sulfato de amonio para la producción de lipasas con *Y. lipolytica* UFRJ 50682. Triptona y ácido oleico son buenas fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de lipasas extracelulares en una *Y. lipolytica* mutante. Usualmente las lipasas producidas son intracelulares unidas a la pared celular, y es solo excretada al medio cuando la fuente de carbono es escasa en el medio, por esta razón los surfactantes como el Tween 80 pueden ser utilizados en la composición del medio para incrementar la excreción del catalizador (Coelho et al., 2010). Białecka-Florjańczyk et al., en 2012 utilizaron iso-octano para permear la membrana de *Y. lipolytica* favoreciendo la excreción de lipasas en la síntesis de 2- fenil acetato, favoreciendo esta reacción.

Con base en lo anterior, es necesario caracterizar el sistema SG en cuanto a los parámetros experimentales que lo definen, utilizando células completas como biocatalizador para hacer

más viable el proceso. Además, es necesario establecer las bases de ingeniería para proponer diseños eficientes de la tecnología de biorreactores para biocatálisis SG. Esta tarea, sin embargo, exige un análisis riguroso y sistemático de los mecanismos discutido.

4. **JUSTIFICACIÓN**

Los sistemas de biosíntesis en fase gas favorecen reacciones como la de esterificación haciéndolo atractivo para la obtención de este tipo de compuestos; sin embargo, es necesario elucidar el comportamiento del sistema de reacción mediante la caracterización integral de la termodinámica, cinética y los fenómenos de transporte ya que permitirá entender los parámetros que afectan la reacción y conocer las mejores condiciones en las que se lleva cabo la formación del producto de interés. Además, experimentalmente evaluar otras opciones al uso de enzimas como biocatalizador que hagan más atractivo y viable el uso de este tipo de sistemas.

5. **HIPÓTESIS**

- La caracterización de un biorreactor sólido/gas en la síntesis orgánica de propionato de isobutilo, mediante el desarrollo de un modelo matemático que integre la termodinámica, cinética y los fenómenos de transporte dará información de las condiciones de operación que lo definen y un mejor entendimiento del comportamiento este tipo de sistema.
- Es posible llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica mediante el uso de células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab en un sistema sólido/gas.

6. OBJETIVOS

Evaluar un biorreactor sólido/gas en la síntesis orgánica de propionato de isobutilo, y caracterizarlo mediante el desarrollo de un modelo matemático que integre la termodinámica, cinética y los fenómenos de transporte. Y experimentalmente mediante el uso de células completas de *Yarrowia lipolytica* como biocatalizador.

Objetivos específicos del modelado:

- Desarrollar un estudio termodinámico de la reacción de esterificación.
- Desarrollar un estudio cinético.
- Caracterizar el sistema de reacción con un modelo de reactor integral para el sistema y la reacción de esterificación

Objetivos específicos experimentales:

- Diseñar y montar un sistema de biosíntesis sólido/gas.
- Definir las condiciones de crecimiento de la *Y. lipolytica* para su uso como biocatalizador.
- Evaluar la actividad enzimática de las células completas de *Y. lipolytica* inmovilizadas.
- Establecer la capacidad de *Y. lipolytica* como biocatalizador en la síntesis del éster de propionato de isobutilo.

7. ANÁLISIS TEORICO

7.1 Metodología

7.1.1 Modelado

Para elucidar la compleja interacción entre la cinética y los fenómenos de transporte, incluido el impacto de la termodinámica y la dinámica de fluidos en el rendimiento de un biorreactor SG, en este trabajo se desarrolló un modelo de reactor pseudo continuo. La **Figura 1** muestra una imagen del biorreactor de lecho empacado SG que esquematiza las dimensiones y los mecanismos cinéticos y de transporte que tienen lugar durante su funcionamiento. Para evaluar la sensibilidad del biorreactor a las condiciones de operación, todos estos mecanismos fueron analizados en un biorreactor conceptualizado a escala banco considerando como reacción de estudio la esterificación de ácido propiónico y alcohol isobutílico sobre lipasas soportadas de *Candida antártica* con datos experimentales intrínsecos reportados de la literatura (Kuperkar et al., 2014).

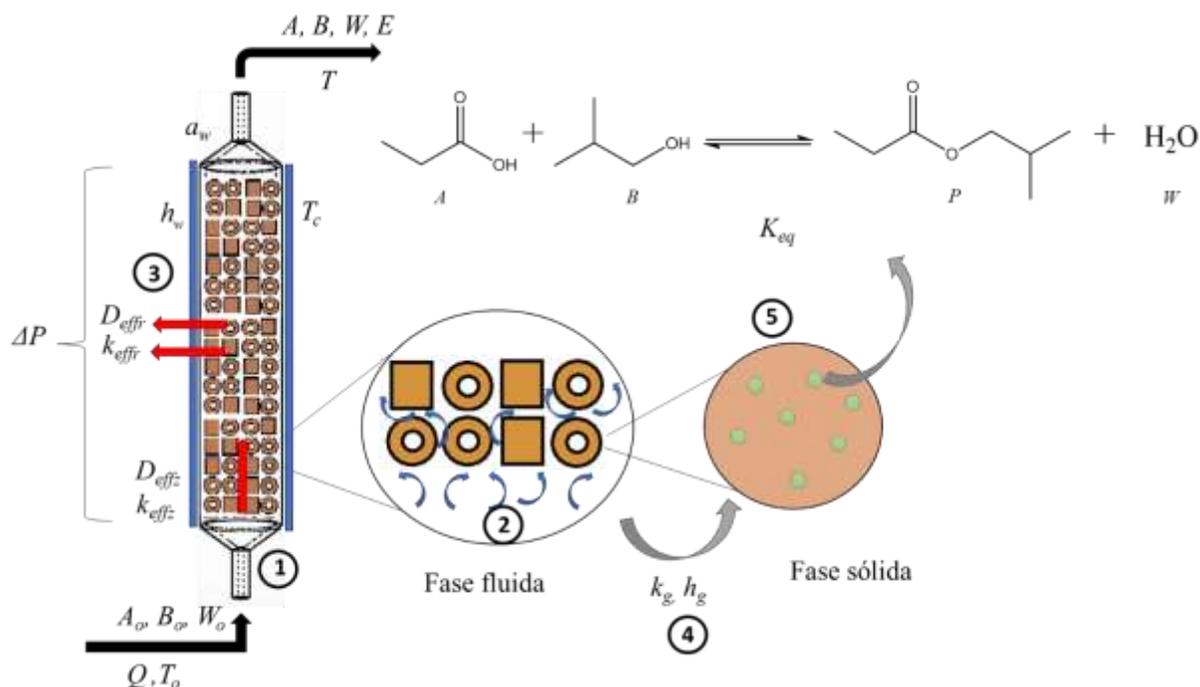


Figura 1. Mecanismos termodinámicos, cinéticos y de transporte involucrados en el biorreactor de lecho empacado SG.

En el reactor SG se consideró un tubo cilíndrico con un diámetro interno de 60 mm y una longitud de 200 mm. Para minimizar los gradientes de temperatura dados por la reacción biocatalítica exotérmica, se consideró que el tubo está enfriado a través de sus paredes con agua como refrigerante y está empacado con un biocatalizador cilíndrico no poroso de 8 mm de diámetro efectivo, con una relación de diámetro de tubo a partícula (dt/dp) de 6. Se consideró un dt/dp bajo debido a su efecto generando perfiles de velocidad que mejoran el transporte local de masa y de calor a lo largo del biorreactor. Para ello, los reactantes se transportan en fase gaseosa a través del lecho empacado utilizando N_2 como gas acarreador por ser un gas inerte. Una vez que entran los reactantes al biorreactor, intervinieron los siguientes mecanismos: (i) transferencia de cantidad de movimiento; (ii) transferencia de calor y masa convectiva y dispersiva a través del seno de la fase fluida; (iii) transferencia de calor y masa en fase sólida; (iv) adsorción de reactantes en sitios activos, reacciones superficiales, incluido el equilibrio termodinámico y reacciones de inhibición secundarias, y desorción de productos; (v) la transferencia de masa del producto a través del biocatalizador al seno de la fase gaseosa; y (vi) transferencia de calor desde el centro del lecho al sistema de enfriamiento. Durante el análisis, las concentraciones de reactante y producto en el gas acarreador se restringieron al incluir su equilibrio físico con la fase gaseosa a las condiciones de operación.

La Figura 2 presenta la aproximación de ingeniería en la reacción implementada para el desarrollo del modelo de biorreactor SG en la que se representan todos los mecanismos involucrados. Primero se caracterizó la termodinámica de la biorreacción para identificar temperaturas y concentraciones de reactantes y productos donde la producción del éster es atractiva. Las funciones de estado, como la energía de Gibbs y la entalpía de reacción, se determinaron para todas las especies mediante el software OpemFOAM (Quantum ESPRESSO). Se utilizaron funciones de estado para calcular el extenso de la reacción y la conversión en el equilibrio termodinámico, evaluando el efecto de la temperatura de reacción, a_w y la relación molar de los reactantes, debido a que estas variables han sido identificadas como las que afectan el rendimiento del biorreactor SG.

Debido a que la cinética da el marco para caracterizar la velocidad de reacción de la bioconversión y permite la conexión entre lo microscópico (biocatalizador), y lo

macroscópico (biorreactor), se caracterizó mediante el desarrollo de un modelo intrínseco en el que se desarrolló la siguiente metodología. Se propuso y evaluó un mecanismo de reacción, considerando adsorción, reacción, equilibrio termodinámico, inhibición y desorción, y se propuso un modelo que contempla la ley de acción de masas y la aproximación del campo medio. Se determinaron los parámetros cinéticos y de equilibrio, incluida la energía de activación. El modelo cinético se utilizó para identificar las condiciones de operación que conducen al mejor desempeño del biocatalizador.

La termodinámica y la cinética de la reacción se transfirieron al modelo de biorreactor SG que considera los fenómenos de transporte. Este modelo es pseudo heterogéneo tiene en cuenta el impacto de la dinámica de fluidos en su rendimiento microscópico y macroscópico. Los campos de velocidad se obtuvieron utilizando las ecuaciones de Navier-Stokes acopladas a los términos de Darcy y Forchheimer para explicar los mecanismos de fricción sólido-fluido. El modelo de biorreactor SG se utilizó para analizar el impacto de las condiciones de operación en el rendimiento microscópico del reactor en términos de velocidades, temperaturas y concentraciones pseudo locales y, por lo tanto, en el rendimiento macroscópico del reactor en términos de conversión y rendimiento del éster. Las simulaciones se realizaron siguiendo un análisis de superficie de respuesta permitieron determinar en qué región el biocatalizador presentó su mejor desempeño.

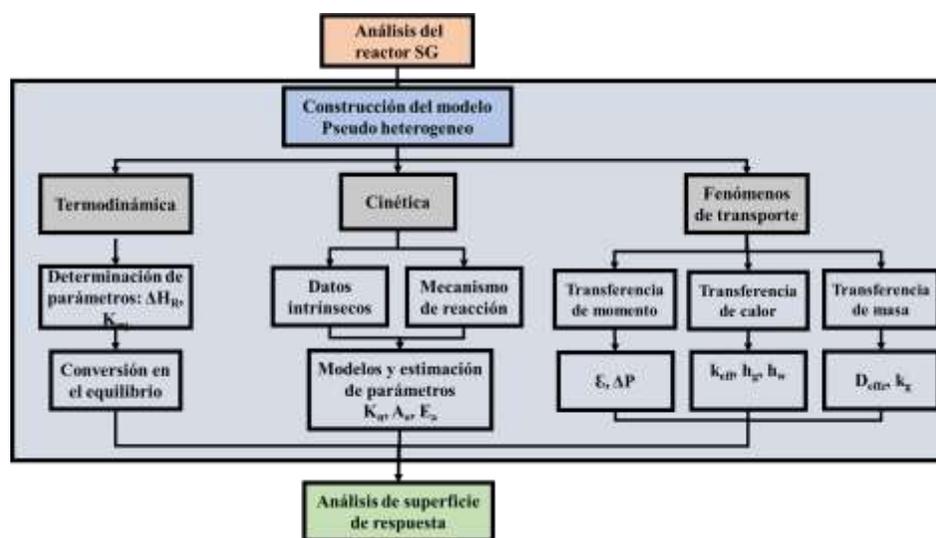


Figura 2. Estrategia del modelo usada para el análisis del comportamiento del biocatalizador en el biorreactor SG.

El comportamiento microscópico y macroscópico del biorreactor SG se predijo utilizando un modelo pseudo continuo considerando dos fases. En las siguientes secciones se presentan las ecuaciones que gobiernan la dinámica de fluidos, la transferencia de calor y masa para las fases gaseosa y sólida. En estas ecuaciones se tomó en cuenta la hipótesis del continuo e incluyeron información termodinámica y cinética extraída de las metodologías antes mencionadas. El modelo se aplicó para tener una comprensión más profunda del efecto de las condiciones de operación en el rendimiento microscópico del reactor mediante el análisis de su influencia en las velocidades, temperaturas y concentraciones pseudo locales. En este sentido, se evaluó el impacto y la interacción de los mecanismos cinéticos y de transporte en la predicción de los perfiles de temperatura y concentración. Luego, la información microscópica se asoció con el desempeño macroscópico del reactor en términos de conversión y rendimiento del del producto a la salida del reactor. En este trabajo, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad paramétrica implementando un enfoque de superficie de respuesta para encontrar la región donde el biocatalizador encontró su mejor desempeño. En el diseño de las simulaciones tuvo en cuenta el efecto de factores independientes: temperatura del refrigerante (313 – 323 K), a_w (0 – 1), relación molar alcohol a ácido (4:1 – 1:4), flujo volumétrico (1,2 – 4,8 L h⁻¹) y temperatura de entrada (298 K – 308 K), sobre el rendimiento microscópico y macroscópico del biorreactor SG. El diseño experimental se basó en el superficie de respuesta del tipo Box-Behnken con dos bloques, que se analizó mediante el software IBM SPSS Statistics.

7.1.2 Modelo Pseudo Heterogéneo

El biorreactor SG se describió mediante un modelo pseudo heterogéneo de dos dimensiones, que considera el lecho empacado como un medio pseudo continuo que considera dos fases, la gaseosa y la sólida. Dado que los reactivos se encuentran diluidos en un fluido inerte (fracción molar, Y_i inferior a 0.1) y la presión total de operación está alrededor de la atmosférica, las ecuaciones que describen el comportamiento del biorreactor siguen las siguientes consideraciones (Bird et al., 2006; Froment & Bischoff, 2011) : Se aplicó la relación constitutiva de la ley de Fick para flux dispersivo; se consideró como gas ideal la fase fluida y sus componentes; y que existe conservación del flujo volumétrico a lo largo del

lecho empacado asumiendo un fluido incompresible con propiedades físicas constantes. Con base en esto, las ecuaciones de transferencia de masa y calor para la fase fluida y la fase sólida se representan de la siguiente manera (Bird et al., 2006; Doraiswamy & Üner, 2013):

Fase gas:

$$\varepsilon \frac{\partial C_i}{\partial t} + \varepsilon v_z \frac{\partial C_i}{\partial z} = \varepsilon D_{effz} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} + \varepsilon D_{effr} \left(\frac{1}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} \right) - (1-\varepsilon) k_g a_s (C_i - C_{is}) \quad (1)$$

$$\varepsilon \rho_f C_{pf} \frac{\partial T}{\partial t} + \varepsilon v_z \rho_f C_{pf} \frac{\partial T}{\partial z} = k_{effz} \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + k_{effr} \left(\frac{1}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right) + (1-\varepsilon) h_g a_s (T_s - T) \quad (2)$$

Fase sólida:

$$(1-\varepsilon) \frac{\partial C_{is}}{\partial t} = (1-\varepsilon) k_g a_s (C_i - C_{is}) + \rho_b \sum_{j=1} v_{ij} r_j \quad (3)$$

$$\rho_s C_{ps} \frac{\partial T_s}{\partial t} = -(1-\varepsilon) h_g a_s (T_s - T) + \rho_b \sum_{j=1} (-\Delta H_j) r_j \quad (4)$$

Condiciones iniciales y de frontera:

$$t=0 \quad C_i = C_{i,ss} \quad \text{and} \quad C_{is} = C_{i,ss} \quad (5)$$

$$T = T_{ss} \quad \text{and} \quad T_s = T_{s,ss} \quad (6)$$

$$z=0 \quad v_z C_{io} = C_i \varepsilon v_z - D_{effz} \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad \text{and} \quad v_z \rho_f C_{pf} T_o = \varepsilon v_z \rho_f C_{pf} T - k_{effz} \frac{\partial T}{\partial z} \quad (7)$$

$$z=L \quad \frac{\partial C_n}{\partial z} = 0 \quad \text{and} \quad \frac{\partial T}{\partial z} = 0 \quad (8)$$

$$r=0 \quad \frac{\partial C_n}{\partial r} = 0 \quad \text{and} \quad \frac{\partial T}{\partial r} = 0 \quad (9)$$

$$r=R_t \quad \frac{\partial C_n}{\partial r} = 0 \quad \text{and} \quad -k_{effr} \frac{\partial T}{\partial r} = h_w (T - T_c) \quad (10)$$

donde T es la temperatura, T_{ss} es la temperatura del fluido en el pseudo estado estacionario, T_s es la temperatura del sólido, $T_{s,ss}$ es la temperatura de sólido en el pseudo estado estacionario, T_c es la temperatura del enfriante ρ_f y C_{pf} es la densidad y la capacidad calorífica del fluido respectivamente, a_s es el área interfacial por unidad de volumen, ρ_s y C_{ps} son la densidad y la capacidad calorífica del sólido respectivamente, C_i es la concentración molar del compuesto i en la fase fluida, $C_{i,ss}$ es la concentración molar del

compuesto i en el pseudo estado estacionario de la fase fluida, es la concentración molar del compuesto i en la fase sólida, $C_{is,ss}$ es la concentración molar del compuesto i en el pseudo estado estacionario de la fase sólida, ρ_b es la densidad del lecho, $R_{i,j}$ es la velocidad de reacción j del compuesto i . Respecto a los parámetros de transporte, D_{effz} y D_{effr} son el coeficiente de dispersión axial y radial, k_g y h_g son los coeficientes de transferencia interfacial de masa y calor, respectivamente, h_w es el coeficiente de transferencia de calor en la pared, k_{effz} y k_{effr} son los coeficientes de conductividad térmica efectiva axial y radial, respectivamente. Los parámetros de transporte fueron calculados por correlaciones reportadas para lecho empacado tomadas de la literatura. (Ligny, 1970; Wakao & Funazkri, 1978). Las ecuaciones gobernantes para describir la dinámica de fluidos en el biorreactor SG están dadas por el modelo de Navier-Stokes-Darcy-Forchheimer para un fluido newtoniano e incompresible (Castillo-Araiza & Lopez-Isunza, 2008; Hernandez-Aguirre et al., 2021) que se define a continuación:

Ecuación de continuidad:

$$\rho_f \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0 \quad (11)$$

$$\rho_f \varepsilon \frac{\partial v_z}{\partial t} + \rho_f \varepsilon v_z \frac{\partial v_z}{\partial z} = \mu_f \varepsilon \left[\frac{1}{r} \frac{\partial v_z}{\partial r} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial r^2} \right] - \varepsilon \frac{\partial P}{\partial z} - \left[\frac{\mu_f}{K} \varepsilon v_z + \frac{\rho_f}{K_z} \varepsilon^2 v_z^2 \right] \quad (12)$$

Condiciones de frontera e iniciales:

$$t = 0 \quad v_z = v_{zss} \quad (13)$$

$$r = 0 \quad \frac{\partial v_z}{\partial r} = 0 \quad (14)$$

$$r = R \quad v_z = 0 \quad (15)$$

$$z = 0 \quad v_z = v_{z0} \quad (16)$$

$$z = L \quad \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0 \quad (17)$$

Donde v_z es la velocidad intersticial axial, P es la presión en el sistema, \mathcal{E} es la fracción vacía, y, ρ_f y μ_f son la densidad y viscosidad del fluido, respectivamente.

Los componentes de la pseudo permeabilidad del soporte K y K_z , se definen como:

$$K = \frac{\mathcal{E}^3 d_p^2}{\alpha (1 - \mathcal{E})^2} \quad (18)$$

$$K_z = \frac{\mathcal{E}^3 d_p^2}{\beta (1 - \mathcal{E})} \quad (19)$$

Para describir la caída de presión a través del lecho empacado, se utilizó la ecuación de Ergun (Nemec & Levec, 2005). Esta correlación considera las pérdidas por fricción relacionadas con las resistencias viscosas caracterizadas por la dependencia lineal de la velocidad del flujo y las resistencias de inercia asociadas con la dependencia cuadrática de la velocidad del flujo. Esta ecuación se da de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta P_z}{L} = \alpha \frac{(1 - \mathcal{E}_o)^2}{\mathcal{E}_o^3} \frac{\mu_f v_0}{d_p^2} + \beta \frac{(1 - \mathcal{E}_o)}{\mathcal{E}_o^3} \frac{\rho_f v_0^2}{d_p} \quad (20)$$

Donde ΔP_z es la caída de presión, L es la longitud del lecho, v_0 es la velocidad superficial a la entrada, \mathcal{E}_o es la fracción vacía promedio del empaque, μ_f y ρ_f es la viscosidad dinámica y la densidad del fluido respectivamente, d_p es el diámetro de partícula equivalente y, α y β son constantes relacionadas con las contribuciones viscosas e inerciales, respectivamente, y son específicas para la partícula y la geometría del reactor. Respecto a la fracción vacía, su variación a través del radio del tubo se determinó siguiendo una correlación específica para cilindros huecos como empaque (Bey & Eigenberger, 1997):

$$\mathcal{E}_{wall} = \mathcal{E}_{\min, HZ} - (1 - \mathcal{E}_{\min, HZ})(r')^2 \quad \text{para } r' < 0 \quad (21)$$

$$\mathcal{E}_{core} = \mathcal{E}_{0, HZ} + (\mathcal{E}_{\min, HZ} - \mathcal{E}_{0, HZ}) e^{\frac{r'}{c}} \cos\left(\frac{\pi r'}{0.876}\right) \quad \text{para } r' > 0 \quad (22)$$

Donde \mathcal{E}_{wall} y \mathcal{E}_{core} son la fracción vacía en la región cercana a la pared y en la región cercana al centro, respectivamente, $\mathcal{E}_{min,HZ}$ es la fracción vacía mínima en el centro del empaque; $\mathcal{E}_{0,HZ}$ es la fracción vacía en el centro de los anillos del lecho empacado, C es un factor asociado con el decremento del perfil de amplitud, teniendo un valor de 2 para cilindros huecos, y r' es la posición radial adimensional definida a continuación:

$$r' = a_0 \frac{R-r}{d_a} - 1 \quad (23)$$

Donde r es la coordenada radial, R es el radio del tubo, d_a es el diámetro interno del cilindro, and a_0 es una constante relacionada con el diámetro externo del cilindro hueco y el diámetro del tubo:

$$a_0 = 1.8 - 2 \frac{d_a}{d_t} \quad (24)$$

Para la solución del modelo matemático descrito por ecuaciones diferenciales parciales parabólicas, se utilizó el método de colocación ortogonal, empleando Polinomios de Legendre, como método numérico para discretizar coordenadas espaciales (Villadsen & Stewart, 1995). El sistema resultante de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) se resolvió mediante el método de Runge-Kutta-Fehlberg.

7.1.3 Cinética

Se desarrolló un modelo cinético para la producción de propionato de isobutilo a partir de ácido propiónico y alcohol isobutílico utilizando lipasas inmovilizadas en resina de poliacrílico macroporosa de *Candida antarctica* marca Zytex Biotech como biocatalizador. En donde se propone un mecanismo de reacción y se transfiere a un modelo matemático. Finalmente, los parámetros involucrados en el modelo se determinan utilizando las observaciones reportadas por Kuperkar et al. Los experimentos se llevaron a cabo en un biorreactor con enfriamiento en la pared a escala de laboratorio operado bajo un régimen de control cinético. Los detalles sobre el sistema experimental se pueden revisar en Kuperkar et al. (Kuperkar et al., 2014)

El mecanismo sigue una sinergia entre los formalismos de Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson y Eley-Rideal (Alvarado-Camacho et al., 2021) tomando en cuenta el mecanismo tipo Ping Pong Bi-Bi asociada con bioconversiones en reacciones de esterificación (dos Santos et al., 2017; Varma & Madras, 2010; Yadav & Lathi, 2006). La **Figura 3** muestra los pasos del mecanismo para la esterificación del ácido propiónico y el isobutanol para producir propionato de isobutilo. La reacción catalizada por una enzima lipasa tiene lugar en el sitio activo, donde comienza con un paso de acilación, se transfiere un protón entre los residuos de serina, histidina y aspartato de la tríada catalítica, activando la nucleofilicidad del grupo hidroxilo de la serina para atacar al grupo carbonilo del primer sustrato (Castillo et al., 2016), sinodo los enlaces hidrogeno de los aminoácidos treonina y glutamina T-40 y Q-106 respectivamente los que conforman la region de la cavidad oxianiónica (Casas-Godoy et al., 2012). En la hipótesis mecanicista propuesta en este trabajo, el ácido propiónico (A) se adsorbe en el sitio activo (E) para formar especies intermedias (EA), que interactúan con los protones para formar especies precursoras de agua (IEW), luego estas especies adsorbidas conducen a la formación de agua (W) y la especie (IE) que a su vez interactúan con el isobutanol (B) para formar nuevas especies intermedias (IEB) que son esenciales para formar el éster. Finalmente, las especies de IEB interactúan con B para formar la especie del paso de inhibición (IEBB) o para producir propionato de isobutilo (P) que libera un protón. Este mecanismo explica un paso de inhibición, identificado en la literatura como la etapa de reacción limitante durante la esterificación (Kuperkar et al., 2014; Varma & Madras, 2010).

La Tabla 4 presenta los pasos de reacción, el número de Horiuti y las ecuaciones de velocidad de reacción involucradas durante el mecanismo de reacción para la esterificación del ácido propiónico e isobutanol. El mecanismo de reacción se transfiere a un modelo matemático que tiene en cuenta los siguientes supuestos: se consideran la ley de acción a de masas y la aproximación del campo medio; el termino fuente en termodinámica se incluye durante la reacción; y el enfoque de pseudo equilibrio se aplica considerando que la formación superficial de éster es el paso que determina la velocidad, mientras que los pasos de adsorción, desorción e inhibición se consideran en cuasi-equilibrio debido a que son más rápidas respecto al paso de la formación del éster.

El modelo cinético quedó de la siguiente manera:

$$R = \frac{kN_T K_A K_{IW} K_I K_{IB} \frac{AB}{W} \left[1 - \frac{1}{K_{EQ}} \frac{PW}{AB} \right]}{1 + K_A [A] + K_A K_{IW} [A] + K_A K_{IW} K_I \frac{A}{W} + K_A K_{IW} K_I K_{IB} \frac{AB}{W} + K_P P + K_A K_{IW} K_I K_{IB} K_{IBB} \frac{AB^2}{W}} \quad (25)$$

Donde C_i es la concentración del compuesto i , k es la constante de reacción, N_T es la concentración total de sitios activos de la enzima, K_i es la constante de adsorción del compuesto i , y K_{EQ} es la constante de equilibrio termodinámico. Esta última, K_{EQ} se obtiene como función de la temperatura:

$$K_{EQ}(T) = \exp \left[\frac{-\Delta G_r^\circ}{R_g T} \right] \quad (26)$$

Donde ΔG_r° es la energía libre de Gibbs de la reacción global, R_g es la constante universal de los gases ideales y T es la temperatura. **La Tabla 5** presenta las funciones de estado de la reacción de esterificación que fueron determinadas respecto a la temperatura con el software abierto Quantum ESPRESSO V6.8 (Giannozzi et al., 2009).

Dada la naturaleza de la reacción enzimática respecto a la entropía y entalpías de adsorción, se consideró que las constantes de adsorción K_i no son afectadas por la temperatura, mientras que la constante de reacción K si es afectada por la temperatura siguiendo la ecuación de Arrhenius':

$$k = A' \exp \left[\frac{-Ea}{R_g T} \right] \quad (27)$$

Tabla 4. Pasos de reacción, número de Horiuti y las respectivas velocidades de reacción que participan en la esterificación de ácido propiónico e isobutanol.

No.	Etapas de reacción	Ecuación	σ
1	$A + E \rightleftharpoons AE$	$r_1 = \bar{k}_1 N_T \theta_E C_A - \bar{k}_{-1} N_T \theta_A = 0$	2
2	$AE \rightleftharpoons IEW$	$r_2 = \bar{k}_2 N_T \theta_A - \bar{k}_{-2} N_T \theta_{IW} = 0$	2
3	$IEW \rightleftharpoons IE + W$	$r_3 = \bar{k}_3 N_T \theta_{IW} - \bar{k}_{-3} N_T \theta_I C_W = 0$	2
4	$IE + B \rightleftharpoons IEB$	$r_4 = \bar{k}_4 N_T \theta_I C_B - \bar{k}_{-4} N_T \theta_{IB} = 0$	2
5	$IEB \rightleftharpoons EP$	$r_5 = R = \bar{k}_5 N_T \theta_{IB} - \bar{k}_{-5} N_T \theta_P$	1
6	$EP \rightleftharpoons E + P$	$r_6 = \bar{k}_6 N_T \theta_P - \bar{k}_{-6} N_T \theta_E C_P = 0$	1
7	$IEB + B \rightleftharpoons IEBB$	$r_7 = \bar{k}_7 N_T \theta_{IB} B - \bar{k}_{-7} N_T \theta_{IBB} = 0$	1

Tabla 5. Funciones termodinámicas de estado en la síntesis de propionato de isobutilo.

T (K)	ΔH_r° (kJ mol ⁻¹)	ΔG_r° (kJ mol ⁻¹)	K_{EQ}
303	-4.29	-2.96	3.26
313	-4.20	-2.91	3.14
323	-4.12	-2.87	3.03

Donde $k' = kN_T$, A' es el factor pre exponencial, Ea es la energía de activación, T la temperatura de reacción and R_g es la constante universal de los gases ideales. Los parámetros cinéticos A' , Ea y K_i , se estimaron ajustando las observaciones reportadas por Kuperkar *et al.* (Kuperkar et al., 2014) minimizando la función objetivo por el método de mínimo cuadrado:

$$RSS(\beta) = \sum_j^{n_{exp}} \sum_k^{n_{resp}} W_{jk} (C_{ij} - \hat{C}_{ij})(C_{ik} - \hat{C}_{ik}) \quad (28)$$

β es el vector de parámetro óptimo, n_{exp} es el número de experimentos independientes, n_{resp} es el número de respuestas, C_{ij} y \hat{C}_{ij} son los valores calculados experimentalmente, y W_{jk} es el factor de peso asignado a la respuesta i-th. El modelo de reactor queda de la siguiente manera:

$$\frac{dC_i}{dt} = Q_{cat} \sum_{j=1} v_{ij} r_j = Q_{cat} v_i R_i \quad (29)$$

Con las siguientes condiciones iniciales: $C_i = C_{i0}$ cuando $t = 0$.

Donde C_i es la concentración del compuesto i , Q_{cat} es la concentración del biocatalizador, y r_j es la velocidad de reacción del compuesto i en el paso j . El modelo de reactor se resuelve utilizando la subrutina DVODE. La metodología para estimar parámetros se realiza mediante una combinación de algoritmos de Rosenbrock y Levenberg-Marquardt. Los diagramas de paridad se construyen como una herramienta visual para la comparación entre las respuestas observadas y las predichos por el modelo. La significancia global de la regresión para el modelo se evalúa a través de la prueba F considerando que la regresión es significativa cuando el valor F calculado es mayor al valor de tablas. El factor de ponderación, calculado para cada respuesta, corresponde a los elementos diagonales de la inversa de la matriz de varianza-covarianza del error experimental. La importancia de cada parámetro individual se comprueba mediante la prueba t, y el parámetro se considera significativo si el valor t calculado supera al tabulado. El valor t se determina como el cociente del parámetro estimado menos el de referencia, dividido por la desviación estándar. Finalmente, el coeficiente de correlación entre los parámetros estimados i y j se calcula mediante el análisis de covarianzas entre pares de parámetros.

Parámetros de transporte:

Los parámetros efectivos de transporte involucrados en el modelo de transporte de cantidad de movimiento (α y β), Ecs. (11) - (24), se estimaron restringiendo la solución numérica aplicando los criterios de conservación de energía dada por la Ec. (11). Esta metodología permite la cuantificación de resistencias por fricción viscosas e inerciales debido a la presencia de superficies sólidas en el biorreactor SG (Gómez-Ramos et al., 2019). Además, los parámetros efectivos involucrados en el modelo de transporte de calor y masa, Ecs. (1)-(11), se determinaron a partir de correlaciones reportadas para lechos empacados (Derks & Dixon, 1997; Dixon, 1997; Elsari & Hughes, 2002; Gamson, 1951; Gunn, 1987; Ligny, 1970; McCune & Wilhelm, 1949). **La Tabla 6** presenta los parámetros estimados para la dinámica de fluidos y determinados para el transporte de calor y masa.

Tabla 6. Parámetros de transporte efectivos utilizados en el modelo del reactor SG.

Parámetro	Valor	Fuente
α	33.85*	-
β	0.4353*	-
$D_z, m_r^2 h^{-1}$	$3.3 \times 10^{-2} - 5 \times 10^{-2}$	(Gunn, 1987)
$D_r, m_r^2 h^{-1}$	$3 \times 10^{-2} - 6 \times 10^{-2}$	(Ligny, 1970)
$k_g, m_s^2 h^{-1}$	17 - 20	(McCune & Wilhelm, 1949)
$h_g, kJ m_s^2 h^1 K^{-1}$	180 - 200	(Gamson, 1951)
$k_{effz}, kJ (m_r hK)^{-1}$	$4 \times 10^{-1} - 8 \times 10^{-1}$	(Elsari & Hughes, 2002)
$k_{effr}, kJ (m_r hK)^{-1}$	$7 \times 10^{-1} - 10 \times 10^{-1}$	(Derks & Dixon, 1997)
$h_w, kJ (m_r^2 hK)^{-1}$	5 - 50	(Dixon, 1997)

*Valores estimados en este trabajo siguiendo los criterios de conservación y análisis de regresión con la correlación reportada por Nemeč (Nemeč & Levec, 2005).

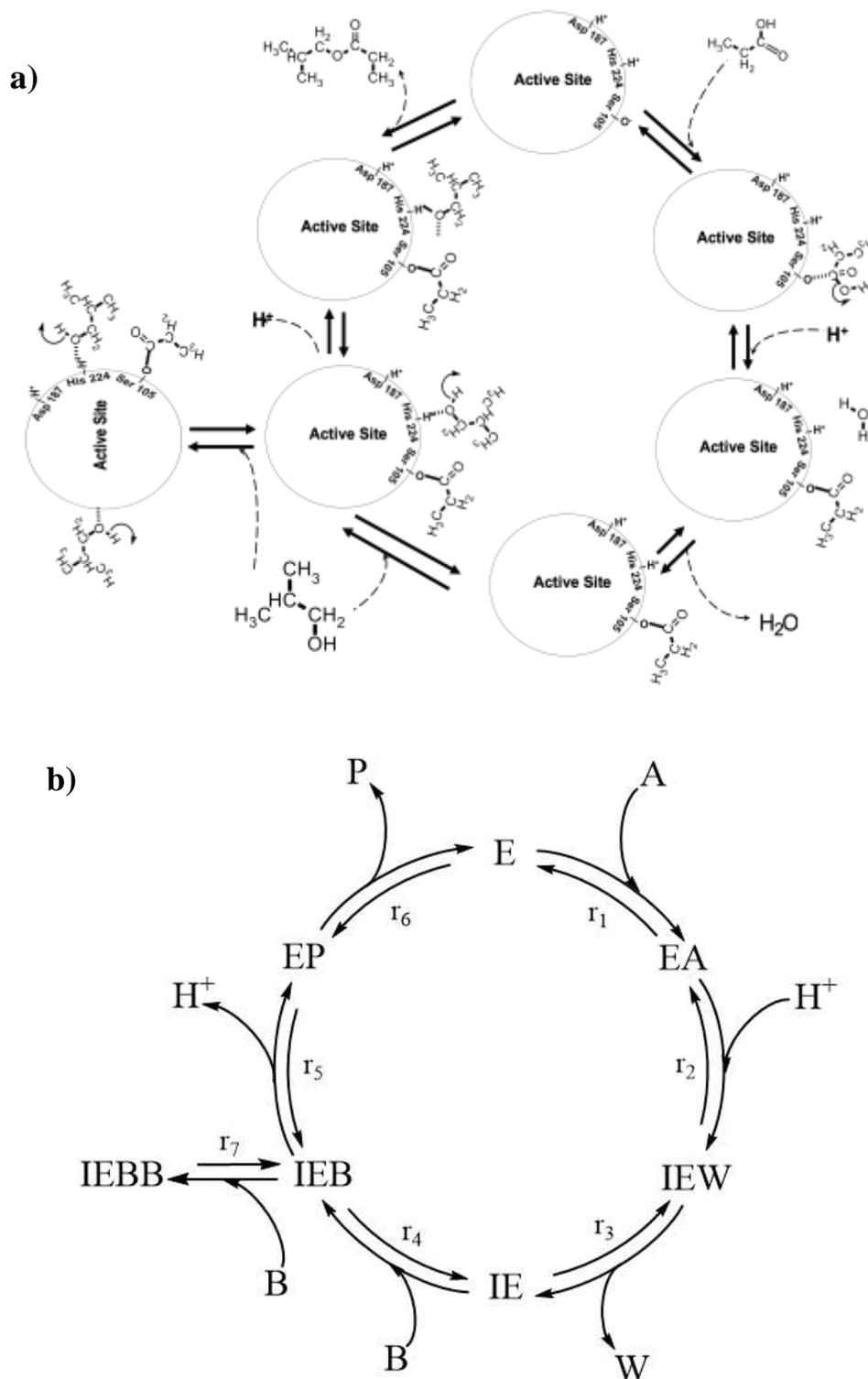


Figura 3. a) mecanismo de reacción para la síntesis de isobutil propionato considerando un paso de inhibición por alcohol. b) Mecanismo de reacción simplificado. *A, B, P, W* representan el ácido propiónico, alcohol isobutílico, propionato de isobutilo y agua respectivamente.

Análisis de superficie de respuesta

El análisis de superficie de respuesta se llevó a cabo a tres niveles: termodinámico, cinético y biorreactor SG. En primer lugar, a nivel termodinámico, para identificar la región donde la reacción de esterificación no está limitada por la termodinámica, el modelo matemático se da de la siguiente manera:

$$K_{EQ}(T) = \exp\left[\frac{-\Delta G_r^\circ}{R_g T}\right] \quad (30)$$

$$\xi = \frac{n_i^{eq} - n_i^i}{\nu_i} \quad (31)$$

$$X_i = 1 - \frac{n_i^{eq}}{n_i^i} \quad (32)$$

$$K_{EQ}(T) = \frac{(n_P + \xi)(n_W + \xi)}{(n_A - \xi)(n_B - \xi)} \quad (30)$$

$$\xi = \frac{n_i^{eq} - n_i^i}{\nu_i} \quad (31)$$

$$x_i = 1 - \frac{n_i^{eq}}{n_i^i} \quad (32)$$

Donde n_i^{eq} son los moles del compuesto i en equilibrio termodinámico, n_i^i los moles iniciales del compuesto i , ν_i es el número estequiométrico de compuestos i , ν_i es el extenso de la reacción y X_i representa la conversión de especies i en equilibrio. La **Tabla 7** presenta el balance estequiométrico en términos del extenso de reacción utilizado para resolver la ecuación 30. Para determinar la magnitud de la reacción en diferentes condiciones de operación, se resolvieron las Ecs. 30 y 31 simultáneamente por el método de Broyden. Una vez determinada la extensión de la biorreacción, la conversión en equilibrio se determina utilizando la Ec. 32. El análisis de la respuesta termodinámica de la superficie se llevó a cabo con el siguiente rango de condiciones de operación: T de 293 a 333 K; a_w de 0 a 1; y relación molar de alcohol:ácido de 4:1 a 1:4.

Tabla 7. Balance molar en términos del extenso de reacción.

Especies	V	Número inicial de moles	Número final de moles
Ácido propiónico	1	η_A	$\eta_A - \xi$
Isobutanol	1	η_B	$\eta_B - \xi$
Propionato de isobutilo	1	η_P	$\eta_E + \xi$
H ₂ O	1	η_W	$\eta_W + \xi$
N ₂	0	η_{N_2}	η_{N_2}
Suma	0	$\eta_i = \eta_A + \eta_B + \eta_E + \eta_W + \eta_{N_2}$	$\eta_f = \eta_i = \eta_t$

Para la reacción global la constante de equilibrio se puede expresar en términos del extenso de reacción de la siguiente manera:

$$K(T) = \exp \frac{-\Delta G^\circ}{RT} = \frac{Y_E Y_W}{Y_A Y_B} = \frac{\left(\frac{n_E + \xi}{n_t}\right) \left(\frac{n_W + \xi}{n_t}\right)}{\left(\frac{n_A - \xi}{n_t}\right) \left(\frac{n_B - \xi}{n_t}\right)} = \frac{(n_E + \xi)(n_W + \xi)}{(n_A - \xi)(n_B - \xi)} \quad (33)$$

A nivel cinético, el modelo propuesto se utiliza para identificar las condiciones de operación que conducen al mejor desempeño del biocatalizador; este análisis considera el impacto de tres factores independientes: T de 303 a 323 K; a_w de 0.2 - 1; y la relación molar de alcohol:ácido de 4:1 a 1:4. Finalmente, a nivel del biorreactor SG, las simulaciones permitieron determinar la región donde el biocatalizador presenta su mejor desempeño. Debido a las limitaciones computacionales relacionadas con la solución numérica de las Ecs. (1) - (24), el análisis de superficie de respuesta con un diseño de simulación Box-Behnken (Chandane et al., 2017), con dos bloques, incluyendo el efecto de los siguientes factores: Tc (303 – 323 K), a_w (0.2 – 1), relación alcohol:ácido (4:1 – 1:4), flujo volumétrico normal de entrada, Q_o , (1.2 – 4.8 L h⁻¹) y temperatura de entrada, T_o, (293 K – 323 K). Así, el modelo se resuelve guiado por el diseño de simulación estadística y su salida permite la determinación de un modelo estadístico cuya estructura matemática permite la optimización del biorreactor SG en tiempos de cálculo razonables. Una vez que se identificó la zona donde

el biocatalizador presenta su mejor comportamiento macroscópico en el biorreactor SG, se realizó un análisis fenomenológico del reactor, Ecs. (1) - (24), para tener una comprensión más profunda del efecto de las condiciones operativas en el rendimiento microscópico de la tecnología SG. La **Tabla 8** resume las dimensiones del reactor y el rango de condiciones operativas utilizadas durante el modelado del biorreactor SG.

Tabla 8a. Dimensiones del reactor utilizado en el modelo.

Dimensiones	Valor
L, mm_r	200
d_t, mm_r	60
d_p, mm_s	9.7
d_i, mm_r	8.8
d_e, mm_r	15
h, mm_r	15

Tabla 8b. Condiciones de operación usadas en el modelo del reactor

Condiciones de operación	Valor
Presión de operación, P, atm	atmosférica
Temperatura de entrada, T_o, K	293-323
Temperatura del refrigerante, T_c, K	303-323
Fujo volumétrico en la entrada, $Q_o, L h^{-1}$	1.2-4.8
Relación molar alcohol:ácido	4:1-1:4
Concentración de entrada de A, $C_{A_o}, mol_A m_f^{-3}$	0.078-0.875
Concentración de entrada de B, $C_{B_o}, mol_B m_f^{-3}$	0.312-3.5

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Análisis termodinámico

Dado que la presencia de agua en el medio puede favorecer la hidrólisis del propionato de isobutilo en lugar de su síntesis a partir de ácido propiónico y alcohol isobutilílico, se realizó un análisis termodinámico de estas reacciones evaluando su constante de equilibrio en función de la temperatura. Como se observa en las **Figura 4a y 4b**, los incrementos en la temperatura aumentan la concentración de reactantes en la fase gaseosa, sin embargo, la magnitud de la constante de equilibrio para la reacción de síntesis (reacción directa) disminuye, mientras que la constante de equilibrio para la reacción de hidrólisis (reacción inversa) presenta la tendencia opuesta. Como muestra la **Figura 5**, aunque la termodinámica favorece la producción de propionato de isobutilo, los valores de las constantes de equilibrio revelan la contribución de la reacción de hidrólisis durante la bioconversión, por lo que su efecto debe tenerse en cuenta durante el diseño del biorreactor SG. En cuanto al orden de magnitud de la constante de equilibrio, es similar al informado para las reacciones de hidrólisis y síntesis (Ali et al., 2007; Izci & Hosgün, 2007). Alí et al. (Ali et al., 2007) reportaron resultados similares para la esterificación de ácido propiónico y 1-propanol donde las constantes de equilibrio variaron de 3.3 a 2.8 a temperaturas de 303 a 323 K, respectivamente. A continuación, se presenta un análisis de superficie de respuesta de la conversión de equilibrio para establecer las condiciones en las que se puede potenciar la reacción de síntesis.

Debido a que el agua es por un lado, esencial para la estabilidad y actividad catalítica de las enzimas durante la producción de ésteres (Bellissent-Funel et al., 2016), y, por otro lado, su presencia favorece la reacción de hidrólisis, el análisis de superficie de respuesta para el equilibrio la conversión necesita evaluar el efecto de a_w en la síntesis de propionato de isobutilo. Por esto la **Figura 6** muestra curvas de superficie que muestran el efecto de la relación alcohol:ácido y la temperatura en la conversión de equilibrio a diferentes valores de a_w (0 - 1). Las Ecs. (30) – (32) se utilizan como modelo para obtener las curvas de superficie.

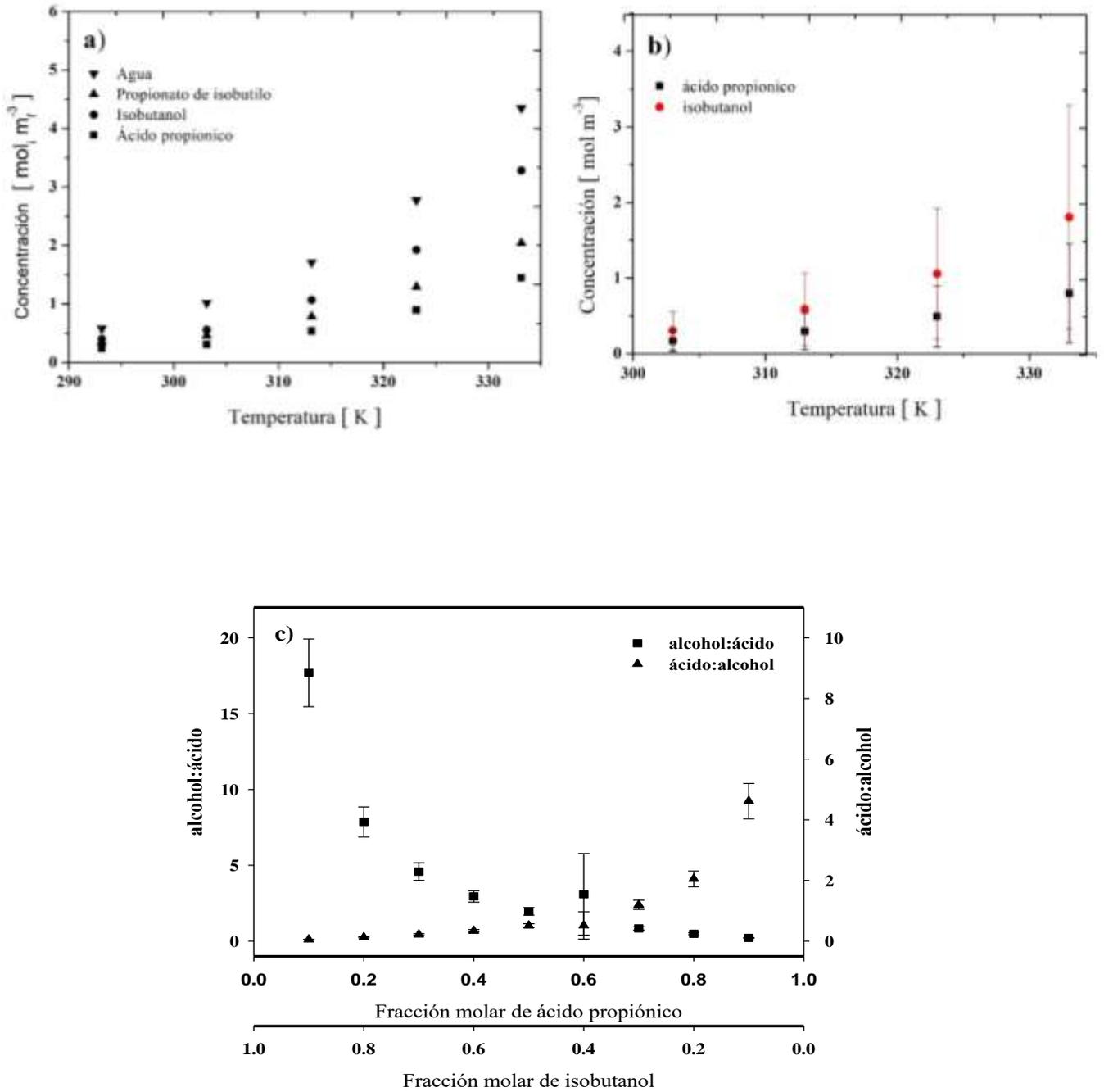


Figura 4. a) Concentración de los componentes de la reacción calculados en fase gas a diferente temperatura con una fracción molar en líquido de 1, b) concentración de los componentes de la reacción calculados en fase gas a diferente temperatura a diferente fracción molar en líquido 0-1 para ambos reactantes. c) relación molar alcohol:ácido calculada a diferente temperatura respecto a la fracción molar en líquido de los reactantes (0.1-0.9).

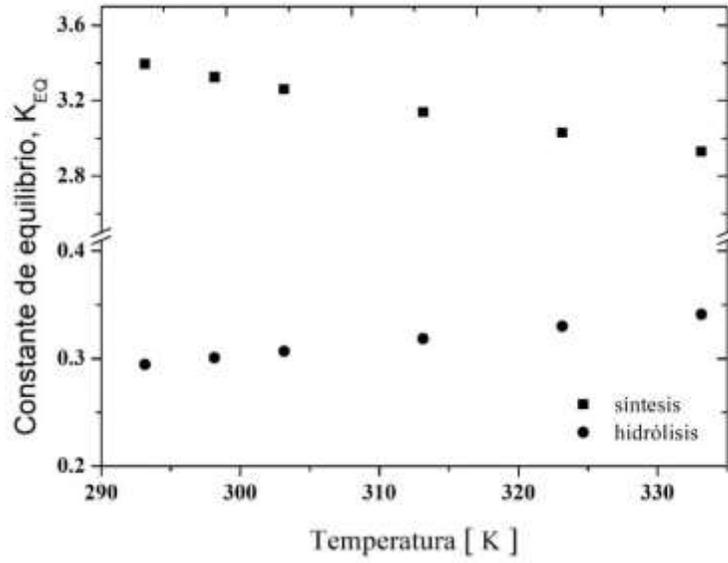


Figura 5. Valores de la constante de equilibrio en la síntesis e hidrólisis de propionato de isobutilo a diferente temperatura.

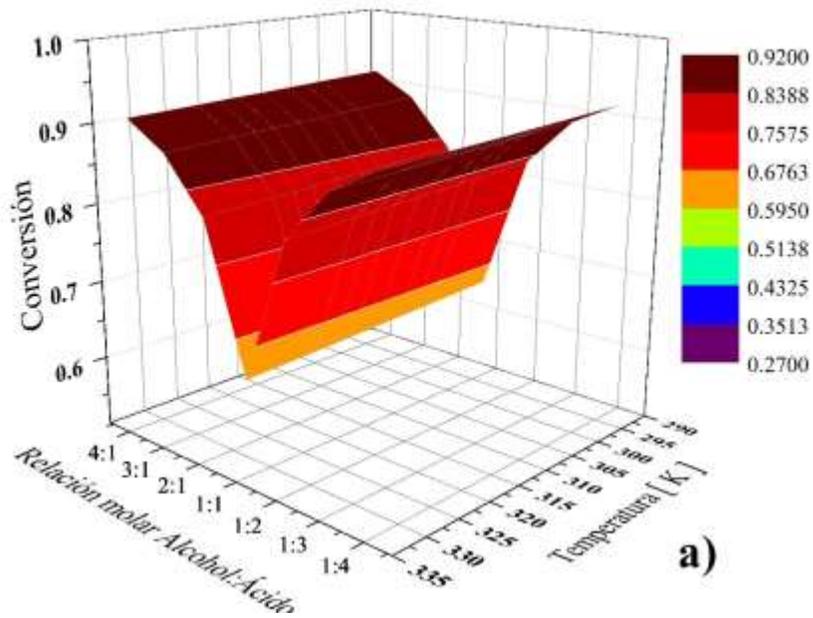


Figura 6. a). Efecto de la relación molar y temperatura en la conversión a $a_w: 0$

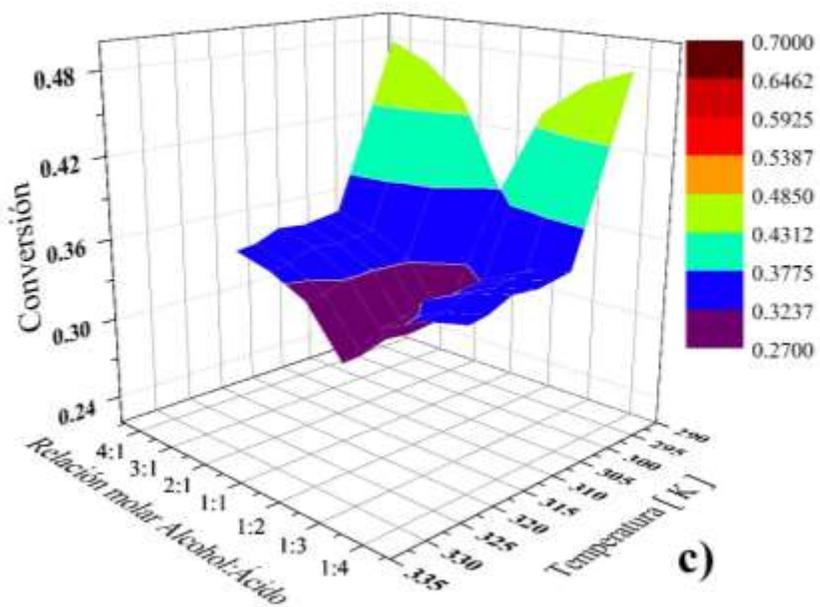
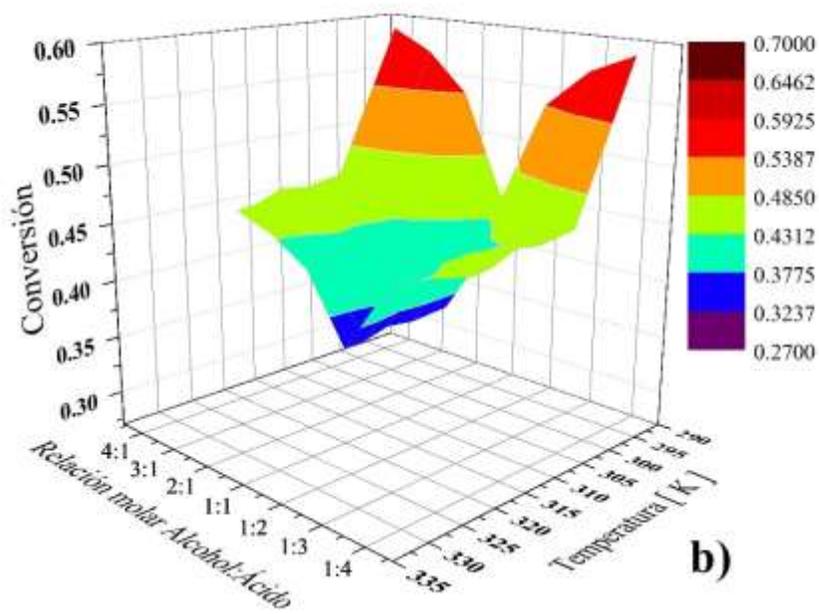


Figura 6. Efecto de la relación molar y temperatura en la conversión a diferentes valores de a_w : a) 0, b) 0.6 y c) 1.

Por lo que valores mínimos de a_w (~ 0), en combinación con proporciones adecuadas de alcohol:ácido (1:4 o 4:1) y bajas temperaturas (~ 303 K), son condiciones de operación que conducen a minimizar las restricciones termodinámicas en términos de conversión debido a la diferencia entre la concentración de los reactantes que hace que no se llegue al equilibrio termodinámico favoreciendo la formación del éster y agua. Esta información se transfiere a la cinética para evaluar su efecto durante la síntesis de propionato de isobutilo en el biorreactor SG.

7.2.2 Análisis Cinético

Como instrumento para validar el modelo cinético, se determinó en primer lugar el gráfico de paridad para la bioconversión de sustratos. Esta gráfica de paridad, ver la Figura 7, aclara la eficacia del modelo para ajustar las observaciones, con un R^2 de ca. 0.95. En este sentido, el valor F de la regresión es 9.92×10^3 , mientras que el valor F tabulado es 2.95, lo que indica la significancia estadística de la regresión.

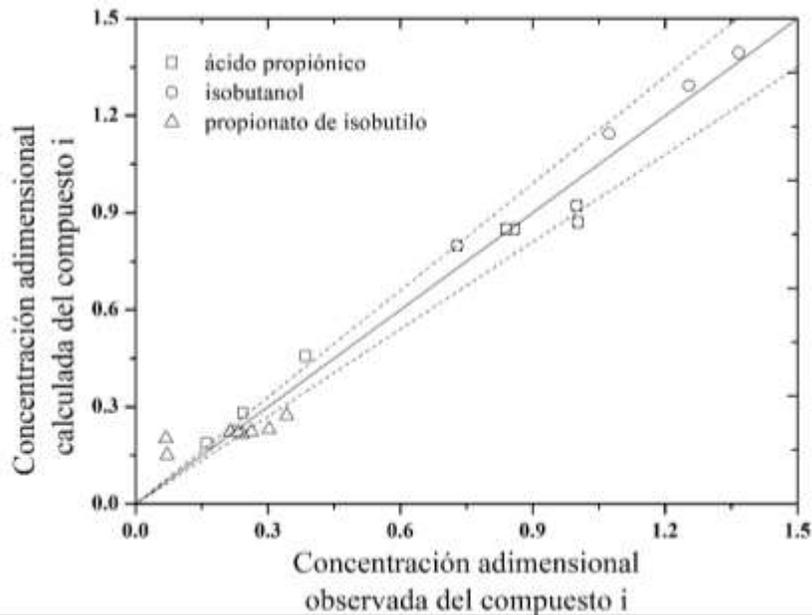


Figura 7. Gráfico de paridad comparando las concentraciones de la especie i observadas contra las calculadas por el modelo. Las líneas punteadas representan una desviación de 5 % a la línea de paridad.

En la **Tabla 9** se muestran los valores estimados de los parámetros cinéticos y su intervalo de confianza correspondiente con un 95 % de probabilidad. Los parámetros presentan un valor t (24 - 40), mayor que el tabulado (2.7), mientras que el coeficiente de correlación estadística obtenido para cada par de parámetros se encuentra entre -0.9 y +0.9. Debido a esto, todos los parámetros exhibieron intervalos de confianza bajos, lo que les dio significación estadística. Los parámetros cinéticos, incluyendo la energía de activación y el factor pre exponencial, y las constantes de adsorción de equilibrio están en el rango reportado para las reacciones de esterificación (Dandavate et al., 2009; Kuperkar et al., 2014; Perez et al., 2007). En cuanto a la energía de activación para la producción de propionato de isobutilo se obtiene un valor de $14,56 \text{ kJ mol}^{-1}$; esta energía de bioconversión conduce a números de Arrhenius ($EA R^{-1} T_c^{-1}$) que oscilan entre 5 y 5.5, un rango identificado en sistemas catalíticos que conducen a un reactor isotérmico (Froment GF, Bischoff KB, 2011). Al examinar los parámetros de equilibrio, la constante de adsorción de equilibrio más grande se asocia con la formación de especies precursoras de agua (IEW, KIW) en los sitios de enzimas, mientras que la constante de adsorción de equilibrio más baja se asocia con la formación de especies inhibitoras (IEBB, KBB) en los sitios de enzimas. Las constantes de adsorción de equilibrio para las otras especies muestran valores similares, impactando en la misma magnitud sobre la velocidad de reacción.

La sensibilidad de la velocidad de reacción a la hidrólisis y adsorción de diferentes especies se evaluó siguiendo dos enfoques de modelado. En el primero, la velocidad de reacción inicial se predice despreciando las restricciones termodinámicas o la adsorción de cada especie (θ_i) en los sitios biocatalíticos. En el segundo enfoque, la velocidad de reacción inicial se predice variando cada parámetro contenido en el modelo cinético alrededor de su intervalo de confianza. La **Figura 8** muestra los resultados mediante el uso de un diagrama de dispersión que compara las velocidades de reacción iniciales pronosticadas mediante el uso del modelo cinético con sus parámetros estimados frente a las velocidades de reacción iniciales predichas por el modelo cinético con sus parámetros estimados. Se agrega como referencia una línea continua con una pendiente de 1 y una intersección en y de 0, de modo que cuando una predicción que omite un término o varía un parámetro alrededor de su intervalo de confianza se encuentra en la línea, la respuesta la variable no es sensible al

cambio. Para tener una visualización más clara de la sensibilidad de la respuesta a los fenómenos, en el diagrama de dispersión se incorporan líneas discontinuas que indican desviaciones de $\pm 15\%$ con respecto a la línea de referencia. La **Figura 8** muestra que la velocidad de reacción inicial es sensible a la termodinámica, específicamente en aquellas condiciones de operación que favorecen el camino de la hidrólisis (reacción inversa). Además, aunque la velocidad de reacción inicial es sensible a la cobertura de la mayoría de las especies superficiales, IEW y EP son las que afectan en mayor medida la magnitud de la velocidad de reacción.

Tabla 9. Parámetros cinéticos y su intervalo de confianza correspondiente con 95 % de nivel de confianza.

Parámetro	Valor estimado	Valor de t-	Límite inferior	Límite superior
$K_A, m_f^3 mol^{-1}$	1.550×10^{-4}	18.50	1.44×10^{-4}	1.65×10^{-4}
$K_{IW}, [-]$	5.34	48.42	5.322	5.366
$K_I, mol m_f^{-3}$	2.552×10^2	24.07	2.547×10^2	2.556×10^2
$K_{IB}, m_f^3 mol^{-1}$	1.59×10^{-4}	27.63	1.57×10^{-4}	1.61×10^{-4}
$K_P, m_f^3 mol^{-1}$	7.22×10^{-4}	30.10	7.10×10^{-4}	7.34×10^{-4}
$K_{IBB}, m_f^3 mol^{-1}$	4.80×10^{-5}	40.31	4.71×10^{-5}	4.89×10^{-5}
$A', mol^{-1} h^{-1} g_{cat}^{-1}$	53.68	31.03	5.345	5.391
$E_a, KJmol^{-1}$	14.56	33.24	14.52	14.59

Al utilizar el modelo cinético desarrollado, se realizó un análisis de superficie de respuesta para identificar las condiciones de operación donde el biocatalizador presenta su mejor desempeño catalítico y cinético. Por lo tanto, se realizan simulaciones bajo diferentes condiciones de temperatura, actividad del agua y relación molar. Luego, las respuestas se utilizan para desarrollar las curvas de superficie. La **Figura 9** muestra el efecto de la a_w y la temperatura en la bioconversión en diferentes proporciones molares de alcohol a ácido, incluidas las que conducen a resultados atractivos durante el análisis termodinámico. La conversión en las curvas de superficie se calcula en un tiempo de reacción específico (5 h) en el rango de condiciones operativas utilizadas durante la experimentación. Reconociendo las restricciones termodinámicas, la conversión es siempre más baja que la conversión de equilibrio máxima, de modo que varía de 0.05 a 0.55 en las condiciones de operación evaluadas aquí. Dado que es necesaria una a_w inicial durante la reacción para favorecer el microambiente cinético del biocatalizador (Nagayama et al., 2010) (Nagayama et al., 2010), se obtienen curvas de superficie de bioconversión a las actividades de agua involucradas durante la experimentación que se reporta en la literatura (a_w : 0.2 – 1.0) (GOLDBERG et al., 1990; Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., and Legoy, 1992) las condiciones de operación donde el biocatalizador presenta su mejor desempeño cinético, concuerda con el análisis termodinámico considerando la presencia de agua en el medio, tal que una combinación de una a_w baja (0.2), una temperatura baja (303 K) y una gran diferencia entre la relación alcohol:ácido (4:1 o 1:4) conducen a conversiones altas (0.48 – 0.55). Las curvas de superficie de respuesta muestran el efecto negativo de la temperatura en la velocidad e reacción (**Figura 10a**) lo que corresponde con lo reportado en la literatura con biocatalizadores en esterificación (Alvarez-Macarie & Baratti, 2000; Kuperkar et al., 2014; Laudani et al., 2007).

Para explicar el rendimiento observado, en la **Figura 10**, se presenta el impacto de la temperatura y la relación alcohol:ácido en la velocidad de reacción inicial, el término de resistencia termodinámica y la cobertura de los sitios enzimáticos en el biocatalizador con una a_w de 0.2. Esta respuesta presenta una tendencia opuesta a la que se observa para la bioconversión, lo que indica que el desempeño macroscópico del catalizador se ve afectado principalmente por la termodinámica y las especies adsorbidas en los sitios activos. Al

analizar el impacto de la termodinámica en la bioconversión a través de la **Figura 10c**, el término $K_{EQ}^{-1}C_P C_W C_A^{-1} C_B^{-1}$, involucrado el termino fuente de la bioconversión, varía de 0.4 a 0.6, siendo mayor a una relación alcohol:ácido de 1:1. Se debe tener en cuenta que cuando este término de resistencia termodinámica alcanza un valor de cero, no hay limitaciones termodinámicas, pero cuando alcanza un valor de 1, la bioconversión no puede tener lugar. Respecto a la cobertura de sitios activos, la **Figura 10b** muestra como durante la bioconversión se identifica la máxima concentración de sitios activos a la temperatura de reacción de 303 K y relaciones alcohol:ácido de 4:1 o 1:4. Por lo tanto, la magnitud de la bioconversión depende en gran medida de la termodinámica y la cobertura de especies adsorbidas en los sitios activos, por lo que el diseño del biorreactor SG debe tener en cuenta esta información para llevar a cabo su operación óptima.

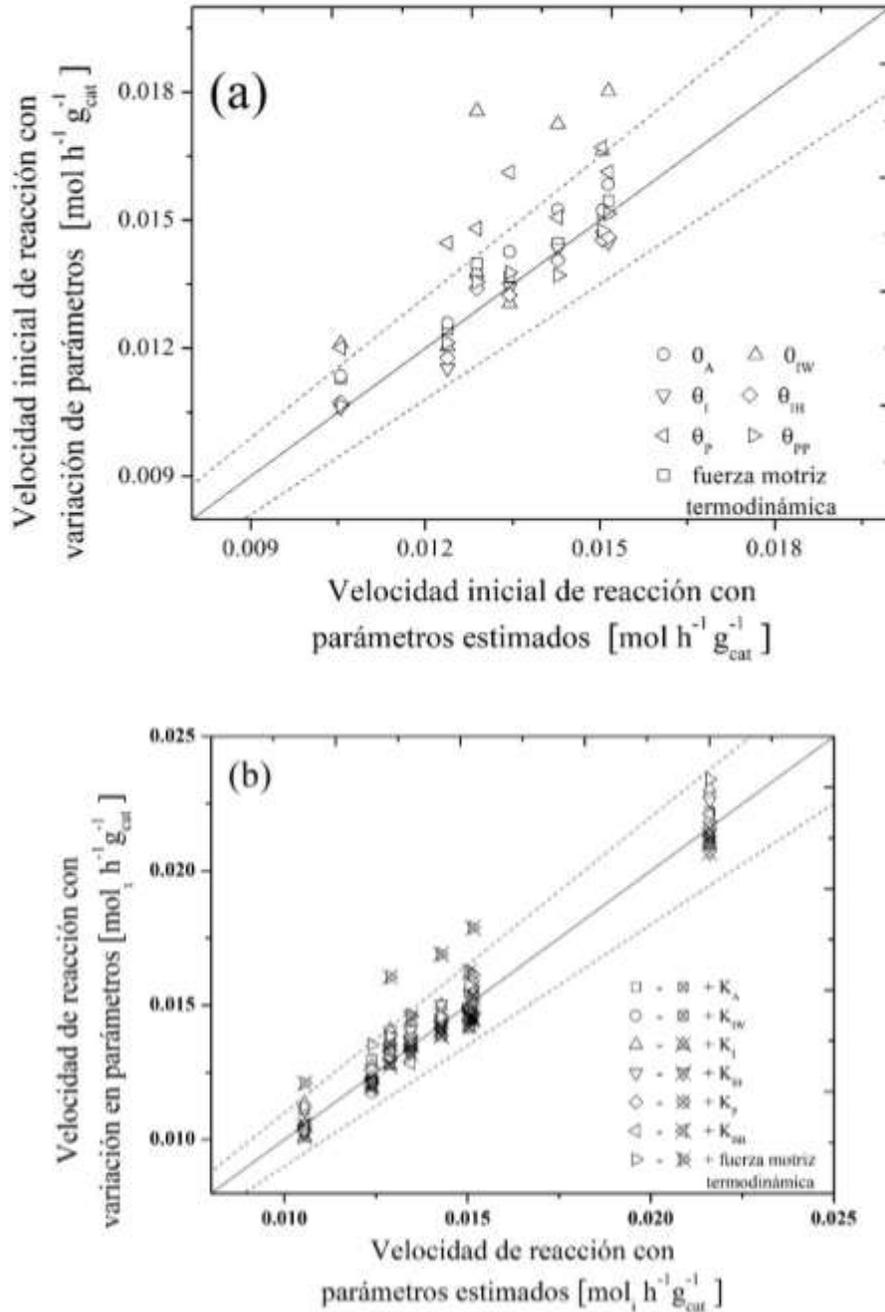


Figura 8. Diagrama de dispersión que compara las velocidades de reacción inicial predichas por el modelo cinético desarrollado con las velocidades de reacción iniciales al: a) eliminar el efecto del parámetro específico del mecanismo de adsorción en el modelo cinético y b) variar el parámetro cinético alrededor de su intervalo de confianza. Se agrega como referencia una línea continua con una pendiente de 1 y una intersección con el eje y de 0. Las líneas discontinuas indican una desviación de $\pm 15\%$ con respecto a la línea de referencia.

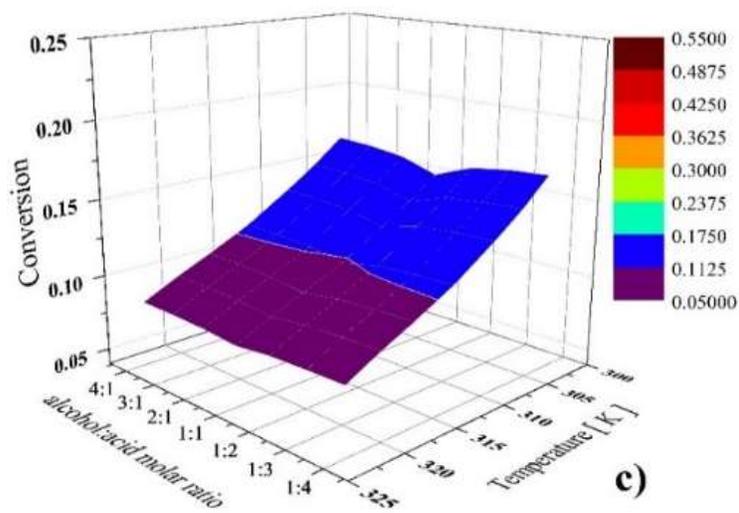
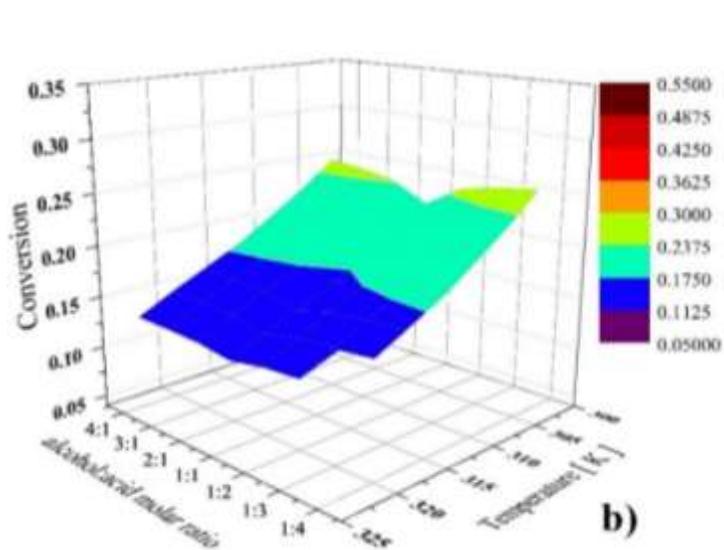
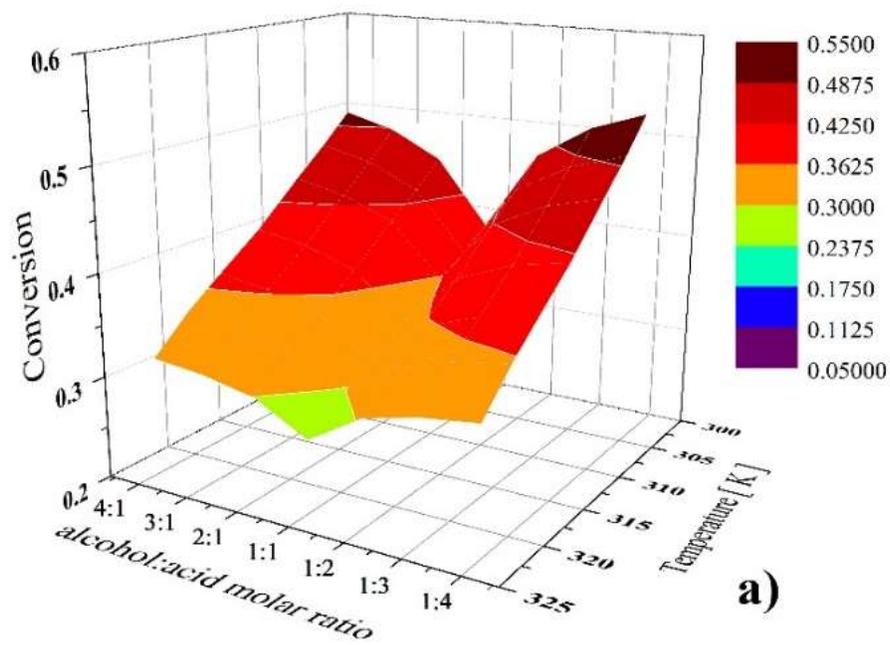


Figura 9. Efecto de la relación molar y temperatura en la conversión a tres valores de a_w ; a) 0.2, b) 0.6 y c). La sabana de superficie se obtuvo a las 5 h de reacción.

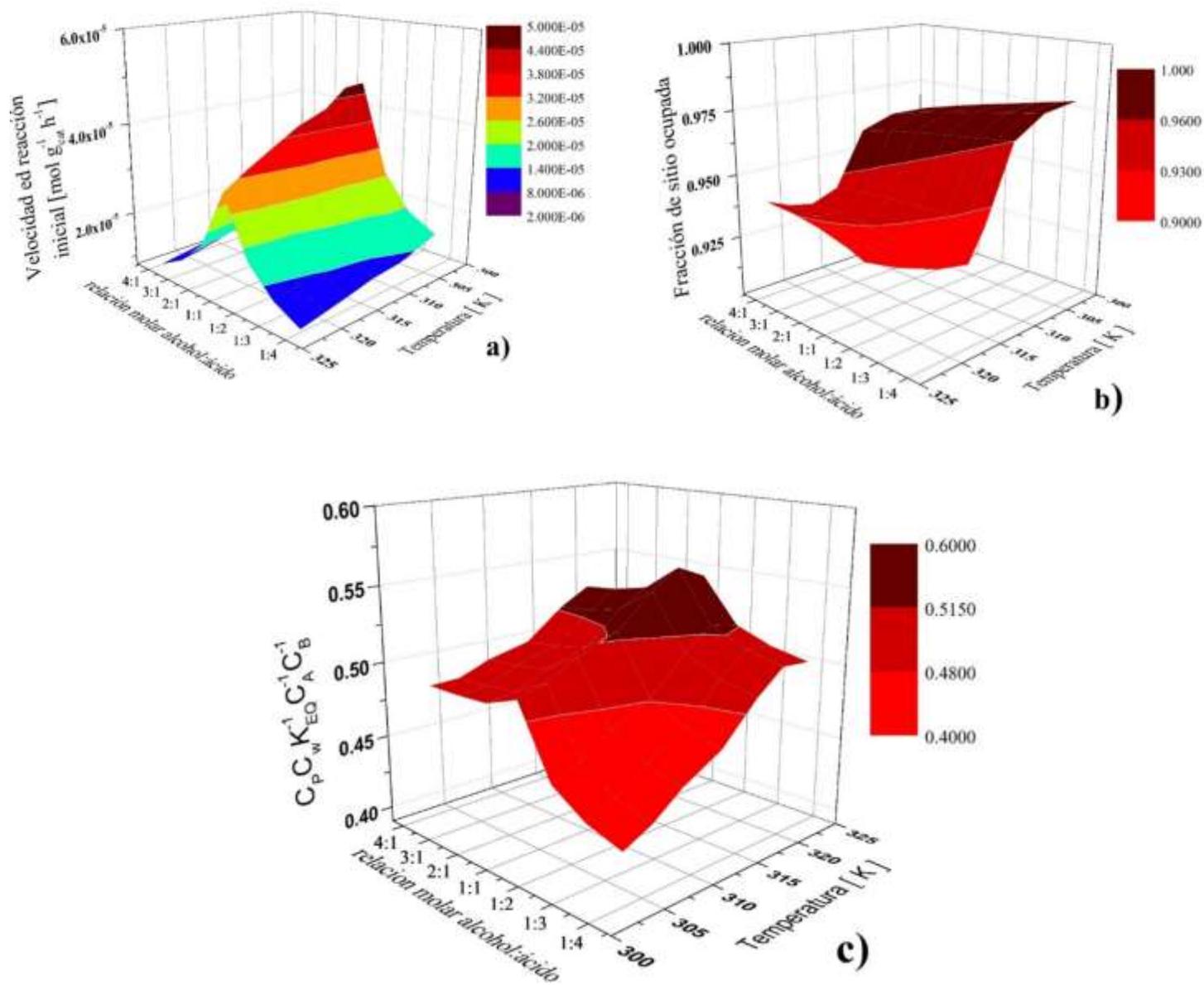


Figura 10. Efecto de la temperatura y la relación molar alcohol:ácido en: a) la velocidad inicial de reacción, b) fracción de sitios libres en la enzima, c) resistencia termodinámica, a a_w de 0.2.

7.2.3 Estudio integral del bioreactor sólido/gas

7.2.3.1 Análisis macroscópico

El primer paso durante el análisis del biorreactor SG fue la evaluación del efecto de las condiciones de operación en la respuesta macroscópica del biocatalizador. La **Figura 11** muestra las sábanas de superficie en las que se evaluó el efecto de la temperatura y el flujo volumétrico de entrada en la conversión a la salida del biorreactor. Estas sábanas se muestran la relación molar alcohol:ácido de 1:4 y a_w de 0.2, condiciones de operación que favorecen la termodinámica y el rendimiento cinético de la esterificación. Svensson et al., en (1994) observaron que una a_w cercana a 0.2 mejoraba las velocidades de reacción inicial y las conversión a nivel macroscópico para la esterificación de ácido decanoico y dodecanol usando lipasas como biocatalizador. Sus resultados revelaron cómo las enzimas necesitan una cantidad mínima de agua para ser activas y selectivas, pero también mostraron cómo un exceso de esta limitaba la velocidad de reacción debido a que el agua es uno de los productos de la reacción afectando el equilibrio termodinámico y a nivel de cinético teniendo efecto en el sitio de adsorción en el paso de formación de agua, como también se informó en varias investigaciones (Monot et al., 1991; Nagayama et al., 2010; S. Shah & Gupta, 2007; Valivety et al., 1992).

Por otro lado, debido a la sensibilidad del biorreactor a la energía requerida para activar el biocatalizador y la generada por la reacción, la diferencia entre la temperatura del refrigerante y la de entrada ($T_c - T_o$) impacta significativamente las tasas de transferencia de masa y calor a través del reactor de tal manera que una baja temperatura de entrada (T_o) conduce a una activación ineficaz del biocatalizador empacado, un escenario donde los mecanismos de transferencia de calor son bastante dominantes. Además, una mayor temperatura de entrada y mayor concentración de sustratos conducen a la activación de la reacción; sin embargo, debido a su exotermicidad puede afectar negativamente el rendimiento cinético de los sitios del biocatalizador en la zona de entrada del biorreactor. A partir de este extremo, se identifica la conversión óptima en las condiciones de operación evaluadas a una diferencia de temperatura ($T_c - T_o$) de 11 K.

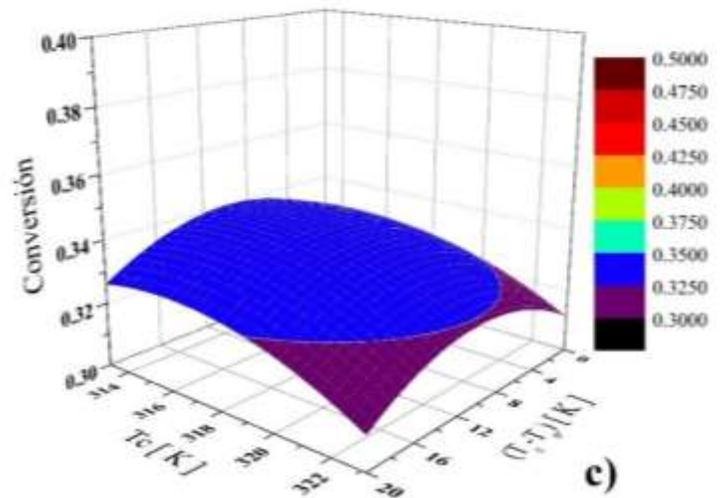
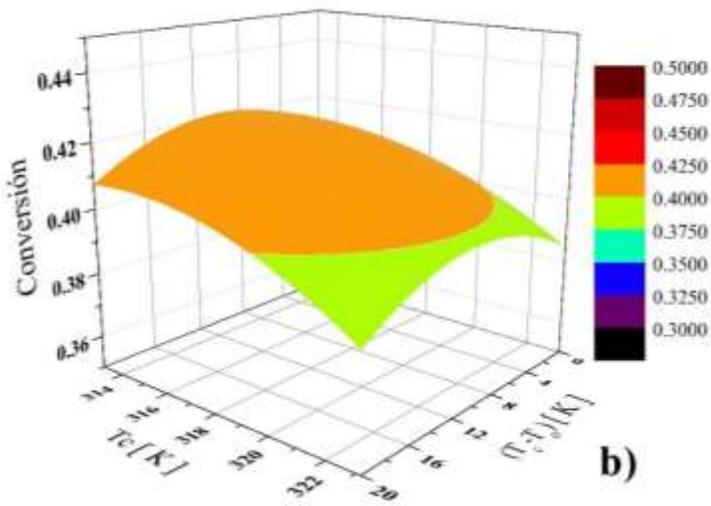
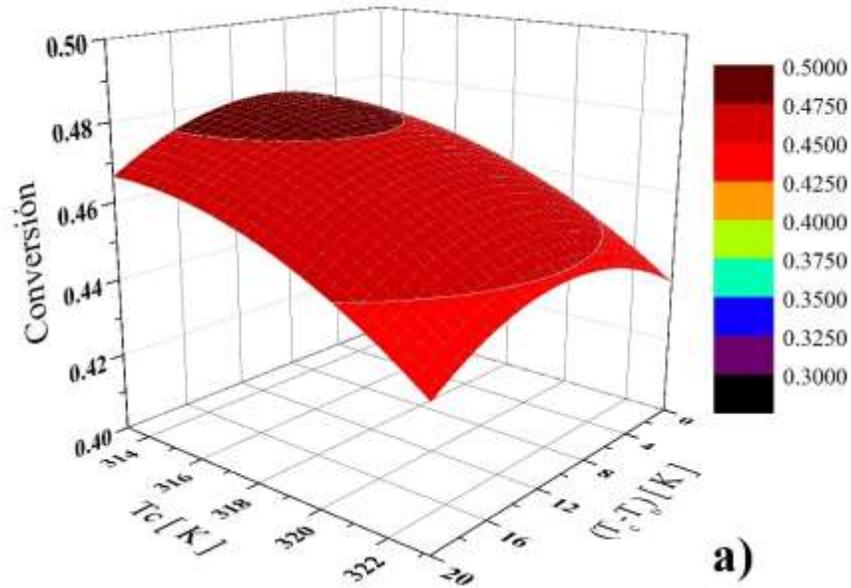


Figura 11. Efecto de la temperatura del enfriante, temperatura de entrada y flujo volumétrico de entrada en la conversión a la salida del reactor. Con condiciones de relación molar alcohol-ácido 1:4, a_w 0.2, óptimas identificadas en el análisis termodinámico y cinético. **a)** 1.2 L h⁻¹, **b)** 2.4 L h⁻¹ and **c)** 4.8 L h⁻¹.

7.2.3.2 Análisis microscópico

El paso final durante el modelado del biorreactor SG fue la evaluación de su rendimiento microscópico bajo las condiciones de operación de mayor conversión definidas a nivel macroscópico. Vale la pena señalar que el rendimiento microscópico está asociado con los perfiles de velocidades, temperaturas y concentraciones previstos a lo largo del biorreactor SG (Bird et al., 2006; Froment & Bischoff, 2011). Durante este análisis, se buscó entender la compleja interacción entre la termodinámica de la reacción, la cinética y los fenómenos de transporte en las condiciones de operación y geometrías definidas para el empaque y el biorreactor SG. Se presenta el análisis microscópico considerando los siguientes apartados. En la 6.3.3.3 se analiza los perfiles de velocidad involucrados en el biorreactor de lecho empacado. Y en la sección 6.3.3.4 se presenta los perfiles de temperatura y conversión a lo y el efecto de las condiciones de operación en la cinética a lo largo del biorreactor SG.

7.2.3.3 Dinámica de fluidos

Como se mencionó, se propuso el uso de un biocatalizador no poroso y un dt/dp bajo (< 10) para mejorar los mecanismos de transferencia de calor durante la operación del biorreactor de lecho empacado (Aparicio-Mauricio et al., 2017; Castillo-Araiza, 2021; Che-Galicia et al., 2020; Hernandez-Aguirre et al., 2021). Sin embargo, el bajo dt/dp conduce a tener una distribución de fracción vacía que a su vez genera un perfil de velocidad intersticial que debe modelarse para tener en cuenta su impactos en (Aparicio-Mauricio et al., 2017; Castillo-Araiza, 2021; Che-Galicia et al., 2020; Hernandez-Aguirre et al., 2021): (i) los mecanismos de transferencia de calor y masa inercial y dispersivo; y (ii) resistencias relacionadas con la capa límite alrededor de la superficie sólida.

La fracción vacía pseudo local, el número de Darcy (K/R^2) y los perfiles de velocidad intersticial predichos con el modelo de dinámica de fluidos, Ecs. (11-24), se presentan en la Figura 5. La fracción vacía y el número de Darcy oscilan a lo largo de la coordenada radial adimensional ($r^*=r/R$) debido al bajo dt/dp , (ver **Figura 12a**). Se identifican dos secciones donde la fracción vacía tiene valores máximos a lo largo del eje radial: una cerca de la pared, $r^*\sim 1$, y la otra en el centro del lecho, $r^*\sim 0.3$; mientras que el número de Darcy se relaciona con el impacto de las resistencias sólido-líquido en aquellas regiones de fracción de vacío baja y grande (Gómez-Ramos et al., 2019). La fracción vacía y el número de Darcy impactan

en el componente axial pseudo local de la velocidad; en donde se identificaron velocidades intersticiales más grandes en aquellas regiones que presentan valores de fracción vacía más grandes: en $r^* \sim 0.3$ y en $r^* \sim 0.9$ y valores más grandes del número de Darcy. Durante las simulaciones de dinámica de fluidos, cuanto mayor es el flujo volumétrico, mayor se vuelve la magnitud de la velocidad pseudo local. En la **Figura 12b**, se muestran los perfiles de velocidad radial y se comparan con los obtenidos por el método de flujo pistón (Gómez-Ramos et al., 2019). Como se observó, el enfoque de flujo pistón calcula mal el impacto de las fuerzas de fricción viscosas e inerciales a lo largo del eje radial, lo que indica la necesidad de incluir la dinámica de fluidos durante el modelado del biorreactor de lecho empacado refrigerado por pared no convencional, un resultado que también ha sido reportado por varios autores (Froment & Bischoff, 2011).

7.2.3.4 Transferencia de calor y masa

Las **Figuras 13** y **Figura 14** muestran la predicción de los perfiles de temperatura y conversión respectivamente, a través del biorreactor SG utilizando el modelo de biorreactor pseudo heterogéneo, Ecs. (1-10). Estas predicciones pseudo locales se obtienen en aquellas condiciones de operación que conducen a la conversión óptima durante el análisis del rendimiento macroscópico del biorreactor SG: $T_c - T_o = 10$ K, $a_w = 0.2$ y una relación alcohol:ácido de 4:1. Las simulaciones analizadas a continuación tienen como objetivo evaluar el efecto de la temperatura del refrigerante (T_c), el flujo volumétrico de entrada (Q_o) y la concentración de sustratos de entrada (C_{io}) en el rendimiento microscópico tanto del biorreactor como del biocatalizador. En estas simulaciones, T_c varía de 313 K a 323 K, Q_o de 1,2 L h⁻¹ a 4,8 L h⁻¹ y C_{io} de $1 \times C_{io}$ a $1000 \times C_{io}$, mol m⁻³, respectivamente. La concentración de entrada establecida de alcohol y ácido (C_{io}) utilizada durante las simulaciones es de 0,312 y 0,078 mol m⁻³, respectivamente. Respecto a la temperatura, de acuerdo con el análisis macroscópico del biorreactor, cuanto menor es la temperatura del refrigerante, mayor es la conversión a través del lecho. Como se identificó durante el análisis cinético, la temperatura más alta del refrigerante disminuye las velocidades de reacción y, por lo tanto, la conversión microscópica, (ver **Figuras 15a** y **16a**). Con respecto al impacto de la dinámica de fluidos en el rendimiento microscópico del biorreactor SG, cuanto menor es el flujo volumétrico de entrada, mayor es el tiempo de residencia del fluido, de modo que el fluido alcanza la

temperatura del refrigerante a una distancia más corta de la entrada del reactor. Por lo tanto, un mayor tiempo de residencia se asocia con una mayor conversión a lo largo de la longitud del biorreactor y el mismo perfil de temperatura.

En cuanto al efecto de la concentración de entrada de reactantes en el rendimiento del biorreactor SG, cuando la concentración de entrada aumenta significativamente ($1000 \times C_{i0}$), la temperatura aumenta debido al calor generado por la reacción, observándose la aparición de un punto caliente suave, **Figura 13c**; este incremento de temperatura impacta en la conversión microscópica como se observa en la **Figura 14c**. En este sentido, la dinámica de fluidos y el uso de un material inerte no poroso donde se soportan las enzimas catalíticas favorecen la disipación de calor por convección a través de la pared del lecho, evitando un incremento crítico de la temperatura pseudo local a lo largo del biorreactor. Sin embargo, cuando aumenta la concentración de entrada de sustrato o la concentración de sitios activos, las limitaciones en la transferencia de calor se vuelven importantes, de modo que la temperatura pseudo local aumenta a lo largo de la longitud del biorreactor, lo que limita tanto la termodinámica de bioconversión como el rendimiento cinético del catalizador.

Finalmente, se analiza la respuesta microscópica del catalizador en el biorreactor SG a dos concentraciones de entrada de los sustratos debido a su efecto significativo sobre la temperatura pseudo local y la conversión tanto microscópica como macroscópica. Las **Figuras 15 y 16** muestra la velocidad de reacción y la fracción de los sitios de enzimáticos disponibles y las especies intermedias adsorbidas en los sitios de enzimas. Estas simulaciones se obtienen fijando aquellas condiciones de operación que conducen al desempeño óptimo del biorreactor SG: $a_w = 0.2$, $T_c = 316$ K, $T_o = 305$ K, $Q_o = 1.2$ L h⁻¹ y una relación molar alcohol:ácido de 4: 1. La **Figura 15a** presenta la respuesta transitoria de la velocidad de reacción y la fracción de cobertura de diferentes especies adsorbidas en los sitios de enzimas. El estado pseudo estacionario se alcanza después de 2 h una vez que se inicia la reacción. Además, a medida que aumenta la concentración de entrada de sustratos, la velocidad de reacción aumenta de tal manera que una gran concentración de entrada tanto de alcohol como de ácido conduce a una alta conversión macroscópica del sustrato limitante (> 90%). A la concentración de entrada de sustratos evaluada, no se identifican limitaciones termodinámicas debido a la presencia de agua en el medio ni restricciones cinéticas

relacionadas con la adsorción de sustratos, productos o especies intermedias en los sitios de enzimas, de modo que la velocidad de reacción del ciclo biocatalítico se favorece en este entorno de operación. Durante la respuesta transitoria del biocatalizador, las especies de EP y sus precursores, IE, son los componentes intermedios dominantes adsorbidos sobre los sitios de la enzima (ver **Figura 16c**). Las especies IE se forman primero en los sitios de la enzima y luego reaccionan siguiendo un formalismo de Eley-Rideal con alcohol isobutílico para formar especies EP sin limitaciones cinéticas que a su vez conducen a la formación de propionato de isobutilo (P), el producto objetivo durante el análisis del biorreactor SG.

En cuanto a la velocidad de reacción y la fracción de cobertura de las especies adsorbidas a lo largo de la longitud del reactor en el estado pseudo estacionario, se pueden observar en la **Figura 16**. Se identifican la mayor velocidad de reacción a la entrada del biorreactor debido a una mayor concentración de sustratos y menor concentración de productos en esta zona. Los sitios enzimáticos adsorbidos, como se observa en la respuesta transitoria del biorreactor, están esencialmente ocupados por especies intermedias, específicamente al especie IE que conducen a la formación del producto objetivo. La presencia de IE en los sitios de enzimas es mayor en la entrada del reactor, una zona donde se encuentran un gradiente de temperatura, una alta concentración de reactantes y una baja concentración de agua. A medida que los reactantes reaccionan a lo largo del biorreactor SG, la presencia de la especie IE, siendo este fenómeno de adsorción más relevante a mayores concentraciones de reactante inicial ($\geq 100 \times C_{i0}$). Aunque la especie IE es dominante a la entrada del reactor a mayores concentraciones de sustratos, no limita el rendimiento microscópico de la velocidad de reacción y bioconversión ($\geq 100 \times C_{i0}$), obteniendo mayores conversiones ($> 90\%$) a la salida del biorreactor SG. Estos resultados resaltan el potencial atractivo del biorreactor SG para la producción biocatalítica de ésteres,

7.3 Conclusiones parciales.

Como visión general de este trabajo, a nivel termodinámico la tendencia fue aumentar la relación entre los reactantes y disminuir la cantidad de agua y disminuir la temperatura para mejorar la conversión. La cinética especificó que es necesario tener una mayor relación alcohol:ácido (4:1), baja temperatura y baja actividad de agua. Con el modelo del reactor se estableció una temperatura del refrigerante y de entrada de 316 K y 305 K, actividad de agua de 0.2, el menor flujo de entrada y relación molar alcohol ácido 4:1 para el mejor desempeño en la conversión para obtener propionato de isobutilo por esterificación en un biorreactor SG.

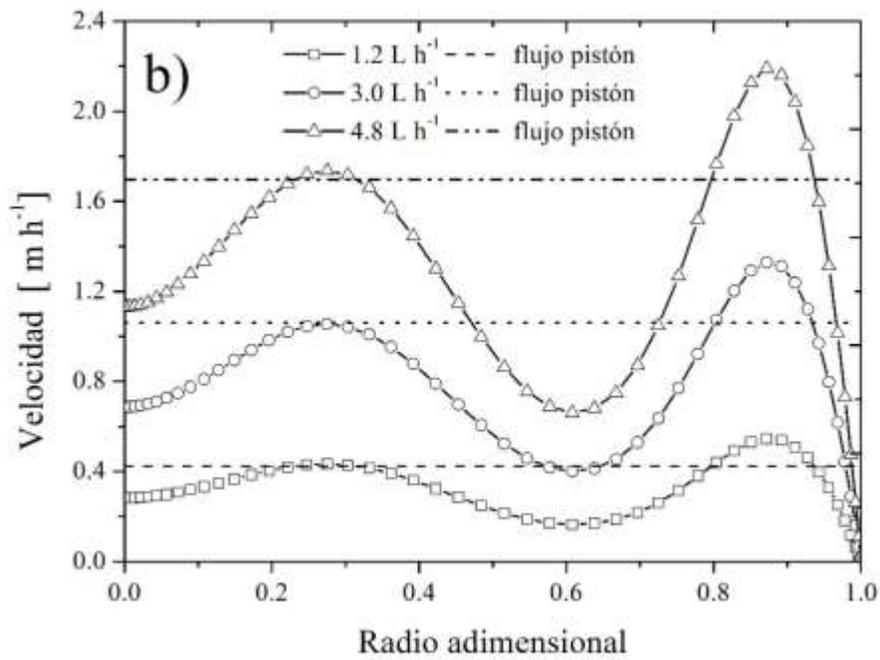
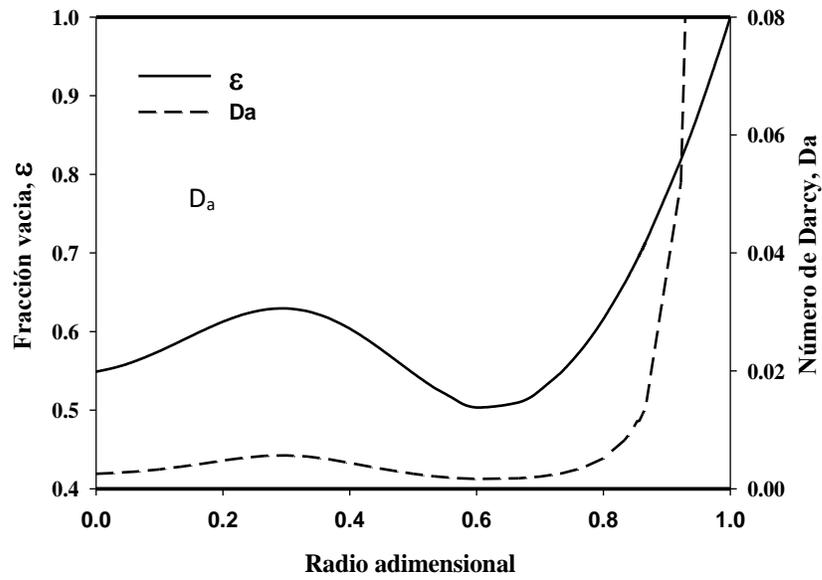


Figura 12. a) predicción de fracción vacía y del número de Darcy, b) predicción de perfil de velocidad de la coordenada radial por las ecuaciones de Navier-Stokes Darcy-Forchheimer (NSDF) a 3 flujos volumétricos de entrada, y su respectiva aproximación considerando flujo pistón.

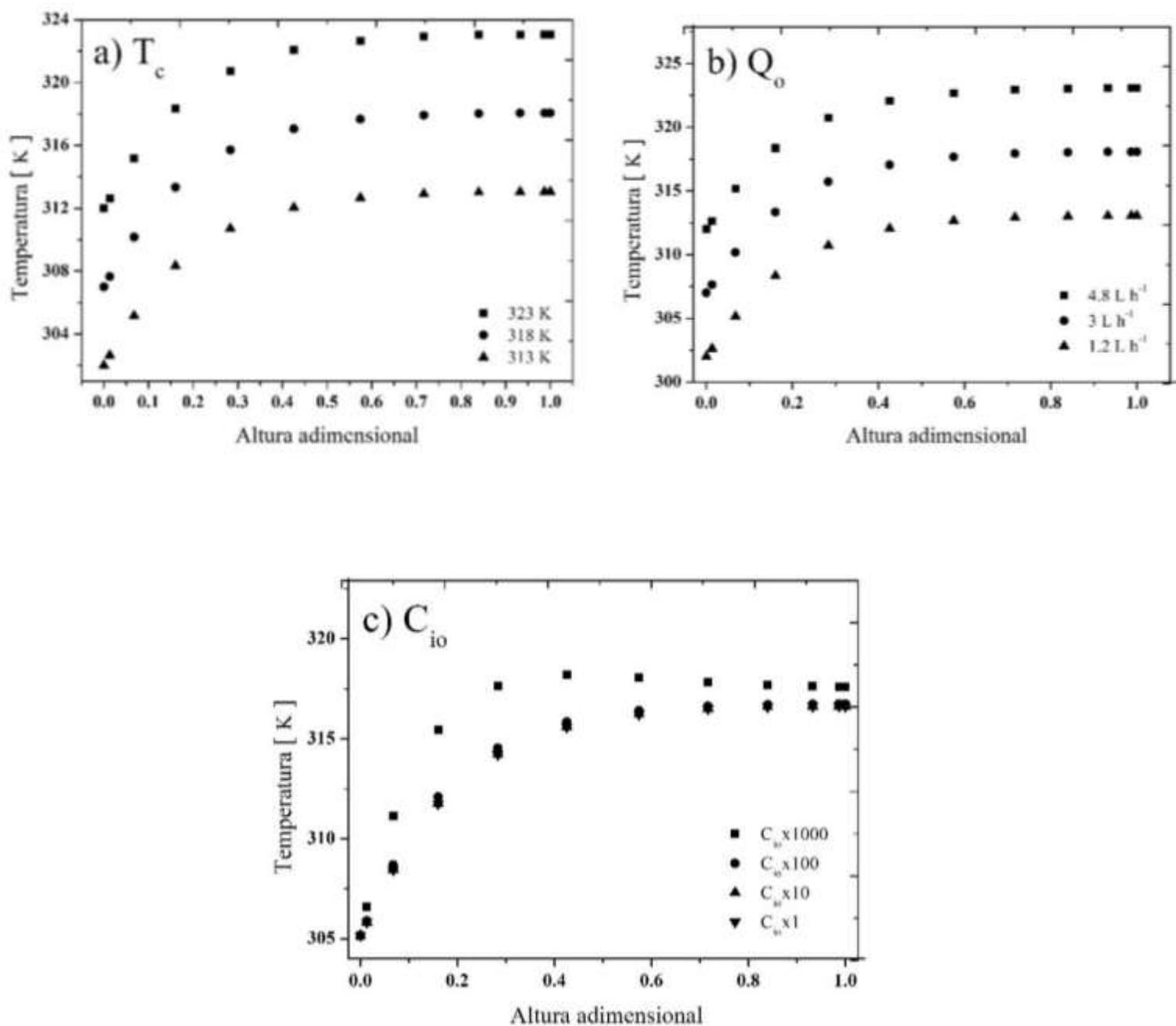


Figura 13. Predicción de perfiles de temperatura axial por el modelo pseudo heterogéneo a diferente: a) temperatura del enfriante, b) flujo volumétrico a la entrada, c) concentración de reactantes a la entrada. Las simulaciones se realizaron con las condiciones de operación que dan la máxima conversión dada por el análisis macroscópico: a_w 0.2, y relación molar alcohol:ácido 4:1.

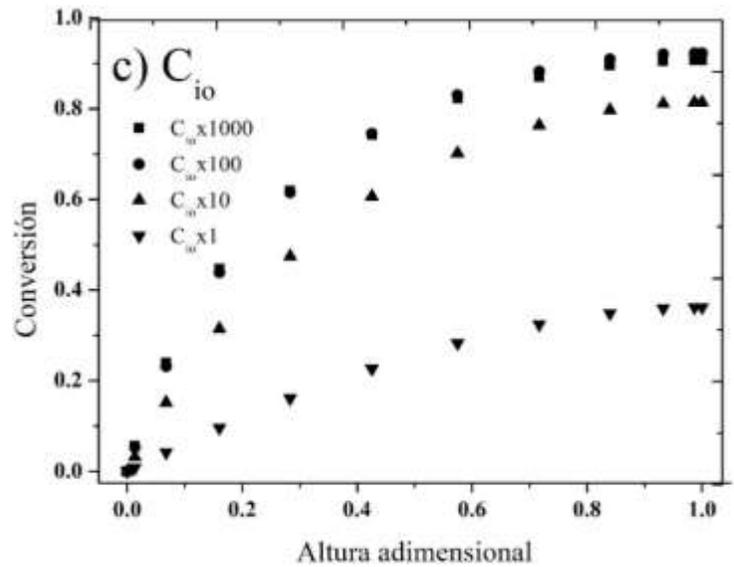
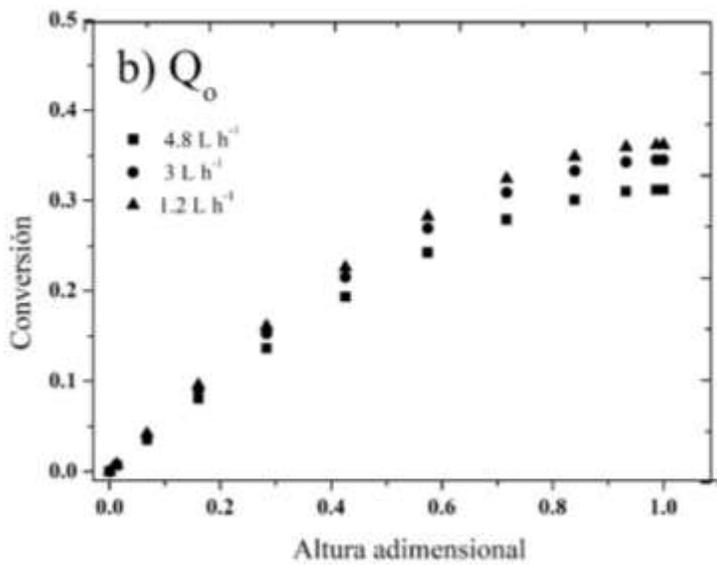
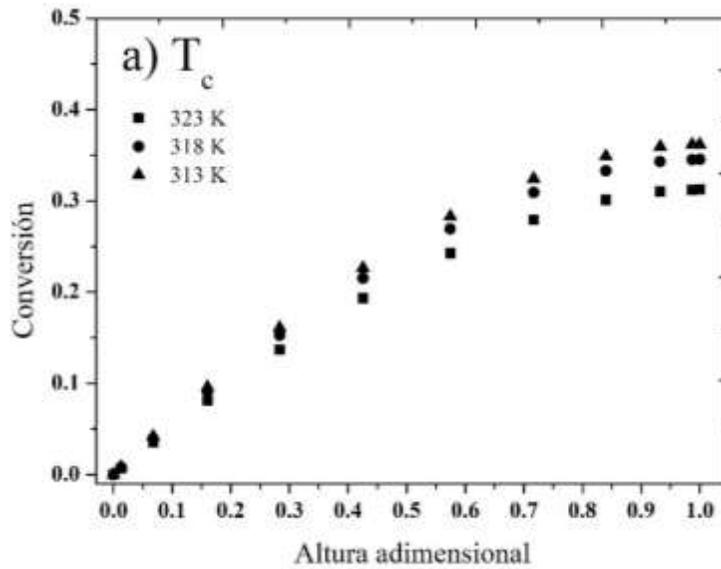


Figura 14. Predicción de perfiles de conversión axial por el modelo pseudo heterogéneo a diferente: a) temperatura del enfriante, b) flujo volumétrico a la entrada, c) concentración de reactantes a la entrada. Las simulaciones se realizaron con las condiciones de operación que dan la máxima conversión dad por el análisis macroscópico: a_w 0.2, y relación molar alcohol:ácido 4:1.

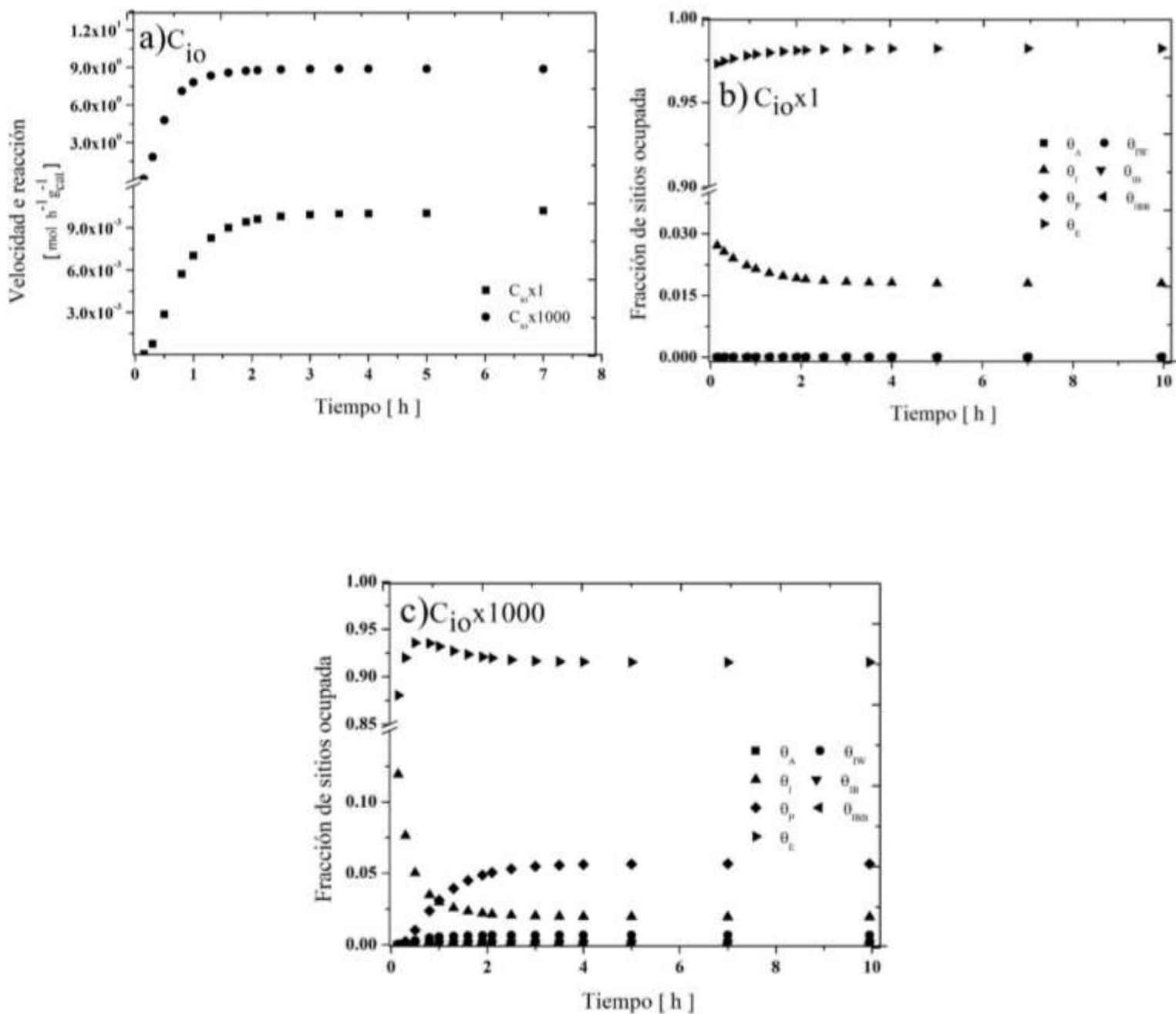


Figura 15. Respuesta transitoria a la salida del reactor: a) velocidad de reacción a dos diferentes concentraciones de reactantes a la entrada, b) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1 \times C_{i0}$, c) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1000 \times C_{i0}$. Las condiciones de operación en estas simulaciones fueron: $a_w = 0.2$, $T_c = 316 \text{ K}$, $Q_0 = 1.2 \text{ Lh}^{-1}$, $T_0 = 305 \text{ K}$ y alcohol:ácido ratio de 4:1.

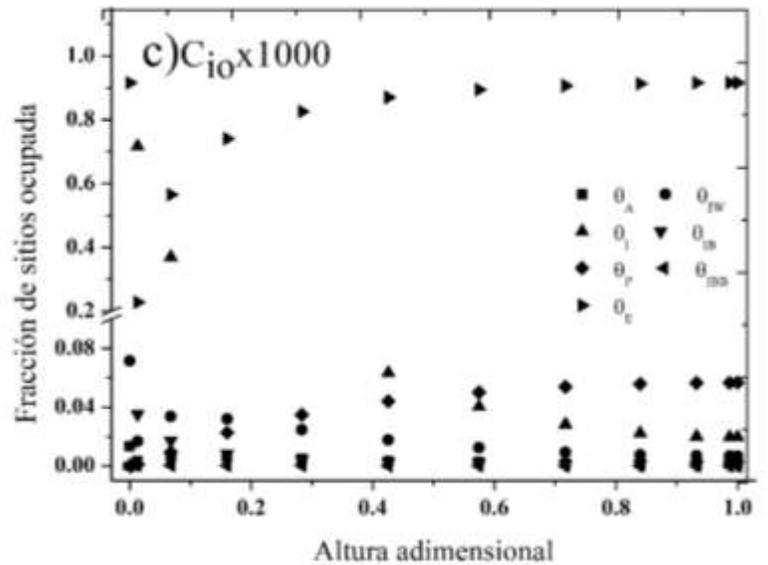
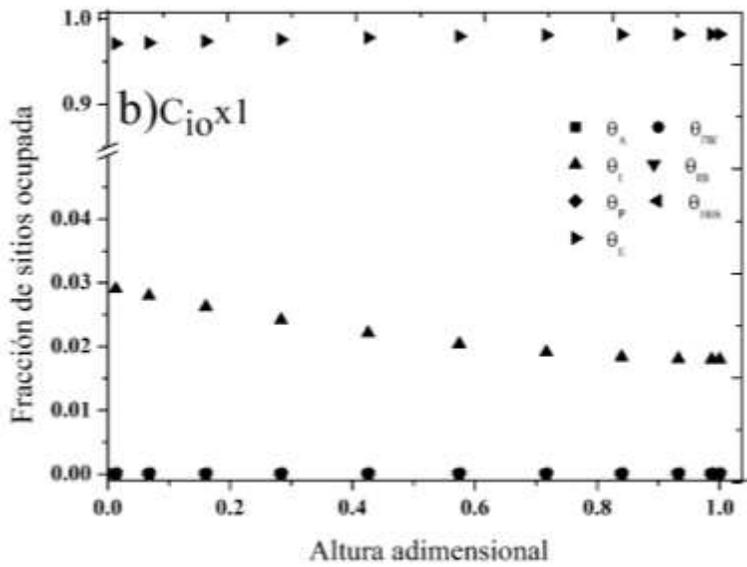
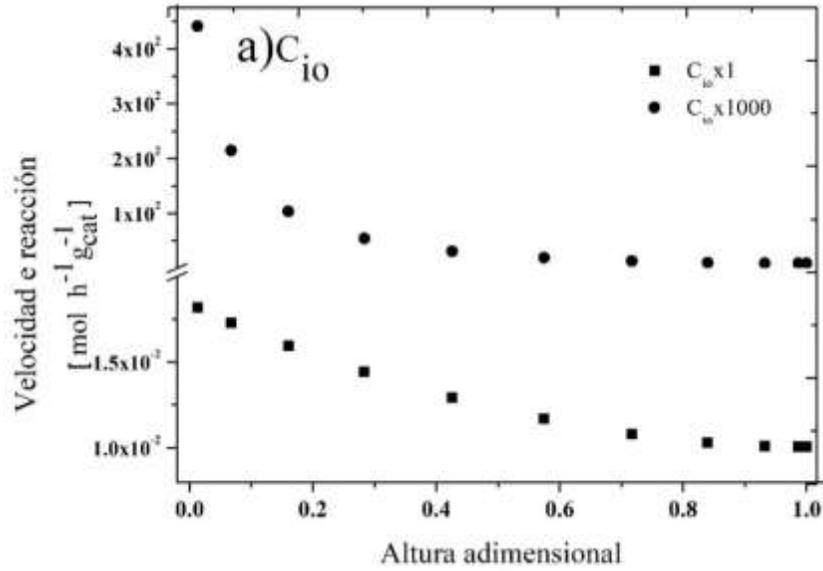


Figura 16. Predicciones en pseudo estado estacionario a lo largo del reactor: a) velocidad de reacción a dos diferentes concentraciones de reactantes a la entrada, b) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1 \times C_{i0}$, c) fracción especies adsorbidas de sitios enzimáticos a $1000 \times C_{i0}$. Las condiciones de operación en estas simulaciones fueron: $a_w = 0.2$, $T_c = 316 \text{ K}$, $Q_0 = 1.2 \text{ Lh}^{-1}$, $T_0 = 305 \text{ K}$ y alcohol:ácido ratio de 4:1.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Metodología

8.1.1 Biocatalizador

Como biocatalizador se utilizó la levadura *Yarrowia lipolytica* 2.2ab del cepario de la Planta Piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Conservación

La conservación a largo plazo de *Y. lipolytica* se llevó a cabo por liofilización de la siguiente manera: En matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo agar Sabouraud se inoculan células de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab, dejando en crecimiento por 7 días a 30 °C. Posteriormente se recuperan las células con una solución del crioprotector (leche descremada 20 %) previamente esterilizado (10 lb/pulg², 10 min).

Ampolletas

A las ampolletas se les realizó un tratamiento poniendo a remojar en una solución de HCl 2 %, durante 3 horas, se lavan y se ponen a secar a 60 °C durante 12 h y finalmente se esterilizan.

Se adicionaron 2 mL de la solución del crioprotector con las células, se coloca un tapón de algodón, se congelan las ampolletas con nitrógeno líquido (-70 °C) y se liofilizan el tiempo necesario hasta eliminar toda el agua. Finalmente se sellan las ampolletas.

Activación de microorganismo

El microorganismo liofilizado fue activado incubándolo en medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa) por 7 días a 30 °C. Posteriormente, las esporas se recuperan con una solución Tween (0.01 %) llevando a cabo las diluciones para llegar a una concentración de 1×10^6 células/mL.

8.1.2 Propagación del microorganismo

Para la propagación de la levadura se agregaron 10 mL de la solución de Tween con las esporas a 100 mL de medio Sabouraud y se incubó por 3 días a 30 °C y 150 rpm hasta llegar

a una concentración de 1×10^6 células/mL, siguiendo lo reportado por (D.M. Palmerín-Carreño et al., 2015).

8.1.3 Medio para producción de lipasas

Se utilizó un medio de cultivo productor de lipasas reportado por Ota et al, en (1982) cuya composición se puede observar en la **Tabla 10**, este medio contine además de glucosa como fuentes de carbono una fuente de ácidos grasos como el aceite oliva que induce la producción de lipasas. En matraces de 250 mL con 100 mL de medio de medio cultivo, adicionando una solución de células de la levadura hasta llegar una concentración de 1×10^6 células/mL, durante 3 días a 30 °C y 150 rpm.

Tabla 10. Medio de cultivo para producción de lipasas

Compuesto	%
Glucosa	2
Urea	0.2
KH ₂ PO ₄	0.6
K ₂ HPO ₄	0.2
KCl	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.001
Extracto levadura	0.1
Aceite de oliva o girasol	1

Obtención de biomasa en cultivo líquido

En matraces bafleados de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo Sabouraud se inoculó una suspensión de células de *Y. lipolytica* con el volumen necesario para llegar a una concentración de 1×10^6 células /mL, se deja se dejó en crecimiento por 3 días a 30 °C y 150 rpm.

Posteriormente, los medios con las células se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C y se separó el sobrenadante (Huang et al., 2007). La suspensión celular se utilizó en

experimentos de medición de actividad enzimática y para su conservación mediante liofilización.

Recuperación de biomasa

Una vez pasado el tiempo de crecimiento se separa la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min, se realizan dos lavados con solución buffer Tris-HCl pH 8 20 mM. Posteriormente se pesa la biomasa y se pasa al medio de reacción con el éster.

8.1.4 Crecimiento de *Y. lipolytica* por cultivo en medio sólido

Se llevó a cabo el crecimiento de *Y. lipolytica* por cultivo en medio sólido directamente en el soporte y no exista un medio en donde se pierda las enzimas de la levadura, para esto se utilizaron columnas de vidrio de 200 mm de largo y 15 mm de diámetro en donde se añadió el soporte previamente impregnado con el medio de cultivo inductor y el inóculo de las células de la levadura con una concentración de 1×10^6 células/ mL. Se añadió el soporte impregnado con inóculo de forma aleatoria a las columnas bajo condiciones de temperatura de 30 °C y corriente de aire húmedo de 20 mL/min. En un inicio se conectó a un sistema de captura y medición de CO₂ para evaluar el comportamiento del crecimiento de la levadura en este sistema de cultivo.

Posterior al cultivo se llevó un tratamiento extra a el soporte con la biomasa de la levadura, se recupera el soporte impregnado con la levadura y se congela a -70 °C y se lleva a cabo un proceso de liofilización para eliminar el agua en el soporte y biomasa, y se almacena en desecador para utilizarlo en los experimento posteriores (Jones et al., 1986).

8.1.5 Actividad enzimática

La actividad lipasa, y esterasa de la levadura se midió por la hidrólisis de nitrofenil ésteres siguiendo el método reportado por Gilham & Lehner en , 2005. La hidrólisis de ésteres de cadena corta como acetato están asociados a actividad esterasa, mientras que los ésteres de cadena larga como laurato y palmitato se utilizan para medir actividad lipasa.

Soluciones y reactivos

- *p*-nitrofenil acetato (actividad esterasa)
- *p*-nitrofenil palmitato (actividad lipasa)
- Soluciones de 250 mM del *p*-nitrofenil éster en CH₂Cl₂
- Tris-HCl 20 mM (pH 8) 150 mM de NaCl y 0.01 % de Triton X-100
- *P*-nitrofenol 0.625 mM en Tris-HCl

Se toman 20 µL de la solución del éster y se diluye en 10 mL de buffer Tris-HCl, se agregan a 1.5 mL del sustrato en solución a 0.2 mL de extracto enzimático o una cantidad de biomasa (alrededor de 1 mg) previamente centrifugada y lavada con el buffer, y se incuba a 38 °C por 30 minutos. Pasado el tiempo se mide la absorbancia a 405 nm. Tomando como blanco la solución buffer Tris-HCl. Este método se utilizó para medir la actividad en extractos líquidos, y en la biomasa de la levadura.

Con la solución de *p*-nitrofenol se realizan las diluciones correspondientes para realizar la curva patrón de acuerdo con la **Tabla 11**.

Tabla 11. Curva patrón de *p*-nitrofenol

Conc. (mM)	Solución (mL)	Buffer (mL)
0.025	0.04	0.96
0.05	0.08	0.92
0.075	0.12	0.88
0.1	0.16	0.84
0.125	0.2	0.8

8.1.6 Cinética de actividad enzimática

Las unidades experimentales fueron columnas de vidrio (20 unidades) empacadas con el soporte (anillos de cerámica) impregnados de medio de cultivo e inóculo de la levadura (1x10⁶ células/mL), e incubados a 30 °C con flujo de aire de 20 mL/min. Se tomaron muestras los días 2, 4, 6, 8 y 10. En cada tiempo se tomaron 4 columnas, 2 para medir actividad

enzimática y 2 para realizar una extracción con agua destilada, teniendo así duplicados de cada tiempo dependiendo del tipo de ensayo a realizar. La actividad lipasa y esterasa de la levadura se determina por la hidrólisis de ésteres de nitrofenol siguiendo el método reportado por Gilham & Lehner (2005). También se midió el consumo de glucosa por el método de azúcares reductores con DNS. El diseño experimental que se propuso fue un diseño completamente al azar (DCA), la variable respuesta es la actividad enzimática. Los resultados se evaluaron por la prueba ANOVA y post hoc de Tukey para comparar en los diferentes tiempos si existe una diferencia estadística significativa en la actividad enzimática y en el consumo de glucosa.

8.1.7 Actividad de agua (a_w)

Para establecer la actividad de agua de los biocatalizadores se utilizarán soluciones salinas saturadas que se conoce su a_w (ver **Tabla 12**), en las que se ponen en equilibrio el biocatalizador y reactantes 24 h previo a los experimentos de reacción (Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., and Legoy, 1992). En donde para establecer el equilibrio se midió la actividad de agua con un sensor de humedad relativa marca Vernier.

8.1.8 Síntesis del éster con solvente orgánico y líquido libre de solventes

Para evaluar la capacidad de la levadura en la síntesis del éster de interés propionato de isobutilo, se probó la reacción en un medio no acuoso con dos sistemas diferentes, el uso de un solvente orgánico y en un medio libre de solventes.

Se obtuvo el catalizador inmovilizado en los anillos de cerámica bajo las condiciones antes mencionadas. Se colocó un anillo con biomasa de la levadura con un peso aproximado de 0.55 g con 26 mg de la levadura adherida como biocatalizador, se utilizaron tubos de 50 mL como unidades experimentales con un volumen de operación de 10 mL, a 30 °C y agitación de 200 rpm con Shaker durante 6 horas de reacción. En cuanto a la síntesis con solvente orgánico se utilizó hexano como solvente reportado en reacciones de esterificación con lipasas como biocatalizador (Yahya et al., 1998), se añadió el ácido propiónico e isobutanol a una concentración de 0.25M siguiendo lo reportado (S. Shah & Gupta, 2007). Para la reacción en líquido libre de solventes se añadieron solo los reactantes con una concentración

de ácido propiónico de 2.6 M e isobutanol 8.6 M a una relación molar ácido-alcohol 1:4 tomando muestras a lo largo de la reacción. Los experimentos se realizaron por triplicado.

8.1.9 Síntesis del Isobutil propionato en el sistema SG

Se evaluó la reacción de esterificación en el sistema SG con la biomasa de *Y. lipolytica* inmovilizada en los anillos de cerámica. La obtención del biocatalizador se llevó a cabo como se menciona anteriormente. Se estableció un flujo de N₂ de 70 mL min⁻¹, se añadieron 12 g del soporte con el biocatalizador con aproximadamente 360 mg de biomasa previamente equilibrada a una actividad de agua de 0.36 por más de 24 h con una solución salina saturada de CIMg, a una temperatura de 39 °C con una relación alc-ac 2:1. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo de reacción y se analizaron por cromatografía de gases.

8.1.10 Sistema sólido/gas

Se diseñó y montó un sistema de reacción SG (**Figura 17**), cuyos componentes se indican en la **Tabla 13**. El sistema cuenta con control de temperatura que mantiene los componentes del sistema a una temperatura establecida. Para esto el sistema está contenido en una caja de acrílico y dentro es calentado por un termoventilador. El sistema requiere de un gas acarreador, que en este caso se utilizó nitrógeno por ser inerte. El gas pasa por tubería de acero inoxidable, primero pasa por los contenedores individuales de reactantes (ácido propiónico e isobutanol) que se encuentran en fase líquida y una parte en fase gaseosa por la temperatura establecida, el gas es burbujeado para promover la volatilización de los reactantes. Ya en fase gas los reactantes individuales son arrastrados por el gas acarreador a un contenedor que sirve como saturador y mezclador. Ya en mezcla los reactantes pasan al reactor de lecho empacado donde se lleva a cabo la reacción. Finalmente, en la salida del biorreactor se recuperan los reactantes y productos por un sistema de enfriamiento de un solvente en donde se burbujea la salida del gas con los compuestos. Para establecer y mantener la actividad de agua durante la reacción. Los contenedores de reactantes tienen un vaso en el que se colocan los reactantes y alrededor se coloca la solución salina saturada que da la actividad de agua a establecerse. Las imágenes del sistema experimental se encuentran en el **Anexo A2**.

Tabla 12. Valor de actividad de soluciones salinas saturada

Compuesto	a_w
P ₂ O ₅	0
KOH	0.07
LiCl	0.11
CH ₃ COOK	0.23
MgCl ₂	0.33-0.32
k ₂ CO ₃	0.44-0.43
Mg(NO ₃) ₂	0.52
NaBr	0.56
CuCl ₂	0.69
NaCl	0.75
KCl	0.84
KNO ₃	0.94
NaCl*	0.987

*La solución no es saturada, es a 2.5 % para tener la a_w indicada

Tabla 13. Equipo de sistema sólido/gas

Nombre	Equipo	Cantidad
A1	Tanque de Nitrógeno	1
C5-C7	Válvula milimétrica	3
C1C4	Válvula check	3
D1, D2	Contenedor de reactantes	2
D3	Contenedor de solución salina	1
D4	Mezclador	1
E1	Reactor de lecho empacado	1
G1	Calentador	1
G2	Medidor de temperatura	1
H1	Trampa de humedad	1
I1	Recuperación de	1
C8,C9	Regulador de Presión	2

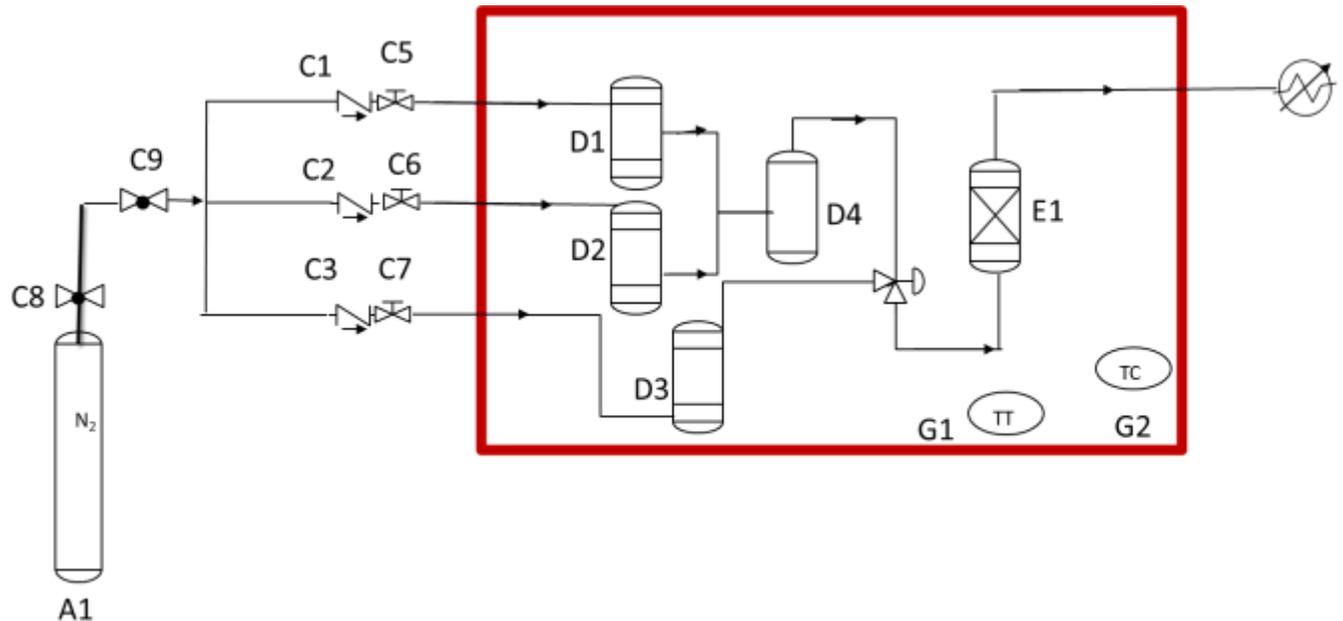


Figura 17. Esquema del sistema SG.

8.1.10.1 Componentes del sistema.

Biorreactor

El biorreactor es un tubo de vidrio de 200 mm de altura y 60 mm de diámetro interno que al empacar con el biocatalizador inmovilizado en los anillos de cerámica con una relación dt/dp de 6 siendo a la relación menor a 10 lo que ayuda a mejorar la transferencia de cantidad de cómo se observó en el análisis del modelo del reactor.

Contenedores

Los contenedores de reactantes, mezclador y el de solución salina son frascos de vidrio frascos de vidrio de 9 cm de diámetro y 15 cm de alto, con volumen de 1 L marca Duran. Para los frascos de reactantes cuentan con un contenedor interno de 6 cm de radio y 4.5 cm de alto, de modo que en el contenedor interno tiene una capacidad de 100 mL del y en el exterior se coloca la solución salina saturada para establecer la actividad de agua que se requiera (ver **Figura 18**), la tapa del frasco tiene la entrada y salida de la tubería para que pase el gas acarreador y arrastre los compuestos.

Tubería

La tubería es de acero inoxidable de diámetro externo de ¼" (0.635 cm) y diámetro interno de 1/8" (0.3175 cm).

Recuperación de compuestos

La recuperación de reactantes residuales y producto a la salida del reactor fue por burbujeo con un solvente a baja temperatura, el solvente que se utilizó fue metanol a 99.5 % grado HPLC. Se tomó un volumen definido del solvente que se mantenía frío a -5 °C con un chiller marca JULABO F10. EL muestreo se tomaba durante un tiempo definido en el que burbujeaba el gas a la salida en el solvente, el solvente con los compuestos recuperados fue medidos por cromatografía de gases.

Sistema de control de temperatura

La temperatura en el sistema se estableció mediante el uso de 2 termoventiladores establecidos en los extremos de la caja del sistema. Para mantener la temperatura se implementó un sistema de control mediante un termopar que mide temperatura del sistema de reacción (marca Vernier®) acoplado a una interfase que capturaba los datos registrados por el sensor mediante el software Logger Pro® y una unidad de control digital (marca Vernier®) que acoplada con la entrada de energía del termoventilador prendía y apagaba la calefacción en un rango de temperatura establecido.

8.1.11 Análisis de compuestos

La cuantificación de los reactante: ácido propiónico e isobutanol, y el seguimiento la formación del isobutil propionato se llevaron a cabo por cromatografía de gases en un equipo Agilent 7820 A, con un detector de ionización de flama y llama (FID) utilizando una columna Cyclocil-B Agilent de 30 m x 0.32 mm x 25 µm, con nitrógeno como gas acarreador, con la siguiente rampa de temperatura: 60 °C por 1 min; 5 °C/min hasta llegar a 100 °C; después mantener la temperatura por 1 min. Con la temperatura del detector y el inyector a 150 °C y un volumen de inyección de 2 µL (Kuperkar et al., 2014). En el anexo A se muestran los cromatogramas de los compuestos individuales y en mezcla.

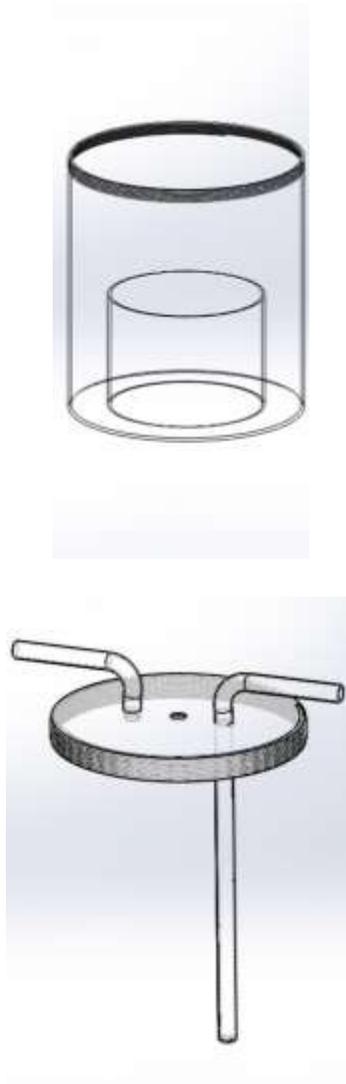


Figura 18. Frasco de reactantes y tapa.

8.2 Resultados

8.2.1 Crecimiento de biomasa en medio sólido

Se evaluó la adición de biomasa en los soportes a los dos días de crecimiento, en la Figura 4 y 5 una comparación de la formación de biomasa en el soporte (derecha) con respecto a un control sin crecimiento (izquierda) se muestra la formación de biomasa en los dos soportes, se aprecia la biomasa en los anillos de cerámica, la formación de micelio superficialmente, en el sílice no se apreció la formación de biomasa, sin embargo, el cálculo de biomasa por peso seco mostro la formación de esta por lo que se buscó biomasa dentro de

la esfera de sílice como se muestra en la **Figura 19**, en donde aparentemente se encontró células de la levadura.

Debido a que dentro del sílice el difícil que exista interacción de los sustratos con la levadura, así como la liberación del producto, por lo que a pesar de presentar crecimiento de biomasa se descartó a la sílice como posible soporte para *Y. lipolytica* para el sistema sólido/gas.



Figura 19. Imágenes en estereoscopio de los anillos de cerámica, la izquierda es el soporte antes del crecimiento de la levadura y la de la derecha es con la biomasa adherida.

En la **Tabla 14** se muestra una comparación de la cantidad de biomasa adherida al soporte en crecimiento en sólido como en sumergido, en donde se observa un mayor crecimiento en el sumergido, sin embargo, en sólido podría ser más eficiente en el sistema SG debido a que en el sumergido podría haber liberación de las enzimas lipasa o esterases si son excretadas por la levadura, este efecto en sólido podría ser menor o no existir al no haber un medio en donde se dispersen las enzimas excretadas quedando asociadas al soporte.

Tabla 14. comparación de crecimiento en anillos de cerámica.

Biomasa	
Medio	(mg _{biomasa} / g _{sop})
Sumergido	9.056
Sólido	3.205

8.2.2 Análisis de respirometría en crecimiento de *Y. lipolytica* en medio sólido

La **Figura 20** a muestra la tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de la levadura, esta aumenta a partir de las 13 horas mostrando que es cuando empieza la fase exponencial de crecimiento, como también muestra la **Figura 20b** en cuanto a la producción de CO₂ a través del tiempo, por lo que se sabe que el crecimiento de la levadura en medio sólido comienza a inicios del cultivo comparado con otros microorganismos como *Aspergillus brasiliensis* bajo condiciones similares que tiene un inicio de la fase exponencial después de 24 horas del inicio del cultivo (Guerrero Urrutia, 2017).

8.2.3 Actividad enzimática

Como primera aproximación para conocer el potencial de *Y. lipolytica* en la síntesis de ésteres se evaluó la actividad enzimática lipasa y esterasa que se basa en la hidrólisis de ésteres de cadena larga y corta respectivamente, con un medio de cultivo inductor reportado en la literatura antes mencionado. La **Tabla 15** muestra los resultados de actividad enzimática medidos en la biomasa de la levadura y del medio de cultivo con el que creció. En el medio de cultivo no se detectó actividad lipasa, pero si actividad esterasa, esto nos muestra al crecer en medio líquido parte de las enzimas responsables de esta actividad son excretadas al medio. En la biomasa hubo presencia de ambas actividades, tanto lipasa como esterasa, lo que nos muestra que la maquinaria enzimática para hidrolizar ésteres de cadena corta y larga en un medio acuoso pero tiene mayor preferencia por los de cadena corta como se puede observar en los valores de las actividades siendo un orden de magnitud mayor la actividad lipasa.

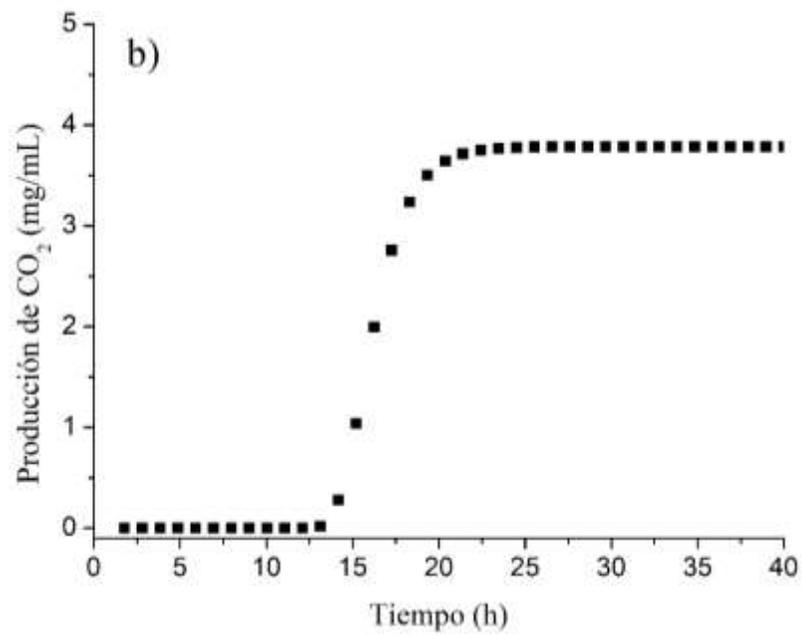
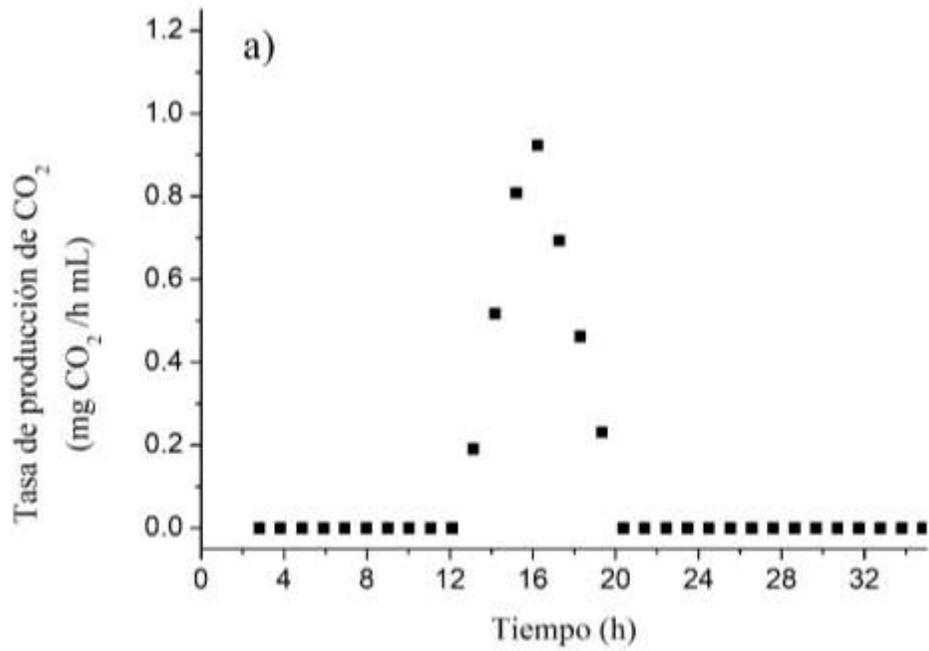


Figura 20. Producción de CO₂ durante el crecimiento de *Y. lipolytica* en sólido, a) Tasa de producción de CO₂, b) Producción de CO₂.

Tabla 15. Actividad enzimática en cultivo líquido de *Y. lipolytica*, determinado en biomasa y el medio de cultivo.

Fuente	Tipo	Actividad		Act. Esp.	
		U		U mL ⁻¹ / g _{biom} ⁻¹	
Medio	Lipasa	-	-	-	-
	Esterasa	5.08 x10 ⁻³	±1.22 x10 ⁻³	5.08 x10 ⁻²	±1.22 x10 ⁻²
Biomasa	Lipasa	4.24 x10 ⁻⁴	±4.93 x10 ⁻⁷	3.29 x10 ⁻²	±7.64 x10 ⁻³
	Esterasa	7.21 x10 ⁻³	±1.15 x10 ⁻³	4.00 x10 ⁻¹	±1.85 x10 ⁻²

Se evaluó el efecto de dos ácidos grasos (aceite de oliva y de girasol) en el medio de cultivo como inductores sobre la producción enzimática. La **Tabla 16** muestra la actividad enzimática de la biomasa de la levadura crecida en medio sólido con los anillos de cerámica como soporte inerte, la actividad lipasa fue la más baja respecto a la actividad esterasa con ambos aceites, lo que concuerda con lo obtenido al medir la actividad de la biomasa de la levadura crecida en medio líquido, ambas actividades fueron mayores respecto al medio líquido. Esto puede ser debido a que en líquido se pierde enzima en el medio y en crecimiento en sólido se mantienen en la biomasa. Respecto a la fuente de ácidos grasos no hubo diferencia significativa entre el uso de aceite de oliva y de girasol en ambos tipos de actividad y se trabajó con el aceite de oliva en los ensayos posteriores.

Tabla 16. Comparación de fuente de ácidos grasos en actividad enzimática.

Tipo de Aceite	Actividad	Act. Esp.	
		U/g _{biom}	
Oliva	Lipasa	0.009	±0.007
	Esterasa	0.930	±0.060
Girasol	Lipasa	0.178	±0.009
	Esterasa	0.980	±0.298

8.2.4 Cinética de actividad enzimática

La **Figura 21** muestra la actividad enzimática de la biomasa inmovilizada en el soporte y en el extracto obtenido, respectivamente. En el soporte sólo se detectó actividad esterasa, y en

el extracto se detectaron ambas actividades, esto debido a que en la extracción se concentran las enzimas por lo que pudo ser detectada la actividad lipasa, siendo más de 10 veces menor respecto a la esterasa. En soporte como en extracto la actividad esterasa incrementa hasta el día 8 en donde alcanza una actividad máxima de 27 mU/g_{soporte} esto concuerda con lo reportado por Domínguez et al., en 2003 que evaluó de la actividad lipasa de *Y. lipolytica* durante su crecimiento en donde de igual manera al día 8 alcanza la máxima actividad enzimática. Respecto a la actividad lipasa en el extracto, la prueba estadística indicó que no hay diferencia significativa durante el tiempo de cultivo manteniéndose constante. La evidencia de actividad esterasa y lipasa muestra el potencial de la levadura para llevar a cabo la síntesis de ésteres bajo condiciones no acuosas utilizando la biomasa de la levadura crecida en soporte. El análisis de glucosa en el cremento mostro que a partir del primer muestreo al segundo día la glucosa del medio de cultivo se haya consumido totalmente, esto concuerda con lo visto en el análisis respirométrico que arrojo que desde las 13 horas comienza la fase exponencial de crecimiento siendo el momento donde se consume la glucosa, después continua la otra fuente de carbono que son los ácidos grasos del aceite de oliva que actúa como inductor de las enzimas lipasas.

8.2.5 Síntesis del éster con solvente orgánico (SO) y un medio libre de solventes (LLS)

Las pruebas previas mostraron el potencial de la levadura como biocatalizador en hidrolisis de ésteres en medio acuoso, como pruebas preliminares a la síntesis de isobutil propionato en el sistema SG se probó al biocatalizador en un medio diferente al acuosos, utilizando un solvente orgánico y un medio libre de solventes. En la **Figura 22** se muestra la formación del producto a través del tiempo durante la reacción en ambos sistemas respecto a la concentración del producto y la conversión, la formación de éster se aprecia desde la primera hora de reacción en el medio sin solventes y a las 2.5 en medio orgánico, en el medio sin solvente hay un incremento en la formación del éster y la conversión alcanzando una concentración de 30 mM con una conversión de 1.3%. Con el medio con solvente la formación del éster fue menor al igual que la conversión, esto puede deberse a la menor concentración de los reactantes y que al estar diluidos con el solvente orgánico tuvo menos interacción con los sitios activos del biocatalizador, o también a un posible efecto toxico del solvente con las enzimas que actúan en la reacción como se ha reportado en la literatura

(Linko et al., 1995; P. Nikolova & Ward, 1993). Se calculó la velocidad inicial de reacción obteniendo 1.88 y 62.15 $\mu\text{mol h}^{-1}$ con solvente orgánico y libre de solventes respectivamente.

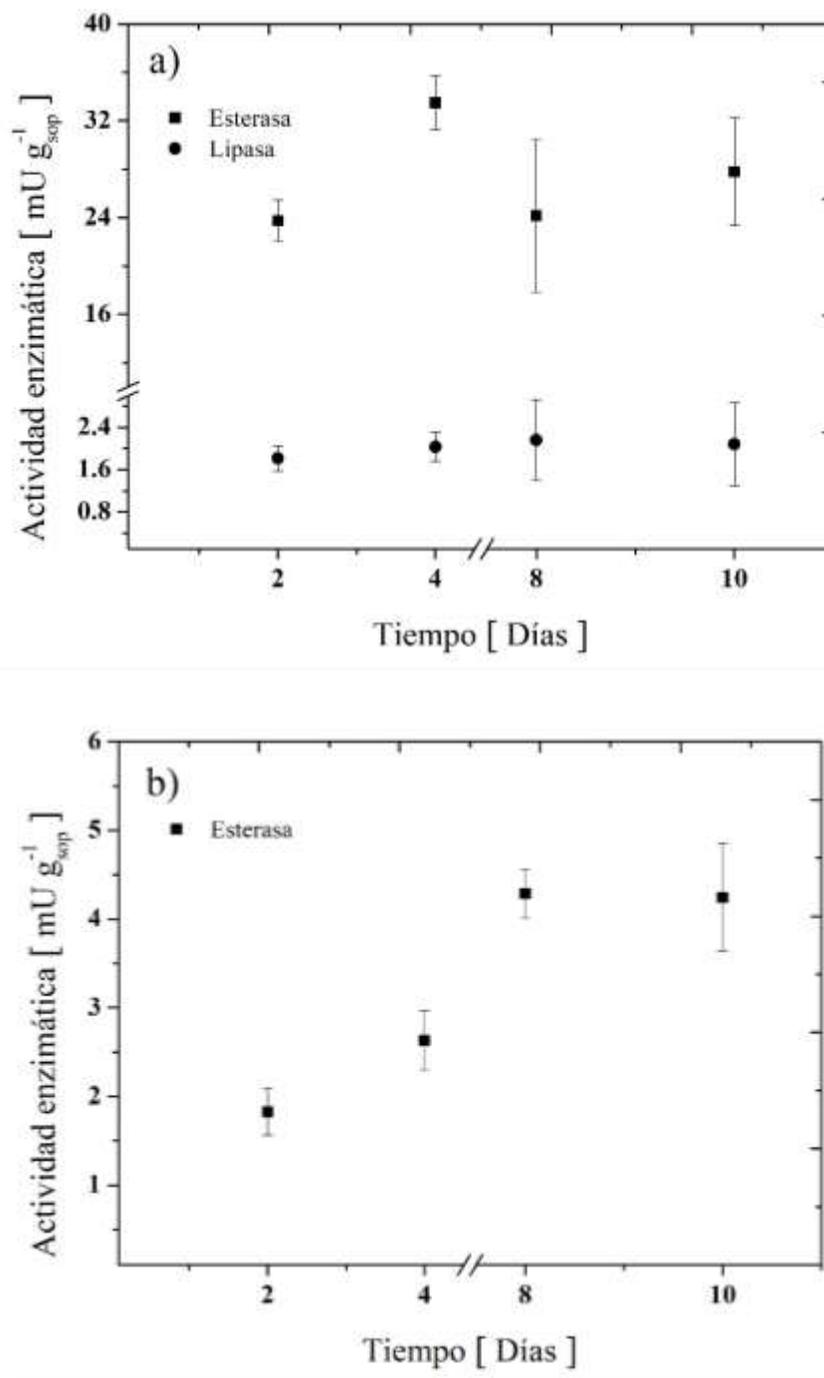


Figura 21. Actividad enzimática durante el crecimiento de *Y. lipolytica* cuantificado en: a) el extracto, b) biomasa en soporte.

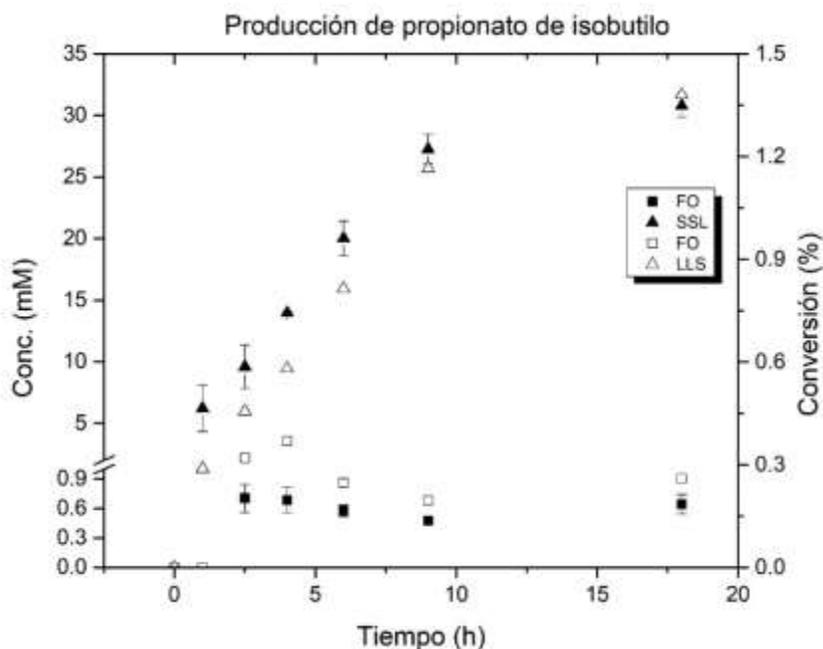


Figura 22. Síntesis de propionato de isobutilo utilizando *Y. lipolytica* inmovilizada en anillos de cerámica como biocatalizador utilizando un solvente orgánico \blacksquare y líquido libre de solventes \blacktriangle , respecto a la concentración del producto (símbolo relleno) y la conversión (símbolo vacío).

8.2.6 Producción del éster en sistema SG

Como se observó, la síntesis de propionato de isobutilo con *Y. lipolytica* inmovilizada en anillos de cerámica como biocatalizador en las pruebas de reacción en fase orgánica y en medio sin solventes, se llevó a cabo la reacción en el sistema SG con el biocatalizador. Se logró observar la formación de propionato de isobutilo como se muestra en la **Figura 23**, la aparición del éster empezó después de los 40 minutos de reacción con una concentración de $0.4 \mu\text{mol min}^{-1}$, a los 92 minutos aún se encontró presencia del producto con un flujo molar más bajo y en las siguientes muestras dejó de producirse el éster. La conversión es baja respecto al flujo molar si comparado con lo obtenido por (Sanádi et al., 2012) con conversiones de hasta 90 % en la producción de acetato de etilo con una lipasa comercial pero si se compara respecto a la velocidad de reacción en función de la actividad enzimática (ver **Tabla 17**) el valor es más alto comparado con lo reportado por Debeche et al., en 2005 para la obtención de acetato de etilo por transesterificación con una velocidad de $0.23 \mu\text{g}(\text{min})$

$U)^{-1}$, esto debido a la baja actividad enzimática mostrada por la levadura en comparación con enzimas comerciales.

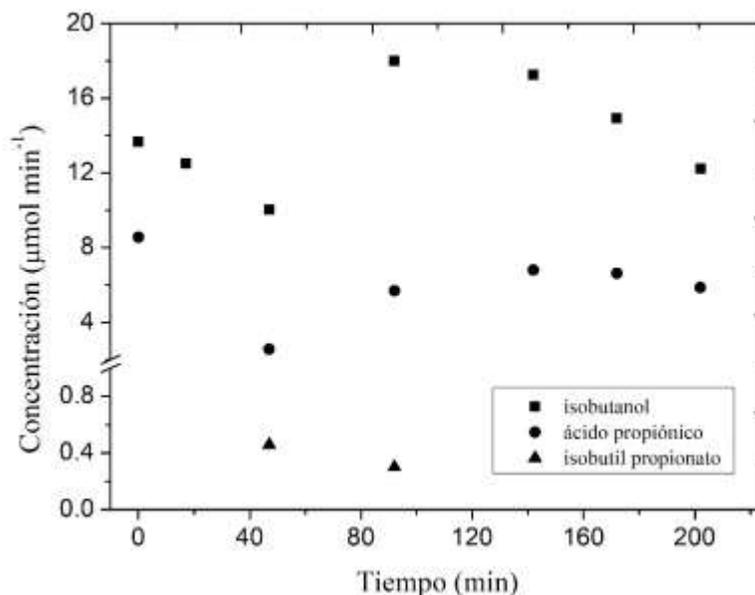


Figura 23. Seguimiento de reactantes y producto en la síntesis de propionato de isobutilo en fase gas.

Tabla 17. Datos del éster producido durante la reacción en sistema SG

Tiempo min	Flujo molar $\mu\text{mol h}^{-1}$	Velocidad de reacción			Conversión %
		$\mu\text{mol (h g}_{\text{biom}})^{-1}$	$\mu\text{mol (h g}_{\text{sop}})^{-1}$	$\mu\text{g (min U)}^{-1}$	
47	6.88	18.67	0.56	43.57	15.17
92	4.53	12.28	0.37	28.66	5.03

8.3 Conclusiones parciales

Se evaluó la capacidad de *Y. lipolytica* como biocatalizador en la síntesis de ésteres, en donde se definió en primera instancia su actividad enzimática relacionada con la reacción de esterificación, se establecieron las condiciones de cultivo y preparación de la levadura como biocatalizador y se estableció la capacidad de llevar a cabo síntesis de propionato de isobutilo en un medio favorable para llevar esta reacción. Finalmente evaluó la reacción con la

levadura en un biorreactor SG probando la capacidad del biocatalizador para producir el éster en este tipo de sistemas. Además, se diseñó y monto un sistema de reacción SG a escala banco, con control de temperatura capaz de llevar a cabo la reacción de esterificación y darle seguimiento a ésta.

9. CONCLUSIONES GENERALES

La esterificación de ácido propiónico y alcohol isobutílico sobre lipasas soportadas tiene relevancia industrial debido a la demanda del producto (propionato de isobutilo) en la industria de alimentos. La literatura identifica a la biocatálisis sólido/gas como una de las disciplinas más prometedoras para llevar a cabo esta esterificación ya que supera las principales limitaciones identificadas en los sistemas biocatalíticos de base líquida. Sin embargo, el diseño del biorreactor es el principal desafío de ingeniería para su aplicación a gran escala. Dado que el modelado es la herramienta de ingeniería más confiable para diseñar una tecnología de reacción, esta contribución utilizó los fundamentos de la ingeniería de reactores para desarrollar un modelo pseudo continuo para un biorreactor SG no convencional de modo que cada uno de sus términos se evaluó a partir de un análisis independiente. Por ejemplo, la conversión de equilibrio se determinó usando la termodinámica clásica, la cinética se caracterizó proponiendo una hipótesis mecanicista de reacción y desarrollando el modelo correspondiente usando observaciones reportadas en la literatura, la dinámica de fluidos se caracterizó siguiendo un enfoque conservador de masa y los parámetros de transporte se obtuvieron a partir de correlaciones bien aceptadas para lechos empacados. Hasta donde sabemos, este es el primer modelo pseudo continuo para describir el rendimiento de este tipo de reacción en un biorreactor SG.

Los resultados mostraron el potencial de la tecnología SG para la esterificación de ácido propiónico y alcohol isobutílico en lipasas comerciales compatibles. La termodinámica aclaró, por un lado, cómo la conversión de equilibrio se ve afectada principalmente por a_w . Las conversiones de equilibrio se vieron favorecidas con valores de a_w cercanos a cero y proporciones de alcohol:ácido alrededor de 1:4 o 4:1. La cinética indicó que las tasas de

bioconversión se vieron favorecidas con una a_w de alrededor de 0,2, y valores de la proporción de alcohol a ácido cercanos a 1:4 o 4:1. A nivel del biorreactor SG, la dinámica de fluidos favoreció la transferencia de calor a través del lecho, evitando la aparición de puntos calientes. Las temperaturas del refrigerante de alrededor de 316 K llevaron a la mayor conversión a través del lecho. Las velocidades de reacción se vieron favorecidas a una gran concentración de entrada de sustratos.

Experimentalmente se estableció a *Y. lipolytica* como un biocatalizador viable en la obtención de ésteres. Se definieron la preparación de la levadura para su aplicación como biocatalizador en medios de reacción no acuosos para la síntesis de propionato de isobutilo. Se llevó a cabo el crecimiento de *Y. lipolytica* en medio sólido con anillos de cerámica como soporte y dándole un tratamiento de liofilización. Se evaluó de manera preliminar el biocatalizador, en donde los experimentos preliminares con fase orgánica y líquido sin solventes mostraron la capacidad de la levadura para producir el éster propionato de isobutilo. Se diseñó y montó un sistema de reacción SG a nivel laboratorio y se llevaron a cabo experimentos en donde, de manera preliminar se comprobó la capacidad del *Y. lipolytica* para realizar la reacción de esterificación para la obtención en fase gaseosa.

10. PERSPECTIVAS

Ya que se cuenta con la información del modelado del reactor y la reacción y se probó el potencial de la levadura *Y. lipolytica* en la reacción de esterificación, es necesario evaluar las condiciones de operación experimentalmente en el sistema de reacción, y con esto validar el modelo propuesto, así este modelo será valioso para llevar a cabo el diseño conceptual del biorreactor sólido/gas a otras escalas.

Además, ya que se cuenta con el sistema es posible evaluar otro tipo de reacciones y biocatalizadores con el potencial de llevarse a cabo, con la posibilidad de adecuar el sistema para poder utilizar compuestos con punto de ebullición altos modificando por ejemplo la presión en el sistema.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S. H., Taramah, A., Merchant, S. Q., & Al-Sahhaf, T. (2007). Synthesis of esters: Development of the rate expression for the Dowex 50 Wx8-400 catalyzed esterification of propionic acid with 1-propanol. *Chemical Engineering Science*, 62(12), 3197–3217. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.03.017>
- Alvarado-Camacho, C., Poissonnier, J., Thybaut, J., & Castillo, C. O. (2021). Unravelling the redox mechanism and kinetics of a highly active and selective Ni-based material during the oxidative dehydrogenation of ethane. *Reaction Chemistry & Engineering*. <https://doi.org/10.1039/d1re00275a>
- Alvarez-Macarie, E., & Baratti, J. (2000). Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 10(4), 377–383. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00109-5)
- Aparicio-Mauricio, G., Ruiz, R. S., López-Isunza, F., & Castillo-Araiza, C. O. (2017). A simple approach to describe hydrodynamics and its effect on heat and mass transport in an industrial wall-cooled fixed bed catalytic reactor: ODH of ethane on a MoVNbTeO formulation. *Chemical Engineering Journal*, 321, 584–599. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.03.043>
- Arroyo, M., Acebal, C., & De la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768), a156. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>
- Arzumanov, T. E., Shishkanova, N. V., & Finogenova, T. V. (2000). Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 525–529. <https://doi.org/10.1007/s002530051651>
- Bellissent-Funel, M. C., Hassanali, A., Havenith, M., Henchman, R., Pohl, P., Sterpone, F., Van Der Spoel, D., Xu, Y., & Garcia, A. E. (2016). Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins. *Chemical Reviews*, 116(13), 7673–7697. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00664>
- Bey, O., & Eigenberger, G. (1997). Fluid flow through catalyst filled tubes. *Chemical Engineering Science*, 52(8), 1365–1376. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(96\)00509-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(96)00509-X)
- Bhavsar, K. V., & Yadav, G. D. (2018). Microwave assisted solvent-free synthesis of n-butyl propionate by immobilized lipase as catalyst. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14(February), 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.012>
- Białecka-Florjańczyk, E., Krzyczkowska, J., Stolarzewicz, I., & Kapturowska, A. (2012). Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(3–4), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.10.010>
- Bird, R., Stewart, W., & Lightfoot, E. (2006). *Transport Phenomena* (Second ed.). John Wiley and Sons.
- Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2008). Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by *Aspergillus terreus* in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.022>

- Bont, J. De, Ginkel, C. Van, & Tramper, J. (1983). Ethylene oxide production by immobilized *Mycobacterium* Py1 in a gas-solid bioreactor. *Enzyme and Microbial*, 5, 55–59. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022983900650>
- Cantone, S., Hanefeld, U., & Basso, A. (2007). Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chemistry*, 9(9), 954. <https://doi.org/10.1039/b618893a>
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., & Bordes, F. (2012). Lipases and Phospholipases. *Methods Mol Biol*, 861, 3–30. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5>
- Castillo-Araiza, C. O. (2021). Decoding Complexity during the Modeling of the Microscopic Energetic Path in a Wall- Cooled Catalytic Reactor. *Energy Science, Technology and Management*, 1(1), 1–17.
- Castillo-Araiza, C. O., & Lopez-Isunza, F. (2008). Hydrodynamic Models for Packed Beds with Low Tube-to-Particle Diameter Ratio. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 6(1). <https://doi.org/10.2202/1542-6580.1550>
- Castillo, E., Casas-Godoy, L., & Sandoval, G. (2016). Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis*, 1(1), 178–188. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0013>
- Chandane, V. S., Rathod, A. P., Wasewar, K. L., & Sonawane, S. S. (2017). Esterification of propionic acid with isopropyl alcohol over ion exchange resins: Optimization and kinetics. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(1), 249–258. <https://doi.org/10.1007/s11814-016-0249-5>
- Che-Galicia, G., López-Isunza, F., Corona-Jiménez, E., & Castillo-Araiza, C. O. (2020). The role of kinetics and heat transfer on the performance of an industrial wall-cooled packed-bed reactor: Oxidative dehydrogenation of ethane. *AIChE Journal*, 66(4). <https://doi.org/10.1002/aic.16900>
- Choi, J.-M., Han, S.-S., & Kim, H.-S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Coelho, M. a Z., Amaral, P. F. F., & Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica* : an industrial workhorse. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 930–944.
- Cordero-Soto, I. N., Castillo-Araiza, C. O., García-Martínez, L. E., Prado-Barragán, A., & Huerta-Ochoa, S. (2020). Solid/gas biocatalysis for aroma production: An alternative process of white biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107767. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107767>
- Dandavate, V., Keharia, H., & Madamwar, D. (2009). Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles. *Process Biochemistry*, 44(3), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.11.001>
- de Carvalho, C. C. C. R. (2017). Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 250–263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12363>
- Debeche, T., Marmet, C., Kiwi-Minsker, L., Renken, A., & Juillerat, M. A. (2005). Structured fiber supports for gas phase biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.012>

- Derkx, O. R., & Dixon, A. G. (1997). Effect of the wall Nusselt number on the simulation of catalytic fixed bed reactors. *Catalysis Today*, 35(4), 435–442. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(96\)00210-6](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(96)00210-6)
- Dixon, A. G. (1997). Heat Transfer in Fixed Beds at Very Low (<4) Tube-to-Particle Diameter Ratio. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 36(8), 3053–3064. <https://doi.org/10.1021/ie9605950>
- Domínguez, A., Costas, M., Longo, M. A., & Sanromán, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica* A. *Biotechnology Letters*, 25(15), 1225–1229. <https://doi.org/10.1023/A:1025068205961>
- Domínguez, Alberto, Deive, F. J., Sanromán, M. A., & Longo, M. A. (2003). Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(11), 1166–1170. <https://doi.org/10.1002/jctb.922>
- Doraiswamy, L. K., & Üner, D. (2013). *Chemical Reaction Engineering: Beyond the Fundamentals* (first ed.). CRC Press.
- dos Santos, P., Meireles, M. A. A., & Martínez, J. (2017). Production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed bed reactors with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 127(March), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.019>
- Elsari, M., & Hughes, R. (2002). Axial effective thermal conductivities of packed beds. *Applied Thermal Engineering*, 22(18), 1969–1980. [https://doi.org/10.1016/S1359-4311\(02\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1359-4311(02)00117-5)
- Fickers, P, BENETTI, P., WACHE, Y., MARTY, A., MAUERSBERGER, S., SMIT, M., & NICAUD, J. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5(6–7), 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
- Fickers, Patrick, Marty, A., & Nicaud, J. M. (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 632–644. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
- Fomuso, L. B., & Akoh, C. C. (2002). Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Research International*, 35(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00158-7)
- Froment, G. F., & Bischoff, K. B. (2011). *Chemical Reactor analysis and design* (John Wiley & Sons (Ed.); 3 rd). John Wiley & Sons.
- Froment GF, Bischoff KB, D. W. J. (2011). *Chemical reactor analysis and design* (Vol. 148). <https://www.wiley.com/en-us/Chemical+Reactor+Analysis+and+Design%2C+3rd+Edition-p-9780470913116>
- Gamson, B. W. (1951). Heat and mass transfer: fluid-solid. *Chemical Engineering Progress*, 47(1), 19–28.
- Giannozzi, P., Baroni, S., Bonini, N., Calandra, M., Car, R., Cavazzoni, C., Ceresoli, D., Chiarotti, G. L., Cococcioni, M., Dabo, I., Dal Corso, A., De Gironcoli, S., Fabris, S., Fratesi, G., Gebauer, R., Gerstmann, U., Gougoussis, C., Kokalj, A., Lazzeri, M., ... Wentzcovitch, R. M. (2009). QUANTUM ESPRESSO: A modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *Journal of Physics Condensed Matter*, 21(39). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/21/39/395502>

- Gilham, D., & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36(2 SPEC. ISS.), 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.11.003>
- GOLDBERG, M., THOMAS, D., & LEGOY, M. -D. (1990). The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates: Effects of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity. *European Journal of Biochemistry*, 190(3), 603–609. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15615.x>
- Gómez-Ramos, G. A., Castillo-Araiza, C. O., Huerta-Ochoa, S., Couder-García, M., & Prado-Barragán, A. (2019). Assessment of hydrodynamics in a novel bench-scale wall-cooled packed bioreactor under abiotic conditions. *Chemical Engineering Journal*, 375(June), 121945. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121945>
- Grizon, V., Legoy, M. D., & Lamare, S. (2004). Effect of yeast cell disruption on ADH activity for redox reactions with in situ cofactor regeneration in a continuous solid/gas bioreactor. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(3), 177–182. <https://doi.org/10.1080/10242420410001727337>
- Guerrero Urrutia, C. (2017). ANÁLISIS COMPARATIVO DEL SECRETOMA DE *Aspergillus brasiliensis* OBTENIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO [Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspum/presentatesis.php?recno=19143&docs=UAMI19143.pdf>
- Gunn, D. J. (1987). Axial and radial dispersion in fixed beds. *Chemical Engineering Science*, 42(2), 363–373. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(87\)85066-2](https://doi.org/10.1016/0009-2509(87)85066-2)
- Güvenç, A., Kapucu, N., & Mehmetoğlu, Ü. (2002). The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*, 38(3), 379–386. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00099-7)
- Halim, S. F. A., Kamaruddin, A. H., & Fernando, W. J. N. (2009). Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, 100(2), 710–716. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.031>
- Halling, P. J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(3), 178–206. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90043-4)
- Hamstra, R. S., Murris, M. R., & Tramper, J. (1987). The influence of immobilization and reduced water activity on gaseous-alkene oxidation by *Mycobacterium* PY1 and *Xanthobacter* PY2 in a gas-solid bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(7), 884–891. <https://doi.org/10.1002/bit.260290710>
- Hernandez-Aguirre, A., Hernandez-Martinez, E., López-Isunza, F., & Castillo, C. O. (2021). Framing a Novel Approach for Pseudo Continuous Modeling using Direct Numerical Simulations (DNS): Fluid Dynamics in a Packed Bed Reactor. *Chemical Engineering Journal*, m(February 2021), 132061. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132061>
- Huang, J., Le-He, M. ', Wu, H., & Lin, D. Q. (2007). Biosynthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23(6), 865–871. <https://doi.org/DOI 10.1007/s11274-006-9311-5>

- Hurst, a. (1966). Biosynthesis of the Antibiotic Nisin and Other Basic Peptides by *Streptococcus lactis* Grown in Batch Culture. *Journal of General Microbiology*, 45(3), 503–513. <https://doi.org/10.1099/00221287-45-3-503>
- Izci, A., & Hosgün, H. L. (2007). Kinetics of synthesis of isobutyl propionate over amberlyst-15. *Turkish Journal of Chemistry*, 31(5), 493–499. <https://doi.org/10.1002/kin>
- Jones, A., Wood, D. N., Razniewska, T., Gaucher, G. M., & Behie, L. A. (1986). Continuous production of penicillin-g by penicillium chrysogenum cells immobilized on celite biocatalyst support particles. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 64(4), 547–552. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450640404>
- Jørgensen, H., Nielsen, J., Møllgaard, H., & Villadsen, J. (1995). Analysis of Penicillin V biosynthesis during fed-batch cultivations with a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 123–130. <https://doi.org/10.1007/s002530050380>
- Kende, H. (1993). Ethylene Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44(1), 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.001435>
- Kim, M. J., Kim, B. G., & Ahn, J. H. (2013). Biosynthesis of bioactive O-methylated flavonoids in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7195–7204. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5020-9>
- Kulishova, L., Dimoula, K., Jordan, M., Wirtz, A., Hofmann, D., Santiago-Schübel, B., Fitter, J., Pohl, M., & Spiess, A. C. (2010). Factors influencing the operational stability of NADPH-dependent alcohol dehydrogenase and an NADH-dependent variant thereof in gas/solid reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(3–4), 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.09.005>
- Kulishova, L. M., & Zharkov, D. O. (2017). Solid/gas biocatalysis. *Biochemistry (Moscow)*, 82(2), 95–105. <https://doi.org/10.1134/S000629791702002X>
- Kuperkar, V. V., Lade, V. G., Prakash, A., & Rathod, V. K. (2014). Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.10.024>
- Lamare, S, Caillaud, B., Roule, K., Goubet, I., & Legoy, M. D. (2001). Production of Natural Esters at the Pre-Industrial Scale by Solid/Gas Biocatalysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19(5–6), 361–377. <https://doi.org/10.3109/10242420108992024>
- Lamare, Sylvain. (1993). Biocatalysis in the gas phase. *Trends in Biotechnology*, 11(10), 413–418. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90004-S](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90004-S)
- Lamare, Sylvain, & Legoy, M. D. (1995). Working at controlled water activity in a continuous process: The gas/solid system as a solution. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(5), 387–397. <https://doi.org/10.1002/bit.260450503>
- Lamare, Sylvain, Legoy, M., Graber, M., Biotechnologies, L. De, Chimie, D., Curie, B. M., Rochelle, D. La, Crépeau, A. M., & E-mail, F.-. (2004). Solid / gas bioreactors : powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chemistry*, 445–458.
- Laudani, C. G., Habulin, M., Knez, Ž., Porta, G. Della, & Reverchon, E. (2007). Lipase-catalyzed

- long chain fatty ester synthesis in dense carbon dioxide: Kinetics and thermodynamics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 41(1), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.08.011>
- Létisse, F., Lamare, S., Legoy, M. D., & Graber, M. (2003). Solid/gas biocatalysis: An appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1652(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00262-0)
- Ligny, L. De. (1970). *Coupling between diffusion and convection in radial dispersion of matter by fluid flow through packed beds*. 25, 1177–1181.
- Linko, Y. Y., Wang, Z. L., & Seppälä, J. (1995). Solvent effects on multiphase biocata. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(6), 506–511. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00095-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00095-9)
- Liu, H.-H., Ji, X.-J., & Huang, H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1522–1546. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>
- Lozano, P., Vllora, G., Gómez, D., Gayo, A. B., Sánchez-Conesa, J. A., Rubio, M., & Iborra, J. L. (2004). Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 29(1–2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(03\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(03)00050-0)
- Marchand, P., Rosenfeld, E., Erable, B., Maugard, T., Lamare, S., & Goubet, I. (2008). Coupled oxidation-reduction of butanol-hexanal by resting *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 13064 cells in liquid and gas phases. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.07.004>
- Marchand, Pierre, Crémont, M., Lamare, S., & Goubet, I. (2009). Dehalogenation of a gaseous effluent by dehydrated whole cells in a solid/gas reactor: A study of catalyst stability. *Biocatalysis and Biotransformation*, 27(3), 195–203. <https://doi.org/10.1080/10242420902811071>
- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Willemot, R. M., & Condoret, J. S. (1992). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO₂. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(3), 273–280. <https://doi.org/10.1002/bit.260390304>
- McCune, L. K., & Wilhelm, R. H. (1949). Mass and Momentum Transfer in a Solid-Liquid System. *Industrial & Engineering Chemistry*, 41(6), 1124–1134. <https://doi.org/10.1021/ie50474a006>
- Mizobuchi, M., & Nagayama, K. (2015). Reduced pressure gas phase bioreactor as a tool for stereoselective reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Parvibaculum lavamentivorans*. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.018>
- Monot, F., Borzeix, F., Bardin, M., & Vandecasteele, J.-P. (1991). Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 559–562. <https://doi.org/10.1007/BF00169891>
- Nagayama, K., Spiess, A. C., & Büchs, J. (2010). Gas phase enantioselective reduction catalyzed by immobilized ketoreductase: Effects of water activity and reaction temperature. *Biochemical Engineering Journal*, 52(2–3), 301–303. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.011>
- Nemec, D., & Levec, J. (2005). Flow through packed bed reactors: 1. Single-phase flow. *Chemical*

- Engineering Science*, 60corrlati(24), 6947–6957. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.05.068>
- Nikolova, P., & Ward, O. P. (1993). Effect of organic solvent on biotransformation of benzaldehyde to benzyl alcohol by free and silicone-alginate entrapped cells. *Biotechnology Techniques*, 7(12), 897–902. <https://doi.org/10.1007/BF00156370>
- Nikolova, Penka, & Ward, O. P. (1993). Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(2), 76–86. <https://doi.org/10.1007/BF01569905>
- Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., & Minoda, Y. (1982). Purification and Some Properties of Cell-bound Lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(12), 2885–2893. <https://doi.org/10.1080/00021369.1982.10865537>
- Palmerín-Carreño, D.M., Rutiaga-Quiñones, O. M., Verde Calvo, J. R., Prado-Barragán, A., & Huerta-Ochoa, S. (2015). Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 788–793. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.065>
- Palmerín-Carreño, Dulce M., Rutiaga-Quiñones, O. M., Verde-Calvo, J. R., Prado-Barragán, A., & Huerta-Ochoa, S. (2016). Whole Cell Bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone in 100 % Organic Phase using *Yarrowia lipolytica* 2.2ab. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 14(4). <https://doi.org/10.1515/ijcre-2016-0013>
- Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., and Legoy, M. D. (1992). Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnol. Bioeng*, 39(523), 467–473.
- Perez, V. H., Miranda, E. A., & Valença, G. P. (2007). Kinetics of gas-phase hydrolysis of ethyl acetate catalyzed by immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(1), 23–37. <https://doi.org/10.1007/BF02685936>
- Pires, E. L., Miranda, E. A., & Valença, G. P. (2002). Gas-phase enzymatic esterification on immobilized lipases in MCM-41 molecular sieves. *Appl Biochem Biotechnol*, 98–100, 963–976. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:963>
- Rocha, J. M. S., Gil, M. H., & Garcia, F. A. P. (1999). Optimisation of the enzymatic synthesis of n-octyl oleate with immobilised lipase in the absence of solvents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74(7), 607–612. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199907\)74:7<607::AID-JCTB74>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199907)74:7<607::AID-JCTB74>3.0.CO;2-N)
- Sanádi, Z. C., Urđi, R. K., & Akó, K. B. É. (2012). Ethyl-Acetate Synthesis in Gas Phase By Immobilised Lipase. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry Veszprém*, 40(1), 39–44.
- Santoro, M. V., Zygadlo, J., Giordano, W., & Banchio, E. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), 1177–1182. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.016>
- Schulze, B., & Wubbolts, M. G. (1999). Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(6), 609–615. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00042-7)
- Shah, S. A. A., Sultan, S., & Adnan, H. S. (2013). A whole-cell biocatalysis application of steroidal drugs. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(2), 389–403. <https://doi.org/10.13005/ojc/290201>
- Shah, S., & Gupta, M. N. (2007). Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a

- solvent free system. *Process Biochemistry*, 42(3), 409–414.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.024>
- Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1994). Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(5), 549–556. <https://doi.org/10.1002/bit.260440502>
- Trivedi, A. H., Spiess, A. C., Daussmann, T., & Büchs, J. (2006). Effect of additives on gas-phase catalysis with immobilised *Thermoanaerobacter* species alcohol dehydrogenase (ADH T). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 407–414. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0169-5>
- Valivety, R. H., J. Halling, P., & Macrae, A. R. (1992). Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1118(3), 218–222. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90278-L](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90278-L)
- Varma, M. N., & Madras, G. (2010). Effect of Chain Length of Alcohol on the Lipase-Catalyzed Esterification of Propionic Acid in Supercritical Carbon Dioxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(8), 2342–2354. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8696-7>
- Veny, H., Aroua, M. K., & Sulaiman, N. M. N. (2014). Kinetic study of lipase catalyzed transesterification of jatropha oil in circulated batch packed bed reactor. *Chemical Engineering Journal*, 237, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.10.010>
- Villadsen, J. V., & Stewart, W. E. (1995). Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation. *Chemical Engineering Science*, 50(24), 3981–3996. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)81831-8](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)81831-8)
- Wakao, N., & Funazkri, T. (1978). Effect of fluid dispersion coefficients on particle-to-fluid mass transfer coefficients in packed beds. Correlation of sherwood numbers. *Chemical Engineering Science*, 33(10), 1375–1384. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(78\)85120-3](https://doi.org/10.1016/0009-2509(78)85120-3)
- Watanabe, T., Sugiura, M., Sato, M., Yamada, N., & Nakanishi, K. (2005). Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, 40(2), 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.046>
- Woodwardl, J. (Ed.). (1985). *Immobilised Cells and Enzymes: A Practical Approach*. Oxford, England.
- Yadav, G. D., & Lathi, P. S. (2006). Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.013>
- Yahya, A. R. M., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7–8), 438–450. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00065-9)
- Zaks, A., & Dodds, D. R. (1997). Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 2(12), 513–531. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01078-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01078-7)

12. ANEXOS

12.1 Anexo A: Identificación de Compuestos

La Figura A muestra la identificación de los compuestos de la reacción de esterificación en mezcla como individualmente, Los tiempos de retención de los compuestos fueron: 2.74 min para el isobutil alcohol, 4.23 el isobutil propionato y 4.91 del ácido propiónico.

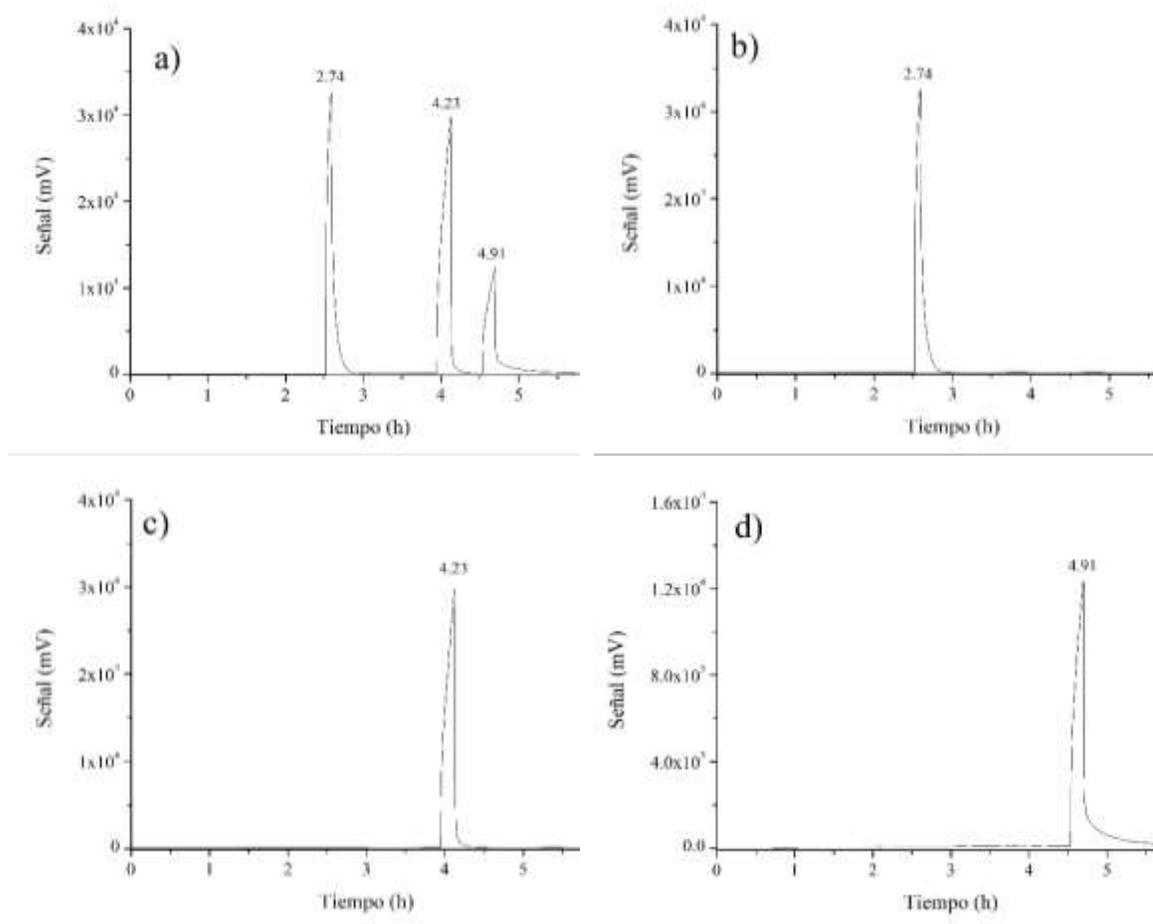


Figura A. Cromatograma de reactantes y producto de la reacción de esterificación: a) Mezcla de compuestos, b) Isobutil alcohol, c) Isobutil propionato, d) Ácido propiónico.

12.2 Anexo B. sistema de reacción

A continuación, se muestran los componentes y el sistema de reacción SG que se montó en laboratorio.



Figura A2.1. Frasco utilizado en el sistema.



Figura A2.2. Bioreactor SG empacado.



Figura A2.3. Frasco de reactantes con contenedor dentro y tapa con entrada y salida de gas.



Figura A2.4. Sistema de reacción GS.