

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química



BIODESULFURIZACIÓN DE BIBENZOTIOFENO CON
"PSEUDOMONAS PUTIDA" KTH2 : UNA
APROXIMACIÓN AL CAMBIO DE ESCALA DEL
PROCESO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Igor Martínez Sánchez

Bajo la dirección de los doctores

Félix García-Ochoa Soria
Victoria E. Santos Mazorra

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



BIODESULFURACIÓN DE DIBENZOTIOFENO CON
Pseudomonas putida KTH2: UNA APROXIMACIÓN AL
CAMBIO DE ESCALA DEL PROCESO

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor

presenta:

IGOR MARTÍNEZ SÁNCHEZ

Madrid, 2013

El Dr. FELIX GARCIA-OCHOA SORIA, catedrático de Ingeniería Química y la Dra. VICTORIA EUGENIA SANTOS MAZORRA, profesora titular de Ingeniería Química, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los directores,

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dra. Victoria E. Santos Mazorra

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda y al apoyo de muchas personas. A todas ellas, mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar estoy en deuda con mis directores de tesis, por confiar en mí sin casi conocerme, después de un viaje relámpago que seguramente haya cambiado mi vida. Gracias al Dr. Félix García-Ochoa por darme la oportunidad de trabajar en este grupo, por toda su experiencia y su paciencia. Muchas gracias a la Dra. Victoria Santos, por ser mucho más que una directora de tesis, por estar disponible en cualquier momento para hablar no solo del trabajo, sino de cualquier preocupación, siempre con una sonrisa en la boca.

Gracias a Miguel Ladero por un número inimaginable de consejos, todos buenos. Gracias a Emilio por su ayuda en los últimos capítulos, cuando me faltaba el oxígeno. No quiero olvidarme de Almu, por ser tan buena, por todo su apoyo, y por unos cuantos libros.

Han sido muchos los compañeros de trabajo durante estos años. La mayoría de ellos han pasado de ser compañeros a ser amigos, muy buenos amigos. Hemos vivido alegrías, penas, enfados, reconciliaciones, despedidas, bodas, y casi bautizos y comuniones. Entre todos han conseguido que ir al trabajo sea como estar en casa, que los madrugones no duelan y que tanto las horas intempestivas como los fines de semana sean un placer.

Algunos ya vivían en el zulo cuando llegué, muchas gracias a Javi por enseñarme todo lo que sé hacer y a Cris por ser un saco de alegría. Otro Javi se nos ha hecho riojano, pero le tendré que querer igual.

Con Sebas y Vane he pasado todos estos años, no se qué os puedo decir, no puedo imaginar unos compañeros mejores. Nos hemos hecho mayores juntos (algunos más que otros..) sois parte de mi familia y espero estar siempre cerca de vosotros. Gon, eres el más grande, por esas noches de casquería, por las mejores (y puede que más absurdas) conversaciones que he tenido nunca, seguro que nos volvemos a encontrar.

A Irantzu y Gorka, por ser mi cuadrilla madrileña, por los innumerables momentos que hemos pasado, por las tardes del Melos y las noches de Lost. Nos vemos en Copenhague.

Estos años ha pasado mucha gente por el laboratorio. Muchas gracias a Bruno y a Borja por los buenos ratos. A Paula por ser mi primera polluela. A Huerti por maja. A Kike por ser un tío grande. A Javi por muchos buenos cafés llenos de fútbol y Fórmula 1. A Jesús por ayudarme a arreglar el mundo, y también mi inglés.

Cuando nos vayamos los viejos, el laboratorio está en buenas manos. Gracias a Susana, por ser tan natural, tienes que dar ese toque femenino que necesita todo laboratorio. A Mateo (o Matweusz, no se cómo se escribe), “spasiva” compañero. A Alberto, con el que me he reído como nunca, sigue con todos tus proyectos.

Quiero agradecer a la gente del CIB-CSIC su ayuda para entender a este bicho, especialmente a José Luis, Eduardo y Virginia.

Gracias a Agustín y Marisa del CNME por su amabilidad y sus buenas fotos.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio, primero de Educación y Ciencia, luego de Ciencia e Innovación, ahora de Economía y Competitividad, con los proyectos CTQ2007-60919/PPQ y CTQ2011-12725-E, así como al proyecto GR35/10-A-910134 de la UCM-BSCH.

A mis padres, que no tenían muy claro que hacía yo todavía “estudiando”, pero que siempre me han apoyado en todo lo que he hecho. A mis hermanos, Aritz y Jorge, porque son los mejores.

A Laura le debo todo esto, por ser la mayor luchadora del mundo, por estar siempre a mi lado, por aguantarme todo este tiempo y ser mi mejor amiga. Tú has sido y serás mi mayor apoyo.

A todos, solo espero que hayáis recibido de mí la mitad de lo que yo he recibido de vosotros.

Natura nusquam magis est tota Quam in minimis
[En ningún lugar se encuentra la naturaleza en su totalidad tanto
como en sus más pequeñas criaturas]

Plinio el Viejo

Espero que siempre recordéis que cuando aparezca cualquier
resultado, especialmente si es novedoso, debéis preguntar:
“¿Cuál es su causa?, ¿por qué ocurre?” y, con el curso del
tiempo, hallaréis la respuesta.

Michael Faraday

INDICE GENERAL

<i>SUMMARY</i>	1
<i>INTRODUCTION</i>	5
<i>AIM of this WORK</i>	6
<i>METHODOLOGY</i>	6
<i>RESULTS and DISCUSSION</i>	7
<i>CONCLUSIONS</i>	10
<i>REFERENCES</i>	11
<i>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</i>	13
1.1. <i>LOS COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	21
1.2. <i>COMPUESTOS de AZUFRE en COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	26
1.3. <i>SOLUCIONES TECNOLÓGICAS para la REDUCCIÓN de AZUFRE en</i> <i>COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	33
1.4. <i>BIODESULFURACIÓN</i>	38
1.5. <i>PSEUDOMONAS PUTIDA KTH2 (pESOX3)</i>	55
1.6. <i>TRABAJOS PREVIOS del GRUPO de INVESTIGACIÓN</i>	57
1.7. <i>OBJETO y ALCANCE del TRABAJO</i>	62
1.8. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	63
<i>CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL</i>	83
2.1. <i>MATERIALES y EQUIPOS</i>	87
2.2. <i>PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES</i>	101
2.3. <i>MÉTODOS de ANÁLISIS</i>	105
2.4. <i>MÉTODOS MATEMÁTICOS</i>	115
2.5. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	117

<i>CAPÍTULO 3. BIODESULFURACIÓN CON CÉLULAS DE DISTINTA EDAD:</i>	
<i>MODELO CINÉTICO</i>	119
3.1. <i>ESTUDIO de la BDS con CÉLULAS de DISTINTA EDAD</i>	124
3.2. <i>FORMULACIÓN de un MODELO CINÉTICO EMPÍRICO</i>	135
3.3. <i>MODELO CINÉTICO INCLUYENDO la CONCENTRACIÓN de</i> <i>EQUIVALENTES REDUCIDOS</i>	150
3.4. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	161
 <i>CAPÍTULO 4. EMPLEO DE COSUBSTRATOS EN BIODESULFURACIÓN: MODELO</i>	
<i>CINÉTICO</i>	163
4.1. <i>ESTUDIO de DISTINTOS COSUBSTRATOS</i>	170
4.2. <i>ESTUDIO de la ADICIÓN de ÁCIDO ACÉTICO</i>	190
4.3. <i>MODELO CINÉTICO INCLUYENDO la EVOLUCIÓN de la</i> <i>CONCENTRACIÓN de NADH y ATP</i>	204
4.4. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	217
 <i>CAPÍTULO 5. BIODESULFURACIÓN EN BIORREACTOR</i>	219
5.1. <i>ESTUDIOS PRELIMINARES</i>	224
5.2. <i>ESTUDIO de las CONDICIONES HIDRODINÁMICAS</i>	231
5.3. <i>ESTUDIO del CONSUMO de OXÍGENO</i>	241
5.4. <i>ESTUDIO MORFOLÓGICO del CULTIVO</i>	263
5.5. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	272
 <i>CAPÍTULO 6. RESUMEN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	275
6.1. <i>RESUMEN</i>	279
6.2. <i>CONCLUSIONES</i>	284
6.3. <i>RECOMENDACIONES</i>	289
 <i>NOMENCLATURA</i>	291

SUMMARY

SUMMARY

Table of contents

<i>INTRODUCTION</i>	5
<i>AIM OF THIS WORK</i>	6
<i>METHODOLOGY</i>	6
<i>RESULTS and DISCUSSION</i>	7
<i>CONCLUSIONS</i>	10
<i>REFERENCES</i>	11

SUMMARY

INTRODUCTION

The combustion of sulfur-containing fossil fuels causes the emission of sulphur oxides, which are a source of environmental, technical and health problems. For these reasons, governments are introducing more stringent regulations limiting sulphur content in fuel to 10-50 ppm (Stanislaus et al., 2010).

Hydrodesulfurization (HDS) is the most employed technology to reduce sulfur content in fuels yet, in order to achieve legal limits, the operational conditions can produce changes in fuel properties; furthermore, there are some thiophenic compounds which are recalcitrant to HDS (Soleimani et al., 2007). Due this fact, other technologies are being studied to solve the problems related to sulphur reduction in fuels. Among them, biodesulfurization (BDS) is the most promising, in which sulphur is removed from fuels by microorganisms.

BDS consists in the use of microorganisms, their enzymes or cellular extracts as catalysts to remove the sulphur present in fuels (Monticello, 2000; Le Borgne and Quintero, 2003; Gupta et al., 2005). The sulphur target compounds usually employed in BDS are the most recalcitrant to HDS, such as dibenzothiophene (DBT) and its derivatives. The most employed metabolic pathway in BDS studies is a non-destructive aerobic pathway known as 4S route, first reported in the bacterium *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Kilbane and Jackowski, 1992; Gallagher et al., 1993). This pathway is formed by four consecutive reactions, where DBT is finally converted to 2-hydroxybiphenyl (HBP), a sulphur-free compound.

The microorganism employed in this work is a GMO, *Pseudomonas putida* KTH2, which carries the genes codifying the 4S route (*dszABC*) from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gallardo et al., 1997), and the gene codifying the oxidoreductase (*hpaC*) from *Escherichia coli* W (Galan et al., 2000).

AIM of this WORK

This work approaches some problems related to the development and scale-up of a biodesulfurization process using DBT as a model sulphur compound.

To observe the influence of the operation time on the process, a fed-batch process with several additions of DBT was developed. A reformulated kinetic model was employed to simulate said fed-batch process. Due to the activity decay of the enzymes involved in the 4S route, an improvement of BDS yield has been proposed by using cosubstrates. The action of the co-substrates on BDS was also determined. A kinetic model was developed to predict and simulate the behaviour of the bioprocess when co-substrates were added employing cells of different growth ages. A scale-up of the BDS process was conducted. The influence of the hydrodynamic conditions on BDS and oxygen uptake was studied.

METHODOLOGY

Biocatalyst production

To obtain repetitive results, the microorganism was grown using a standardized procedure (Martin et al., 2004 & 2005; Gomez et al., 2006). Frozen stocks were used as inoculum and two consecutive growth stages were performed in Luria-Bertani (LB) complex medium in Erlenmeyer flasks. These cells were inoculated into a commercial 2 L bioreactor, where the microorganism is grown using basal salt synthetic medium (BSM). Cells were collected at the selected growth times (5 and 23 h) and conserved at -18 °C for not more than 40 hours to carry out BDS resting cells assays.

Biodesulfurization

Cells were suspended in Erlenmeyer flasks or in a 1-L bioreactor containing a 50mM HEPES buffer solution (in order to maintain the pH at a value of 8.0) and the co-substrate selected (acetic, citric and succinic acids). Biomass concentration was fixed at

0.7 g/L when cells of only one age (5 or 23 h) were used and at 2.1 g/L when the biocatalyst consisted of the optimal mixture of cells (0.7 g/L 5 h cells + 1.4 g/L 23 h cells) (Calzada et al., 2011). Different sulphur containing substrates (DBT, DBTO, DBTO₂ and HBPS) were added in the runs carried out and samples were collected periodically for their analysis.

Analytical methods

The biomass concentration was determined as optical density at 600 nm (OD₆₀₀) using a spectrophotometer. HPLC with a UV detector was employed to analyze all the 4S route compounds (Calzada et al., 2007). ATP concentration was analysed using a commercial kit from BiothemaTM and NADH was extracted using heated Tris-EDTA buffer and quantified by *in situ* fluorescence (Wos and Pollard, 2006).

Mathematical methods

The production rates method was employed to determine the reaction rates and the parameters involved in the kinetic equations (Garcia-Ochoa et al., 1993). The reaction rates method was used to solve reaction networks involved in the kinetic models separately (Garcia-Ochoa and Romero, 1993). The algorithm used for the non-linear fitting was NL2SOL and the integration algorithm employed was the implicit Euler method.

RESULTS and DISCUSSION

Kinetic model of biodesulfurization using different cell ages

BDS kinetics of DBT using *Pseudomonas putida* KTH2 has been determined. A previously published kinetic model describing the 4S route of DBT has been modified (Calzada et al., 2012). The model is able to simulate the batch process when the biocatalyst consists of the optimal mixture of cells, though it is not able to reproduce the results when a fed-batch operation is carried out. Due to the NADH-dependence of the first three reactions of the 4S route, the evolution of this compound was analyzed, and an improvement of the kinetic model was proposed by introducing the NADH concentration in the kinetic equations, yielding a modified kinetic model able to explain the evolution of the 4S route compounds when a fed-batch operation is carried out.

Use of co-substrates in biodesulfurization: kinetic model

The addition of co-substrates in bioprocesses can be used to regenerate metabolites consumed during bioreactions, such as NADH and ATP (Zhou et al., 2009; Wichmann & Vasic-Racki, 2005). The concentration of these metabolites could decrease during the BDS process using resting cells, explaining its deceleration with respect to time observed in previous runs. In this section, a study of the use of co-substrates in the process of BDS using resting cells was undertaken in order to improve the rates of the reactions involved in the 4S route.

First of all, a study regarding the possibility of improving the yield of the process using co-substrates (acetic, citric and succinic acids) at different concentrations (2.5, 5, 7.5, 15, 20 and 30 g/L) was carried out using cells collected at 5 and 23 h growth time. Results showed that, when using 5 h aged cells, acetic and succinic acids provided higher improvement on BDS capability; whereas when the biocatalyst consisted of cells of 23 h of age, the best results were achieved using acetic and citric acids. For all the cosubstrates, the best results were obtained at 15 g/L of concentration.

Afterwards, the effect of co-substrate addition was studied when the biocatalyst consists of the optimal mixture of cells (66 % of 23 h grown cells and 33 % of 5 h grown cells, biomass concentration of 2.1 g/L). To study the effect of co-substrate addition and the influence of the operation time on the BDS process, a set of experiments was carried out, adding 15 g/L of each co-substrate (acetic, citric and succinic acids, and a control experiment without co-substrate), in batch and fed-batch operation. In batch operation, complete conversion to HBP was reached at 90 minutes in all the experiments; nevertheless, when using fed-batch, BDS capacity decreases as the number of batches increases and it can be observed that the addition of any co-substrate provides an improvement of BDS in each batch, with the best results being obtained when acetic acid is employed.

In order to determine the influence of acetic acid (15 g/L) on each reaction of the 4S route, an additional set of experiments was carried out using the optimal mixture of cells. All the 4S route intermediates (DBT, DBTO, DBTO₂ and HBPS) were used as substrates to study the influence separately. Results showed that the rate of all the reactions was higher when acetic acid is added, with this effect being more pronounced for the last reaction of the 4S route, corresponding to the transformation of HBPS into HBP.

The 4S route is deeply NADH-dependent, but only in the three first reactions. Nevertheless, NADH does not affect the last reaction, which one that suffers the most acceleration through the addition of acetic acid; therefore, the observed improvement could be due to the ATP concentration increase.

NADH and ATP intracellular concentrations during the BDS process were analysed in order to determine their evolution with respect to time and their possible regeneration when using acetic acid as co-substrate. As expected, results show that the concentrations of both NADH and ATP decreased with operation time, and also were higher when acetic acid was added to the BDS medium.

A reformulated kinetic model was developed by introducing ATP concentration in the fourth kinetic equation instead of the enzymatic deactivation. Solving this reformulated kinetic model together with the model proposed in the previous section, it is possible to predict and simulate the evolution of the concentration of the 4S route compounds in all the experiments developed.

Biodesulfurization in bioreactor setup

Due to the low aqueous solubility of DBT when the BDS process is carried out in a bioreactor setup, the addition of a surfactant into the BDS medium could be necessary. TweenTM 80 has been selected as surfactant (Feng et al., 2006), with its optimal concentration determined at 5 %.

The influence of hydrodynamic conditions (determined by stirrer speed, aeration flow and aeration gas composition) on the BDS capacity was studied. Results showed that the best conditions to carry out the BDS in the bioreactor setup were: 400 rpm, 2 L/min using air as aeration gas. When working at these conditions, the BDS capacity was similar to that obtained in Erlenmeyer flasks. Also, the value of the volumetric mass transfer coefficient, k_{La} , was similar in both situations.

The study of the oxygen transport and uptake rates showed that the oxygen uptake due to the BDS can be considered negligible. In all the experiments, the oxygen uptake rate was limited by the oxygen transport rate.

A secretion of extracellular polymeric substances (EPS) has been observed induced by the addition of acetic acid. When the BDS is carried out in Erlenmeyer flasks, a biofilm is observed, contrary to when the BDS is carried out in bioreactor, due to the hydrodynamics of the system. The hydrophobicity of the biofilm could increase

the DBT bioavailability. The use of TweenTM 80 when the BDS is carried out in the bioreactor setup provides the same effect as the biofilm.

CONCLUSIONS

The 4S route of biodesulfurization is an energy intensive process that is very influenced by the availability of some key metabolites, such as ATP and NADH. When the BDS is carried out using cells with different growth ages (5 and 23 hours), a decrease of all the reaction rates with respect to time was observed. When a fed-batch process is executed, the rate of the fourth reaction of the 4S route (corresponding to the conversion of HBPS to HBP), presents a drastic decrease with each DBT addition. In all of these experiments, a decrease of both ATP and NADH concentration was observed.

It is possible to enhance the 4S route reaction rates using co-substrates. In this work, three co-substrates were tested (acetic, citric and succinic acids), with all of them providing an enhancement of the BDS capacity. Best results were obtained using 15 g/L of acetic acid, which also implies higher concentration of both ATP and NADH intracellular concentration.

A reformulated kinetic model was developed, featuring NADH concentration in the three first reactions, as well as ATP concentration in the fourth reaction. Using this kinetic model, it is possible to describe the evolution of all the 4S route compounds in all the experiments carried out. It is also possible to simulate correctly the behaviour of the process when a mixture of cells is employed as biocatalyst.

When the process is scaled-up from Erlenmeyer flasks to a bioreactor setup, the behaviour of the system is different. It was necessary to employ a surfactant to obtain comparative results. The hydrodynamic conditions (determined by stirrer speed and aeration flow) which provide the best BDS results were 400 rpm and 2 L/min. It was possible to obtain similar results in Erlenmeyer flasks and in a bioreactor setup. At these hydrodynamic conditions the oxygen transport, determined by the k_{La} , was similar. One of the criteria for bioreactor scale-up is the 'constant k_{La} ' criterion, which implies maintaining the same k_{La} value during the scale-up process. The results obtained in this work suggest that this criterion is valid, although it is necessary to use a combination of the hydrodynamic conditions to obtain the correct results.

REFERENCES

- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2012). Extended kinetic model for DBT desulfurization using *Pseudomonas putida* CECT 5279 in resting cells. *Biochem. Eng. J.* 66, 52-60.
- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2011). Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochem.* 46, 1323-1328.
- Calzada, J.; Zamarro, M.T.; Alcon, A.; Santos, V.E.; García, J.L. y García-Ochoa, F. (2007). Intracellular activity of the enzymes involved in 4S route biodesulphurization of DBT by *Pseudomonas putida* CECT 5279 as function of cell age. *J. Biotech.* 131S, S74-S97.
- Feng, J.; Zeng, Y.; Ma, C.; Cai, X.; Zhang, Q.; Tong, M.; Yu, B. y Xu, P. (2006). The surfactant Tween 80 enhances biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7390-7393.
- Galán, B.; Díaz, E. y García, J.L. (2000). Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysis. *Environ. Microbiol.* 2, 687-694.
- Gallagher, J.R.; Olson, E.S. y Stanley, D.C. (1993). Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 31-36.
- Gallardo, M.E.; Fernández, A.; de Lorenzo, V.; García, J.L. y Díaz, E. (1997). Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J. Bacteriol.* 179, 7156-7160.
- García-Ochoa, F. y Romero, A. (1993). Kinetic modeling of reaction networks. *Trends Chem. Eng.* 1, 285-305.
- García-Ochoa, F.; Romero, A.; Santos, V.E. y Rodríguez, C.O. (1993). Studies of the use of the differential method in the determination of kinetic models for complex reactions. *Int. Chem. Eng.* 33, 634-648.
- Gomez, E.; Santos, V.E.; Alcon, A.; Martín, A.B. y García-Ochoa, F. (2006). Oxygen-uptake and mass-transfer rates on the growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on BDS capability. *Energy Fuels.* 20, 1565-1571.

- Gupta, N.; Roychoudhury, P.K. y Deb, J.K. (2005). Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 356-366.
- Kilbane, J.J. y Jackowski, K. (1992). Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1107-1114.
- Le Borgne, S. y Quintero, R. (2003). Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Process. Technol.* 81, 155-169.
- Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2005). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels.* 19, 775-782.
- Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2004). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene biodesulfurization for different media compositions. *Energy Fuels.* 18, 851-857.
- Monticello, D.J. (2000). Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 540-546.
- Soleimani, M.; Bassi, A. y Margaritis, A. (2007). Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnol. Adv.* 25, 570-596.
- Stanislaus, A.; Marafi, A. y Rana, M. (2010). Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel production. *Catal. Today.* 153, 1-68.
- Wichmann, R. y Vasic-Racki, D. (2003). Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 92, 225-260.
- Wos, M. y Pollard, P. (2006). Sensitive and meaningful measures of bacterial metabolic activity using NADH fluorescence. *Water Res.* 40, 2084-2092.
- Zhou, J.; Liu, L.; Zhongping, S. Guocheng, D. y Chen, J. (2009). ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 27, 94-101.

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

Indice

1.1.	<i>LOS COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	21
1.2.	<i>COMPUESTOS de AZUFRE en COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	26
1.3.	<i>SOLUCIONES TECNOLÓGICAS para la REDUCCIÓN de AZUFRE en COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	33
1.4.	<i>BIODESULFURACIÓN</i>	38
1.5.	<i>PSEUDOMONAS PUTIDA KTH2 (pESOX3)</i>	55
1.6.	<i>TRABAJOS PREVIOS del GRUPO de INVESTIGACIÓN</i>	57
1.7.	<i>OBJETO y ALCANCE del TRABAJO</i>	62
1.8.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	63

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el ser humano ha utilizado todas las fuentes de energía que tecnológicamente ha tenido a su disposición. Durante siglos se usó la fuerza humana y animal para la agricultura y el transporte; las máquinas hidráulicas fueron la principal fuente de energía mecánica hasta el siglo XVIII y la madera fue el combustible más importante hasta la Revolución Industrial.

La Revolución Industrial fue un complejo cambio económico y social que transformó radicalmente la estructura del mundo. La máquina de vapor se convirtió en la nueva fuente de energía mecánica, aplicándose tanto al transporte como a la industria. El gran aumento que estos cambios produjeron en la demanda de combustibles para el funcionamiento de la máquina de vapor hizo que la madera comenzara a escasear en las zonas industriales siendo sustituida por el carbón.

El carbón y su derivado, el gas de hulla, sustituyeron progresivamente a la madera como principal combustible. Con el paso del tiempo y el desarrollo de los motores de combustión, no tardaron en aparecer otros problemas derivados de la contaminación y la baja eficiencia del uso de estas fuentes. El petróleo se conocía desde la antigüedad, su primer uso fue como lubricante, y su refinado para obtener diferentes productos se comenzó a desarrollar en el siglo XVIII. La gasolina, el residuo obtenido tras la extracción del aceite lubricante y el fuelóleo, comenzó a utilizarse en motores a finales del siglo XIX. Debido a la mejor eficacia de los motores de gasolina y a la menor emisión de humos y partículas, ésta comenzó a sustituir al carbón como fuente de energía, superándolo en consumo a partir de los años cuarenta del siglo XX.

Desde la segunda mitad del siglo XX son cinco las fuentes de energía que se emplean de forma masiva: petróleo, carbón, gas natural, hidroeléctrica y nuclear. En la

Figura 1.1 se observa que el consumo de todas las fuentes de energía no hace sino aumentar con los años. En 2011, el 85% del consumo se obtuvo a partir de combustibles fósiles. A partir de los años noventa se comienzan a utilizar las denominadas energías renovables (provenientes de fuentes naturales virtualmente inagotables).

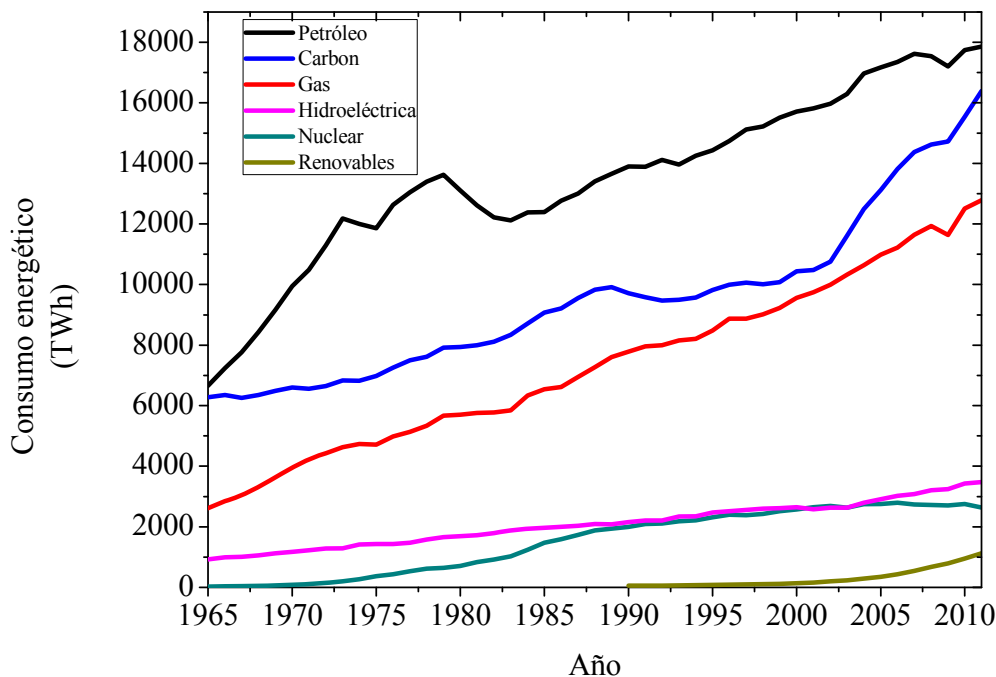


FIGURA 1.1. Evolución del consumo energético mundial relacionado con las principales fuentes de energía (BP Statistical Review of World Energy, 2012)

El consumo de energético es un buen indicador para medir el desarrollo económico de una región. Como se muestra en la Figura 1.2, existe una relación entre el consumo de energía y el nivel de desarrollo económico expresado en términos de PIB *per cápita*. En un extremo se sitúan países como Noruega, con un PIB *per cápita* de 98102 \$/hab y un consumo de 23549 KWh/hab, mientras que en el otro extremo aparecen los países menos desarrollados como la República Democrática del Congo (230 \$/hab. y 104 KWh/hab.).

Para confirmar esta relación, puede observarse que el desarrollo económico de un país lleva consigo un aumento del consumo energético. En la Figura 1.3 se muestra la evolución del PIB *per cápita* y del consumo energético de China desde 1980 y se observa que ambos indicadores siguen la misma tendencia.

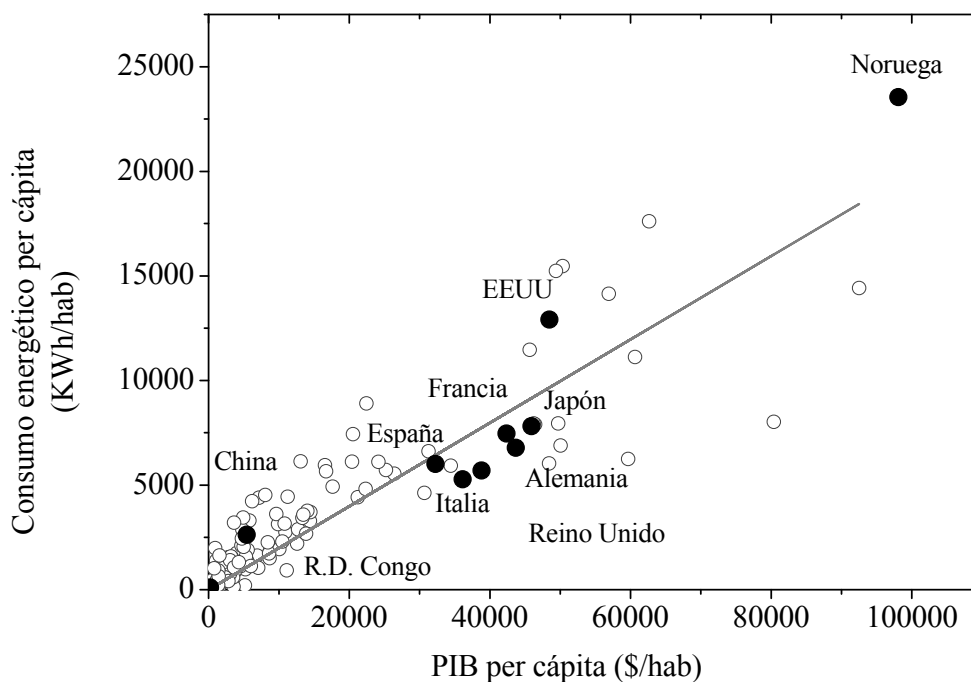


FIGURA 1.2. Consumo de energía per cápita frente al PIB per cápita. Datos de 2011
(International Energy Agency Office, 2012)

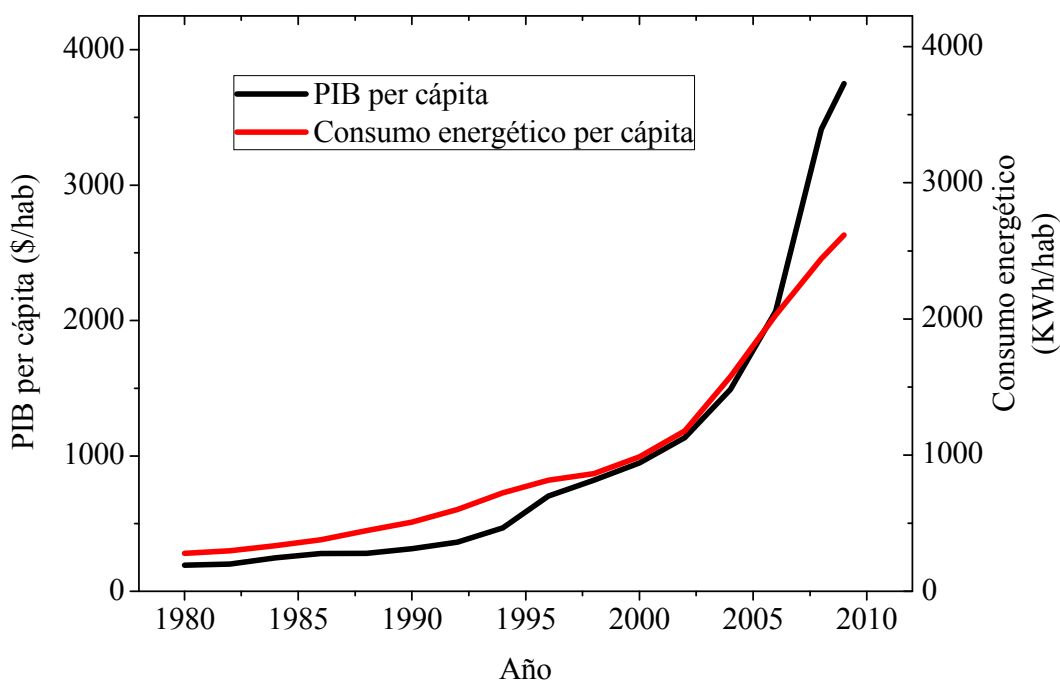


FIGURA 1.3. Evolución del PIB y del consumo energético per cápita en China desde 1980
(Banco Mundial, 2012)

Las perspectivas futuras son difíciles de identificar, los problemas a los que hay que enfrentarse están ligados tanto a la limitada disponibilidad de los combustibles fósiles como al aumento de la contaminación que generan. La energía nuclear puede ser una alternativa cuando se solucionen los problemas asociados a la seguridad, al tratamiento de los residuos radiactivos y a una opinión pública que en ciertos países es muy contraria a su utilización. Las energías renovables son, bajo determinadas circunstancias, económicamente viables y no hay razón para pensar que en un futuro, y gracias a los avances tecnológicos, no tengan un papel importante en el suministro energético. Sin embargo, no parece probable que en un futuro próximo finalice la dependencia energética de los combustibles fósiles; por ello, junto con el desarrollo de nuevas fuentes energéticas limpias y renovables hay que seguir aportando soluciones tecnológicas que hagan de los combustibles fósiles una fuente de energía más sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

En esta línea se enmarcan algunas políticas energéticas, como la denominada política 450, con la que se pretende fijar en 450 ppm la concentración de CO₂ atmosférico (la concentración actual ronda las 1000 ppm). En la Figura 1.4 se muestra la predicción del suministro energético de distintas fuentes para adaptar la política 450; en ella se observa como, si bien la dependencia de los combustibles fósiles debe disminuir, para el año 2035 el 34 % de la electricidad producida aún provendría de dichos combustibles, siendo todavía la fuente de energía más empleada.

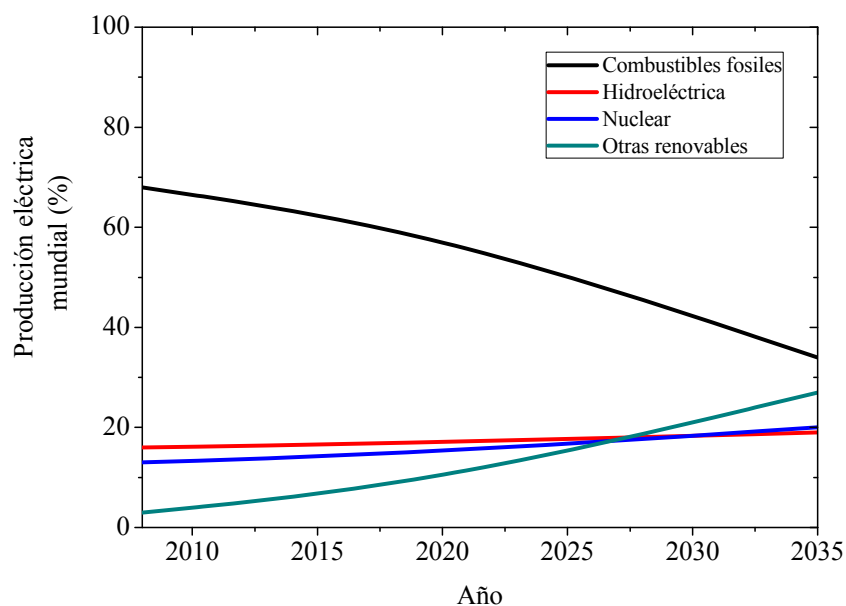


FIGURA 1.4. Producción eléctrica mundial según su fuente para cumplir con la política 450 en el año 2035 (World Energy Outlook, 2010)

1.1. LOS COMBUSTIBLES FÓSILES

Los combustibles fósiles son una fuente de energía no renovable que se obtiene a partir de la descomposición, sedimentación y transformación de materia orgánica. Están formados principalmente por hidrocarburos y se dividen en tres grandes grupos: petróleo, carbón y gas natural. Se forman por la degradación de los **hidratos de carbono** que, a su vez, se producen por medio de la fotosíntesis, que transforma la energía solar en energía química. Los hidratos de carbono producidos pasan a formar parte así de la materia orgánica.

La deposición de materia orgánica en los fondos oceánicos hace que los hidratos de carbono presentes en ella sean degradados por microorganismos anaerobios, eliminándose en el proceso la mayoría del oxígeno y nitrógeno. Cuando los sedimentos se entierran a mayor profundidad aumentan la presión y la temperatura, liberándose una gran cantidad de metano (el principal componente del **gas natural**) y produciéndose hidrocarburos ligeros que se acumulan en bolsas formando así el **petróleo**.

El **carbón**, tercer tipo de combustible fósil, tiene un origen terrestre debido a los restos de materia vegetal. Las plantas madereras se componen fundamentalmente de celulosa y lignina, mientras que la celulosa se oxida fácilmente por bacterias, la lignina, debido a su estructura y composición, es más resistente a esta degradación. Con el tiempo, los depósitos de lignina fueron enterrándose, aumentando así la presión y la temperatura, y formándose el carbón que, en función de su grado de carbonificación, se clasifica en *turba*, *lignito*, *sub-bituminoso*, *bituminoso* y *antracita*.

El petróleo

El petróleo es un líquido oleaginoso, menos denso que el agua ($0,75-0,95 \text{ g/cm}^3$) y de color variable de incoloro a negro que se encuentra en la naturaleza en bolsas aisladas por rocas sedimentarias de gran porosidad. Se entiende por petróleo crudo su forma natural no refinada, consistente en una mezcla compleja de hidrocarburos. Los compuestos que forman el crudo se encuentran principalmente en estado líquido aunque también aparecen aceites volátiles e hidrocarburos gaseosos a altas presiones (metano, acetileno y butano, principalmente). La composición elemental del petróleo se muestra en la Tabla 1.1. La unidad de referencia empleada por la industria para medir la cantidad de crudo es el *barril de petróleo*, que equivale a 158,99 L.

TABLA 1.1. Composición elemental típica del petróleo (Ramos, 1997)

Elemento	Proporción (%)
Carbono	84-87
Hidrógeno	11-14
Azufre	0-8
Oxígeno	0-1,8
Nitrógeno	0-1,6
Otros	Trazas

Las reservas de petróleo son depósitos identificados de los que se puede extraer el petróleo de forma rentable aplicando las tecnologías disponibles. La Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) posee el 75% de las reservas mundiales de petróleo y realiza el 51% de las exportaciones. Si se representan las reservas de petróleo por zonas geoeconómicas (Figura 1.5) se observa que prácticamente la mitad de las reservas (48.1%) están en Oriente Medio, seguido por Centroamérica-Sudamérica con un 19.7% de las reservas. Estimar la duración de las reservas petrolíferas no es sencillo, tanto el consumo como las reservas probadas aumentan año a año (Figura 1.6). Puede considerarse que el consumo seguirá aumentando de una manera similar a la de los últimos años, sin embargo, para las reservas probadas de crudo no puede estimarse de manera segura cuál será su evolución en los próximos años.

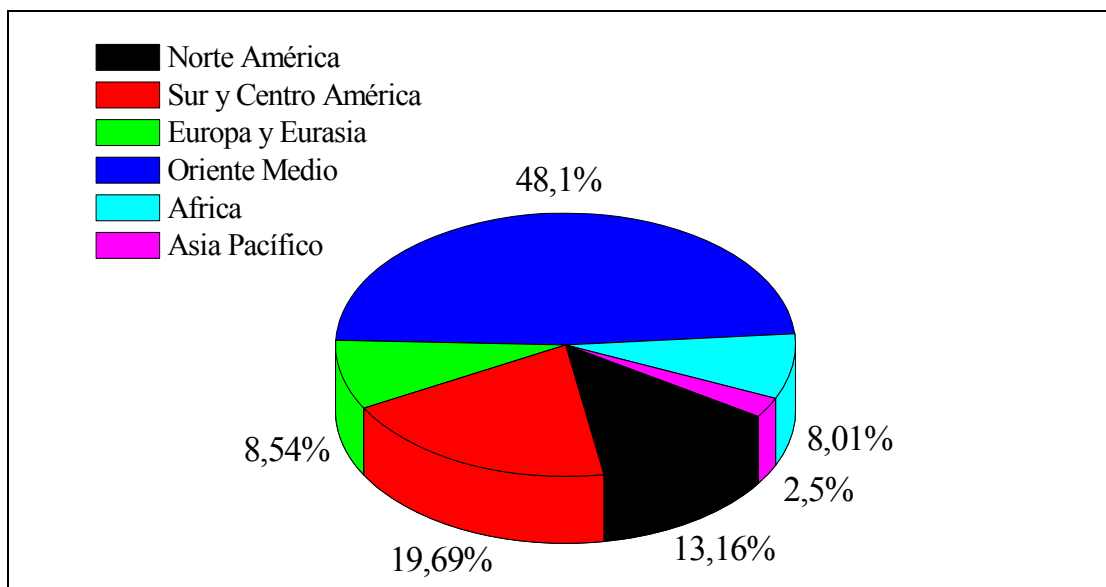


FIGURA 1.5. Reservas mundiales probadas de petróleo en función de las zonas geopolíticas (BP Statistical Review of World Energy, 2012)

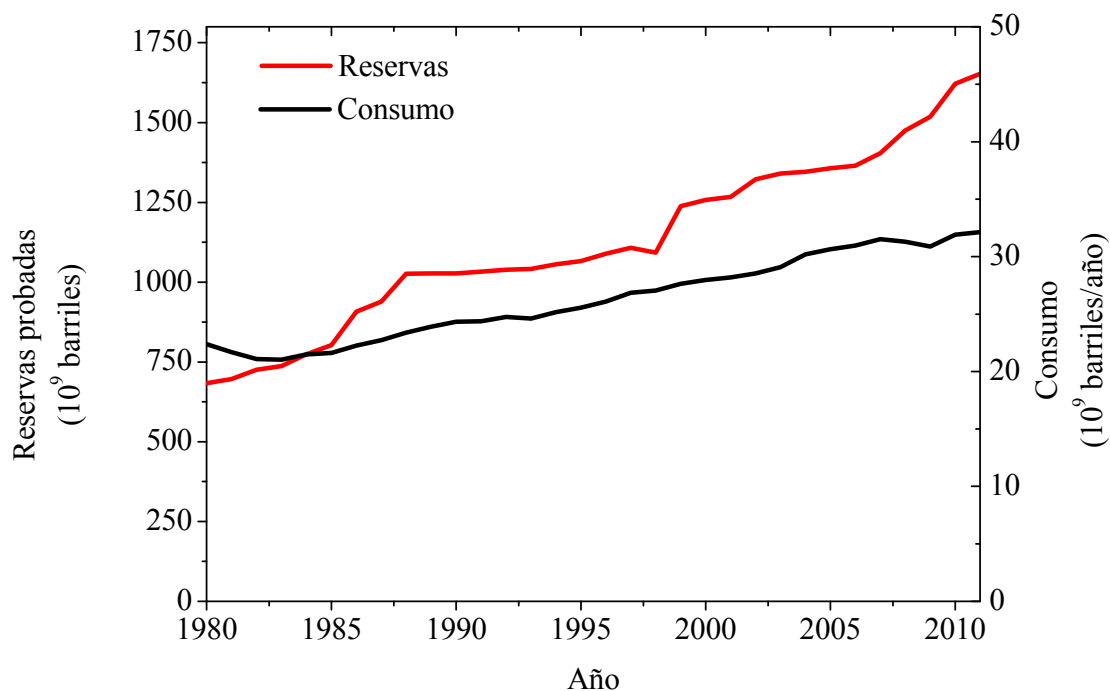


FIGURA 1.6. *Evolución del consumo mundial de crudo y de las reservas probadas desde 1980 (BP Statistical Review of World Energy, 2012)*

Tratamiento industrial del petróleo

Se puede dividir el tratamiento industrial del petróleo en tres grandes fases que a su vez constan de diversas operaciones y procesos:

Procesos upstream

Engloban la **prospección** (estudio geológico del terreno y el subsuelo), el **sondeo** (perforación de pozos de evaluación para determinar la extensión y características del yacimiento) y la **extracción** de crudo empleando técnicas de perforación y estabilización.

Procesos midstream

El petróleo extraído se **transporta** principalmente por medio de dos sistemas: barcos petroleros y oleoductos. El **almacenamiento** del crudo puede realizarse de varias formas: en los puntos de embarque y desembarque de petroleros, en zonas de almacenamiento especiales de los oleoductos o en los depósitos de las refinerías.

Procesos downstream

Estos procesos comienzan con el **refino** del crudo estabilizado, el término refino se aplica a todos los procesos que se llevan a cabo en las refinerías. Los objetivos principales de las refinerías son los siguientes:

- *Separar* el crudo en las distintas fracciones de acuerdo con las necesidades del mercado mediante la **destilación fraccionada**.
- *Convertir* las fracciones de menor demanda en el mercado en otras de mayor demanda mediante el **craqueo catalítico**.
- *Modificar* las estructuras de las cadenas carbonadas de ciertas fracciones para elevar su calidad como carburante mediante el **reformado catalítico**.
- *Depurar* los productos obtenidos eliminando los compuestos indeseables mediante el **refino final**.

En la Tabla 1.2 se puede observar la diferencia que existe entre las zonas con mayores reservas y las zonas con mayor capacidad de refino. Es significativo que mientras que Oriente Medio dispone del 48,10% de las reservas mundiales de crudo, sólo tiene capacidad para refinar un 8,61%; en el otro extremo, Asia-Pacífico únicamente dispone del 2,10% del petróleo pero tiene una capacidad de refino del 31,33% del petróleo mundial. Estas cifras pueden dar una idea del flujo de importaciones-exportaciones del petróleo crudo.

El **fraccionamiento** del petróleo permite separar los hidrocarburos en base a las diferencias de volatilidad, las fracciones obtenidas se muestran en la Tabla 1.3. Un diagrama simplificado de la instalación se muestra en la Figura 1.7.

TABLA 1.2. Porcentaje de las reservas mundiales de crudo y capacidad de refino para las distintas zonas geopolíticas (BP Statistical Review of World Energy, 2012)

Zonas geopolíticas	Reservas de crudo (%)	Capacidad de refino (%)
Norte América	13,16	22,99
Sur y Centro América	19,69	7,09
Europa y Eurasia	8,54	26,42
Oriente Medio	48,10	8,60
África	8,01	3,57
Asia-Pacífico	2,50	31,33

TABLA 1.3. Fracciones obtenidas en la refinería por orden de volatilidad y longitud de las cadenas carbonadas (Ramos, 1997)

	Producto	Intervalo T ^a ebullición	Longitud de cadena carbonada	Aplicaciones
Fracciones ligeras	Gas de refinería (GLP)	< 20 °C	C ₁ – C ₄	Combustible refinería Calefacción
	Gasolina directa	40-150 °C	C ₅ – C ₉	Carburante automóviles
	Nafta pesada	150-200 °C	C ₁₀ – C ₁₂	Materia prima para productos químicos
Fracciones medias	Queroseno	170-250 °C	C ₁₃ – C ₁₇	Alumbrado Carburante aviones
	Gas-oil	250-320 °C	C ₁₇ – C ₂₀	Carburante Diesel Calefacción
Fracciones pesadas	Fuel-oil	340-500 °C	C ₂₀ – C ₃₅	Combustible para barcos y locomotoras Materia prima para productos químicos
	Asfaltos	> 500 °C	> C ₃₅	Pavimentaciones

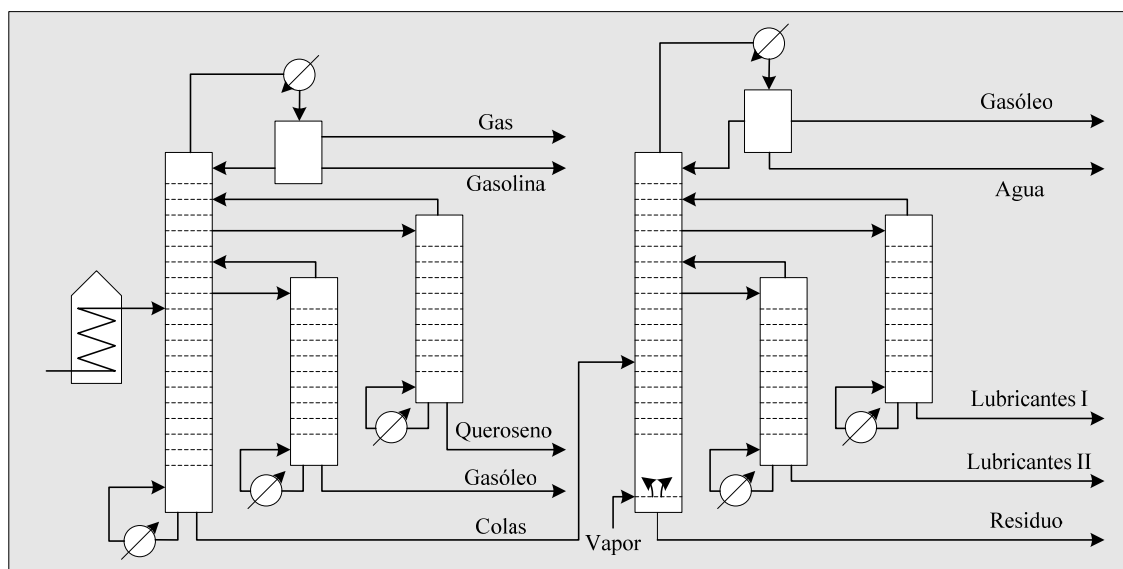


FIGURA 1.7. Esquema del fraccionamiento por volatilidad del crudo estabilizado

Las modificaciones estructurales de las fracciones obtenidas tras la destilación fraccionada tienen como objetivo elevar el valor añadido de los productos. El **craqueo** (térmico o catalítico) trata de convertir las fracciones más pesadas de la destilación en fracciones ligeras y aumentar así la cantidad de gasolina producida, que es el producto

más demandado por el mercado. El **reformado** se utiliza para elevar la calidad carburante de la gasolina y su poder antidetonante, o índice de octano.

Los procesos de **depuración** tienen como objetivo fundamental eliminar los compuestos azufrados y se dividen en tres tratamientos:

- *Hidrotratamiento*. Consiste en una hidrogenación catalítica a presión. Este proceso se estudiará con más detenimiento en el Apartado 1.3.
- *Refino químico*. Se efectúa sobre las fracciones lubricantes y consiste en un tratamiento con ácido sulfúrico con el que muchas impurezas precipitan o se disuelven en la fase ácida y un lavado cáustico que neutraliza el ácido remanente.
- *Refino físico*. Se aplica a las fracciones más pesadas. Su objetivo es variable: separar las fracciones de parafina perjudiciales para la fluidez del lubricante (desparafinado), separar las materias asfálticas para evitar la aparición de residuos sólidos (desasfaltado) y eliminar los hidrocarburos no aptos para la lubricación (extracción con disolventes).

1.2. COMPUESTOS de AZUFRE en COMBUSTIBLES FÓSILES

La contaminación atmosférica puede definirse como la impurificación de la atmósfera por inyección y permanencia temporal en ella de materias gaseosas, líquidas o sólidas o radiaciones ajenas a su comportamiento natural o en proporción superior a aquella (Orozco y col., 2003). Las causas de la contaminación del aire pueden ser naturales (erupciones volcánicas, meteoritos, fuegos, etc.) o antropogénicas (provocadas por la actividad humana como se muestra en la Tabla 1.4). Aunque muchos de los contaminantes tienen un origen natural, la contaminación antropogénica tiene unas características que la hacen de suma importancia:

- Es una contaminación localizada en puntos geográficos concretos en los que la proporción del contaminante es elevada.
- Los puntos geográficos en los que se produce la contaminación antropogénica no suelen disponer de sumideros naturales para su eliminación (especies vegetales, suelos o algas marinas).
- Su variedad y naturaleza provocan la aparición de compuestos que no existen en la composición natural del aire, como los CFC.

TABLA 1.4. Fuentes de emisión y toxicidades de los principales contaminantes atmosféricos
(Kiely, 2003)

Contaminante	Fuente	Toxicidad
CO	Transporte	Envenenamiento de la sangre
NO _x	Combustión a alta temperatura	Irritante
COV	Smog fotoquímico	Carcinógeno
SO _x	Combustión de compuestos azufrados	Diversos (embolia pulmonar)
O ₃	Radiación solar en presencia de NO ₂ y O ₂	Irritación, congestión pulmonar
NH ₃	Agricultura, ganadería, pesca	Daños en vías respiratorias
Gases Invernadero	Combustión, transporte, tratamiento de residuos, agricultura y ganadería	Calentamiento atmosférico, desequilibrio climático

Emisiones de óxidos de azufre

Los óxidos de azufre engloban al dióxido, SO₂, y al trióxido de azufre, SO₃. Las mayores emisiones son de SO₂ mientras que el SO₃ representa en torno al 1-2% del total, esto es debido a que a altas temperaturas (o a bajas temperaturas en presencia de un catalizador) el trióxido es inestable, desplazándose el equilibrio hacia el dióxido.

La relación entre las emisiones naturales y antropogénicas de azufre es difícil de determinar con exactitud debido a que la mayor fuente natural de emisión son las erupciones volcánicas, y éstas son ocasionales y puntuales, por lo que pueden desestabilizar las estimaciones (Georgoulas y col., 2009). De manera aproximada, puede estimarse que el 25 % de las emisiones totales de SO₂ son de origen natural (Finlayson-Pitts y Pitts, 2000). La principal fuente de emisión antropogénica es la producción de energía eléctrica y térmica, seguida de las actividades industriales y de construcción, como se puede observar en la Figura 1.8.

En la Figura 1.9 se muestra la evolución con el tiempo de las emisiones de SO₂; se observa que durante los años 1970-90 las emisiones se estabilizaron para comenzar a disminuir a partir de 1990. A partir del año 2000, las emisiones volvieron a aumentar debido a la masiva industrialización de los países del sudeste asiático, principalmente de China.

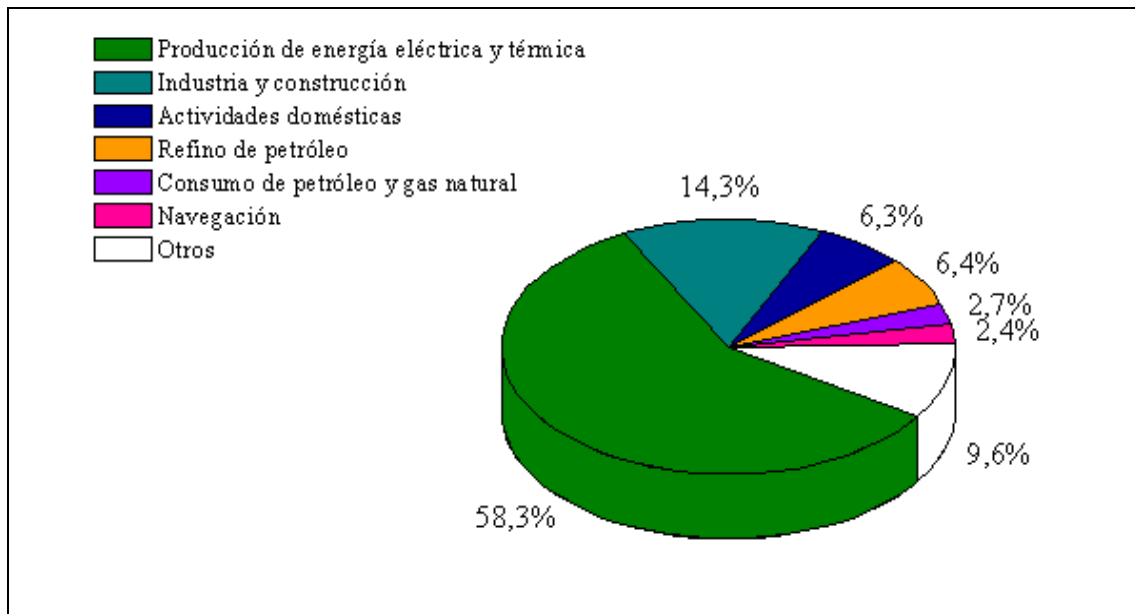


FIGURA 1.8. *Contribución de las diferentes actividades humanas a la generación de óxidos de azufre antropogénico (European Environment Agency, 2008)*

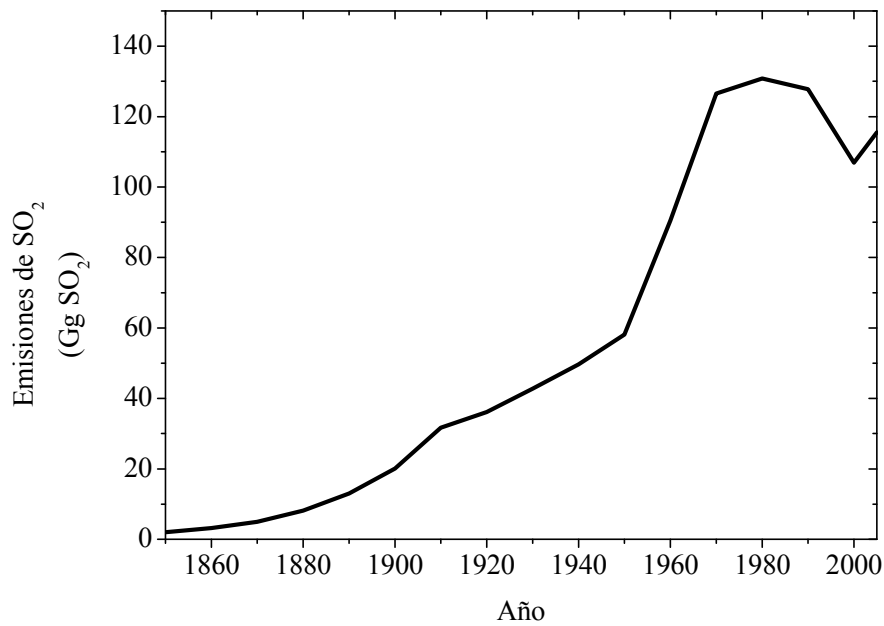


FIGURA 1.9. *Evolución de las emisiones mundiales de SO₂ debidas a fuentes antropogénicas (Smith y col., 2011)*

Efectos de las emisiones de óxidos de azufre

Sobre el medio ambiente

El principal efecto de los óxidos de azufre (junto con los de nitrógeno) es el derivado de su transformación en agentes causantes de la **lluvia ácida**. El SO₂ emitido se puede transformar en SO₃ en la atmósfera debido a la acción de radicales OH⁻, al ozono o a reacciones fotocatalíticas (Castillo y col., 2007). La mezcla de SO₃ con vapor de agua produce ácido sulfúrico en forma de pequeñas gotas que caen a la tierra. En condiciones naturales, los ácidos formados no tienen especial relevancia en el pH de la lluvia, pero con el aumento de las actividades humanas se forman focos puntuales de emisión produciendo un descenso del pH. Por otra parte, el viento puede arrastrar los ácidos formados hasta distancias mayores, por lo que el problema no se reduce a las inmediaciones del foco emisor.

Los efectos que la lluvia ácida produce sobre los **ecosistemas** son diversos (Schindler, 1988). Por una parte, se produce una *disminución del pH de lagos y ríos* que se traduce en una disminución de la vida acuática. Por otra parte, el *aumento de la acidez de los suelos* provoca cambios en su composición, se produce una lixiviación de nutrientes fundamentales para las plantas (calcio, magnesio y potasio) y una movilización de metales pesados que pueden incorporarse al agua, y con ella, a la cadena alimentaria. La *exposición directa* a la lluvia ácida provoca daños en la vegetación. Otro efecto que tiene la lluvia ácida es el que produce sobre los **materiales**. Principalmente se trata del *aumento de la velocidad de corrosión de los metales* (una pequeña disminución del pH hace que la velocidad de corrosión aumente de manera espectacular) y del *deterioro de materiales pétreos (mal de la piedra)*, debido a la formación de sulfato cálcico hidratado, más voluminoso que el carbonato cálcico original y que ocasiona problemas de desconchamiento, desintegración, recristalización de la caliza, exfoliación de materiales pulidos, etc.

Sobre la salud humana

Los efectos más perjudiciales son los producidos por aerosoles de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico irrita la región pulmonar, bloqueando los conductos respiratorios, pudiendo ocasionar daños irreversibles en el sistema respiratorio. El efecto parece ser acumulativo, aumentando el riesgo cardiopulmonar con el tiempo de exposición (Pope y col., 2002).

Contenido de azufre en combustibles fósiles

Debido a su origen biológico, los combustibles fósiles tienen una composición muy compleja, incluyendo diferentes compuestos azufrados; de la misma manera, el contenido en azufre varía según el origen del combustible. El carbón tiene un contenido en peso de azufre de entre el 5 y el 11% (Monticello y Finnerty, 1985). El gas natural tiene un contenido en azufre muy bajo, normalmente inferior a las 50 ppm (Lee y col., 2005) mientras que uno de sus derivados, el gas agrio, tiene un contenido en azufre, en forma de hidróxido de azufre, superior al 5% en volumen (Sun y Chen, 2003).

En el petróleo, el azufre es el tercer elemento más abundante tras el carbono y el hidrógeno (Kropp y Fedorak, 1998), y su contenido se encuentra entre el 0,03 y el 7,89% en peso (Mohebali y Ball, 2008). En la Tabla 1.5 se muestra el contenido de azufre del crudo en varias regiones del mundo.

El azufre puede encontrarse en forma de compuestos inorgánicos (pirita y sulfuro de hidrógeno) u orgánicos. Los compuestos orgánicos azufrados presentes en el petróleo son, en su mayoría, formas aromáticas o saturadas de tioles, sulfuros y heterociclos, como se puede observar en la Figura 1.10 (Kropp y Fedorak, 1998).

En los productos de la refinería, el contenido en azufre es mayor cuanto más pesada es la fracción obtenida, variando desde el 0,02% en las gasolinas más ligeras hasta casi el 3% en los asfaltos (Javadli y de Klerk, 2012). El gasóleo, debido a su alto contenido en azufre (en torno al 2%) y a su masiva utilización es la fracción a la que más atención se le está prestando, limitando mundialmente su contenido en azufre y desarrollándose numerosas tecnologías para conseguir estas restricciones.

TABLA 1.5. Contenido en azufre del crudo según su procedencia (ICCT, 2011)

Región	Contenido en azufre (% en peso)
Oriente Medio	1,75
América Latina	1,59
Norteamérica	1,21
Commonwealth	1,09
Europa	0,37
África	0,31
Asia-Pacífico	0,16
Media mundial	1,10

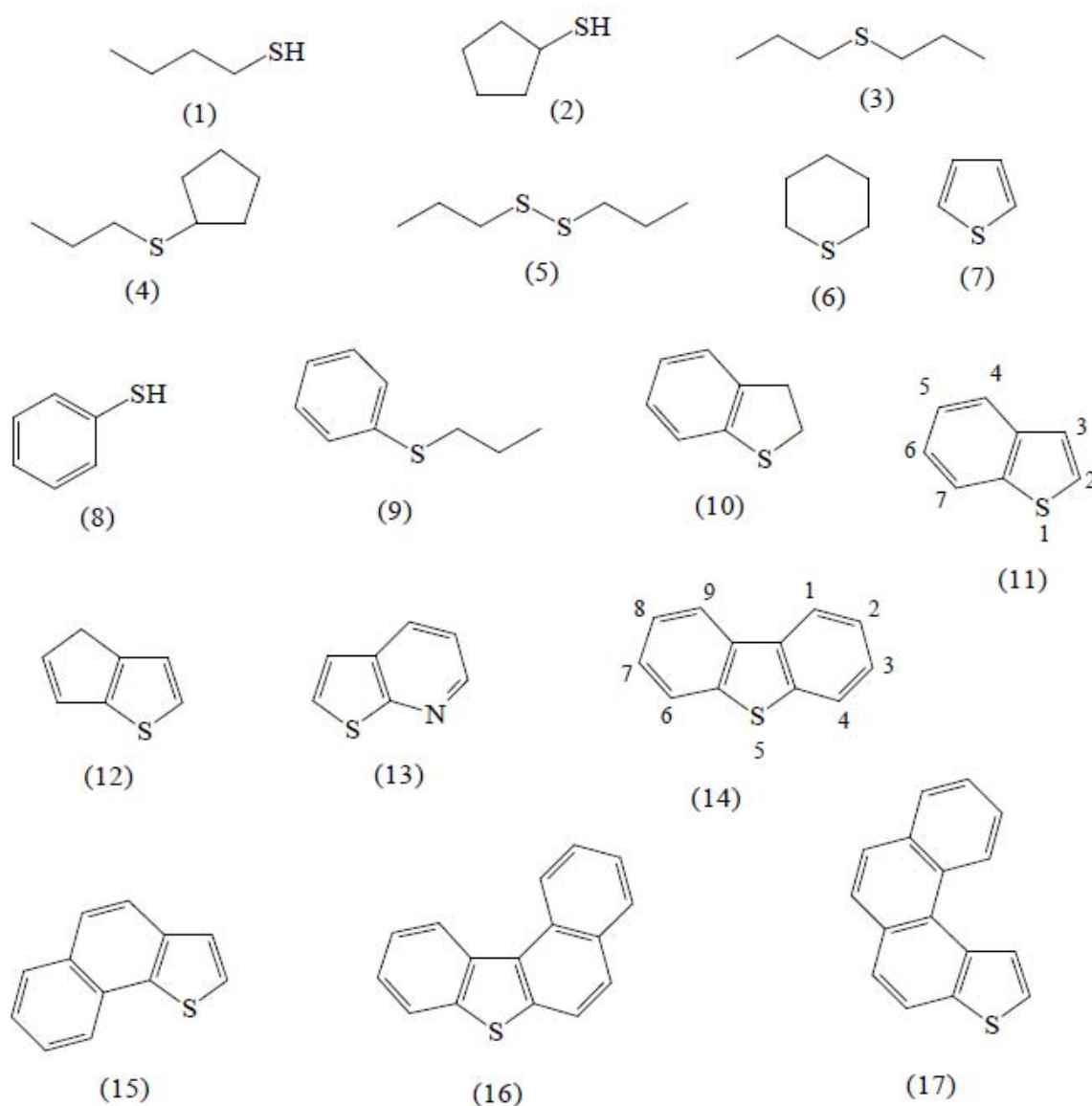


FIGURA 1.10. Estructuras representativas de los distintos compuestos azufrados presentes en el petróleo: (1) alcano tioles; (2) cicloalcanos tioles; (3) sulfuros dialquílicos; (4) sulfuros alquil-cicloalquílicos; (5) polisulfuros; (6) sulfuros cíclicos; (7) tiofenos; (8) areno tioles; (9) sulfuros aril-alquílicos; (10) tiaindanos (11) benzotiofenos; (12) tienotiofenos; (13) tienopiridinas; (14) dibenzotiofenos; (15) naftotiofenos; (16) benzonaftotiofenos; (17) fenantrotiofenos

Legislación referente a las emisiones de azufre

Debido a los problemas asociados a la emisión de óxidos de azufre, el contenido de azufre en la gasolina y el gas-óleo está siendo limitado de manera cada vez más restrictiva por los diferentes Estados (Monticello, 2000; Le Borgne y Quintero, 2003;). Si en los años 70 el contenido de azufre podía superar 10.000 ppm, hoy la tendencia es la producción de combustibles con unos niveles de azufre inferiores a 50 ppm (Stanislaus y col., 2010). En Europa, la secuencia de las principales normativas que afectan al contenido de azufre en los combustibles se muestra a continuación:

- La Directiva 93/12/CEE limitó el contenido de azufre en combustibles para automóviles al 0,2% en peso para 1994, debiéndose llegar al 0,05% en 1996.
- La Directiva 94/12/CEE establece medidas concretas que deben adoptarse contra la contaminación atmosférica causada por las emisiones de los vehículos a motor.
- La Directiva 96/62/CE establece los primeros objetivos, criterios y métodos para un sistema de evaluación y gestión de la calidad del aire.
- La Directiva 98/70/CE limita el contenido de azufre en gasóleo a 50 ppm a partir del 1 de enero de 2000.
- La Directiva 2003/17/CE modifica la directiva anterior y dispone que en los Estados Miembros el combustible diésel debe tener un contenido máximo de azufre de 10 ppm a partir del 1 de enero de 2005.
- La Directiva 2009/30/CE, que actualmente se encuentra en vigor, modificó la Directiva anterior no en cuanto al contenido en azufre en el gasóleo (se sigue fijando en 10 ppm), sino que cambia la fecha de implantación al 1 de enero de 2011.

En otras naciones se han seguido políticas similares de reducción de azufre en gasóleo. En 2001, Estados Unidos fijó una reducción del contenido en azufre en combustible diésel de 500 ppm a 15 ppm en el periodo 2006-2010 (EPA, 2001). En Japón, el contenido en azufre pasó de 500 ppm a 50 ppm entre 1997 y 2004 (Nemoto, 2002). En la Tabla 1.6 se muestran las limitaciones en el contenido de azufre en gasóleo para varios países (Stanislaus y col., 2010).

TABLA 1.6. Límites en el contenido en azufre en combustible diesel en varios países

Región	País	Contenido en azufre (ppm)	Año de implantación
Norteamérica	Estados Unidos	15	2010
	Canadá	15	2010
Sudamérica	Brasil	50	2009
	Chile	50	2010
	México	15	2009
	Perú	50	2010
Asia Pacífico	Japón	50	2004
	China	50	2012
	Hong Kong	50	2007
	India	50	2010
	Taiwán	50	2007
	Australia	10	2009
Oriente Próximo	Kuwait	50	2010
	Arabia Saudí	10	2013
	Catar	10	2010
	Emiratos Árabes	10	2010
	Bahrein	10	2013
	Irán	50	2008
	Rusia	50	2010
Unión Europea	-	10	2011

1.3. SOLUCIONES TECNOLÓGICAS para la REDUCCIÓN de AZUFRE en COMBUSTIBLES FÓSILES

Como se ha comentado en el apartado 1.2, la necesidad de reducir las emisiones de óxidos de azufre, fundamentalmente las derivadas de los motores diésel, ha llevado a establecer límites en el contenido de azufre en este tipo de combustibles. En consecuencia, se ha impulsado enormemente la investigación en la producción de combustible diésel con bajo contenido en azufre (ULSD: *Ultra Low Sulfur Diesel*) (Stanislaus y col., 2010). Las plantas de tratamiento de gasóleo tienen que enfrentarse a

dos importantes problemas (Stanislaus y col., 2010). Por una parte, el aumento progresivo del mercado de combustibles y, por otra parte, la disminución en la calidad de las corrientes de crudo y de gasóleo. Las diferentes tecnologías propuestas se pueden clasificar según estén basadas en la descomposición química de los compuestos azufrados, en operaciones de separación y transformación de estos compuestos azufrados (Babich y Moulijn, 2003), o en el empleo de sistemas biológicos con capacidad desulfurante. En el primer grupo se encuentran las técnicas basadas en el proceso tradicional de hidrodesulfuración (HDS); en el segundo grupo se encuentran otras tecnologías basadas en métodos fisico-químicos, tales como la desulfuración oxidativa, extractiva, o por adsorción; el tercer grupo lo forman los procesos de biodesulfuración (BDS), tecnologías que emplean microorganismos, extractos celulares o enzimas para la eliminación del azufre (de Ranson y Rivas, 1999; Setti y col., 1997). A continuación se tratan brevemente los aspectos más importantes de cada una de las tecnologías mencionadas.

Hidrodesulfuración

La HDS es la tecnología más empleada actualmente para la eliminación del azufre del gasóleo y de otras fracciones petrolíferas (Javadli y de Klerk, 2012). Se trata de una hidrogenación catalítica a alta presión (10-15 atm) y temperatura (200-450 °C), que transforma los compuestos azufrados en H₂S e hidrocarburos empleando catalizadores de CoMo/Al₂O₃ y NiMo/Al₂O₃ (McFarland, 1999).

La producción de combustible diésel con un contenido en azufre tan bajo como requieren las especificaciones legales representa el mayor desafío económico y operacional de la industria de la HDS (Breyse y col., 2003). El principal problema al que se tiene que enfrentar la HDS es el desarrollo de catalizadores que aumenten la reactividad de determinados compuestos azufrados, minimizando la inhibición por compuestos tales como el H₂S, óxidos de nitrógeno y compuestos aromáticos (Fujikawa, 2009; Ma y col., 1994; Farag y col., 2003; Liu y col., 2008).

Los compuestos más recalcitrantes a la HDS son el tiofeno y sus derivados (Ohshiro e Izumi, 1999; Soleimani y col., 2007); los más representativos se muestran en la Figura 1.11. La reactividad de los derivados tiofénicos disminuye al aumentar el punto de ebullición, siendo los más difíciles de eliminar por medio de la HDS tradicional el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados alquilados (Ma y col., 1994). El mecanismo de reacción para la eliminación del DBT consta de dos rutas paralelas

(Stanislaus y col., 2010); la primera ruta (desulfuración directa) produce bifenilo, mientras que la segunda ruta implica la hidrogenación de uno de los anillos bencénicos para dar lugar a ciclohexilbenceno. En función de su naturaleza, el compuesto azufrado tendrá mayor afinidad por una u otra ruta (Michaud y col., 1998).

Los catalizadores convencionales (Co-Mo y Ni-Mo) no tienen la suficiente actividad para llegar a los límites legales establecidos (Stanislaus y col., 2010). Debido a las severas condiciones de operación requeridas, los catalizadores se desactivan rápidamente. Al trabajar a mayores presiones y temperaturas, la calidad del producto final también se resiente (Babich y Moulijn, 2003). Debido a esto se están desarrollando catalizadores más activos y estables que puedan trabajar en unas condiciones más suaves. Los últimos catalizadores desarrollados tienen una actividad tres veces superior a los catalizadores convencionales (Fujikawa y col., 2006) optimizando las especies activas, la selección del soporte y el método de preparación.

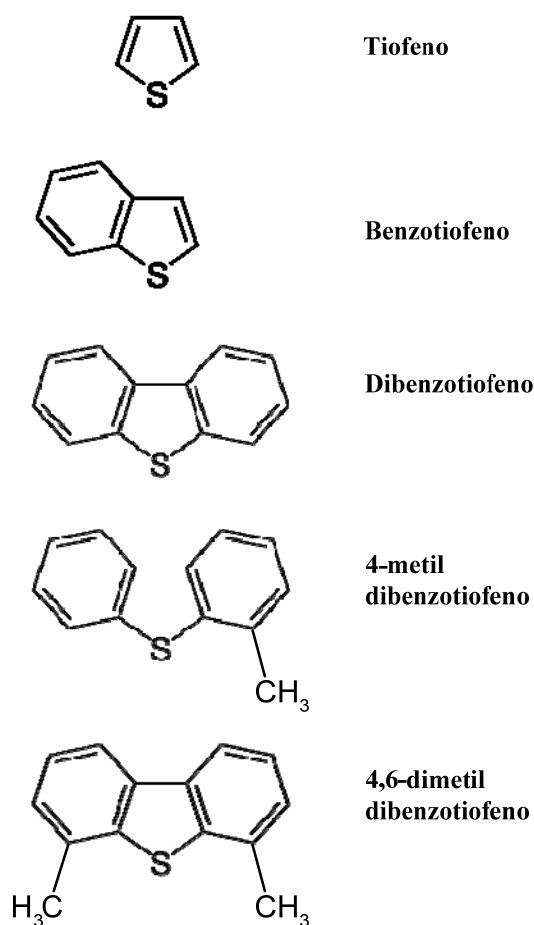


FIGURA 1.11. Estructura química del tiofeno y sus derivados más representativos

La HDS es un proceso bien conocido e implantado en las refinerías desde los años cincuenta (Brunet y col., 2005). Las nuevas limitaciones legales en el contenido de azufre han supuesto el mayor reto al que se haya enfrentado la HDS (Breysse y col., 2003). Las soluciones tecnológicas para que la HDS cumpla las especificaciones pasan por trabajar en unas condiciones de operación mucho más agresivas (mayores presiones y temperaturas), con el consiguiente aumento en los costes y la disminución de la calidad del producto (Soleimani y col., 2007), por el desarrollo de nuevos catalizadores que permitan trabajar en condiciones de operación más suaves manteniendo una alta actividad (Babich y Moulijn, 2003) o, por último, se pueden “duplicar” las instalaciones existentes. Esta última ha sido la solución adoptada mayoritariamente en la práctica. Las opciones anteriores suponen un gran aumento en los costes de operación, por ello también se está proponiendo la combinación de la HDS con otras tecnologías (entre las que se encuentra la biodesulfuración) que permitan disminuir el contenido de azufre con un coste menor y sin pérdida de calidad en el producto final (Stanislaus y col., 2010) y que se comentan brevemente a continuación.

Otras tecnologías complementarias a la HDS

En los últimos años, se han realizado grandes avances en la investigación y el desarrollo de tecnologías alternativas a la HDS. Para ello se emplean métodos químicos (desulfuración oxidativa y adsorción reactiva), físicos (adsorción física y desulfuración extractiva) y biológicos (biodesulfuración). Hasta la fecha, muy pocas de estas tecnologías han llegado a la fase de implantación industrial y ninguna de ellas se muestra como una alternativa clara para sustituir a la HDS. Los diseños actuales se centran en tratar la corriente producida en una primera etapa de HDS, evitando así las etapas que operan en condiciones más agresivas.

Desulfuración oxidativa

En el proceso de desulfuración oxidativa, los compuestos azufrados se oxidan a sus correspondientes sulfonas, que pueden ser eliminadas a continuación por extracción, adsorción, destilación o descomposición (García-Gutiérrez y col., 2008). Pueden utilizarse diferentes agentes oxidantes, tales como H_2O_2 , ozono, hipoclorito de *t*-butilo, etc. (Qian, 2008). Los catalizadores utilizados en el proceso pueden ser homogéneos (ácidos orgánicos, ácidos polioxometálicos y sus sales) o heterogéneos (metales de transición soportados en óxidos metálicos) (Stanislaus, 2010). La eficiencia de esta

tecnología no es muy alta (Babich y Moulijn, 2003), pero el empleo de nuevos catalizadores está mejorando en gran medida el proceso (Zhang y col., 2012).

Desulfuración por adsorción

La desulfuración por adsorción se basa en la capacidad de un sólido de adsorber selectivamente los compuestos organosulfurados. Pueden diferenciarse dos tipos de adsorción: física y reactiva (Stanislaus 2010). En el primer caso, los compuestos azufrados se eliminan por adsorción sin conversión en otro compuesto; los sólidos empleados son de varios tipos y pueden ser zeolitas, complejos de metales de transición soportados en materiales porosos, óxidos metálicos mixtos, carbón activo, etc. (Kim y col., 2006; Velu y col., 2003). En el caso de la adsorción reactiva, los compuestos sulfurados se convierten en H₂S, que es eliminado con un sólido adsorbente (Park y col., 2008). Se utilizan materiales que combinan el catalizador con el sólido adsorbente. El principal problema de la desulfuración por adsorción es la sobrecarga del adsorbente al tratar corrientes con elevado contenido en azufre. Los retos de esta tecnología están en la mejora de la capacidad de los adsorbentes y en el desarrollo de sistemas de adsorción reactiva (Babich y Moulijn, 2003).

Desulfuración extractiva

En la desulfuración extractiva se utilizan disolventes convencionales (acetona, etanol, polietilenglicol, etc.) o líquidos iónicos (cloroaluminato, hexafluorofosfato y tetrafluoroborato, principalmente) para extraer de forma selectiva los compuestos azufrados (Horii y col., 1996; Bosmann y col., 2001; Wilfred y col., 2012). Esta tecnología presenta las ventajas de su alta selectividad y la suavidad de sus condiciones de operación (Jess y Esser, 2005); sin embargo, la recuperación posterior de los líquidos iónicos y disolventes es un proceso complicado y caro (Soleimani y col., 2007).

Biodesulfuración

La biodesulfuración (BDS) consiste en el empleo de organismos vivos o partes de ellos para la eliminación del azufre aplicando las técnicas desarrolladas por la Biotecnología (Le Borgne y Quintero, 2003; Gupta y col., 2005). Existen varias rutas metabólicas mediante las cuales los microorganismos son capaces de eliminar compuestos azufrados recalcitrantes a la hidrosulfuración, como el dibenzotiofeno y sus derivados (Gupta y col., 2005). De todas ellas, la más interesante es la denominada ruta 4S, se trata de una ruta selectiva no destructiva que degrada el DBT a hidroxibifenilo (HBP) a través de cuatro reacciones consecutivas (Kilbane, 2006). La

ruta 4S se descubrió en la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGST8 (Kilbane y Jackowski, 1992) y desde entonces han sido muchos los biocatalizadores desarrollados y mejorados que son capaces de realizarla (Nuhu, 2012).

Debido a la alta selectividad de los microorganismos (Soleimani y col., 2007) y a los bajos requerimientos energéticos necesarios para su funcionamiento (Stanislaus y col., 2010), la BDS se encuentra entre las tecnologías más prometedoras para la producción de combustibles ULSD (Stanislaus y col., 2010; Srivastava, 2012). El estado de esta tecnología se describe en profundidad en el apartado siguiente.

1.4. BIODESULFURACIÓN

Como se comentó en el apartado anterior, la biodesulfuración consiste en el empleo de organismos vivos o partes de ellos para la eliminación del azufre; respecto de otras técnicas de eliminación de azufre, la biodesulfuración presenta varias ventajas (Le Borgne y Quintero, 2003; Gupta y col., 2005). En primer lugar, se trata de un proceso con bajo requerimiento energético debido a que se emplean condiciones suaves de presión y temperatura, el fluido de proceso es agua y no emplea hidrógeno (Stanislaus y col., 2010), lo que implica una menor emisión de gases de efecto invernadero que otras tecnologías (Monticello, 2000). Por otra parte, el empleo de microorganismos hace que se trate de un proceso muy selectivo, versátil y con una generación de subproductos muy baja y controlada (Van Hamme y col., 2003; Soleimani y col., 2007). Todos estos aspectos conllevan una reducción en costes de inmovilizado y operación que pueden llegar al 50 % y al 15 %, respectivamente (Javadli y de Klerk, 2012).

Sin embargo, la biodesulfuración presenta algunas desventajas. Las mezclas bifásicas (debidas al contacto directo entre el combustible, fase orgánica, y el medio de biodesulfuración, fase acuosa) usadas tradicionalmente en biodesulfuración presentan grandes problemas de transferencia de materia, separación de fases y separación y reutilización del biocatalizador (Setti y col., 1997; Stanislaus y col., 2010).

Los compuestos azufrados empleados en los estudios de BDS son el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados. Estos compuestos representan hasta el 90% del azufre del crudo fraccionado, como se muestra en la Tabla 1.7 y son los más difíciles de eliminar mediante la hidrosulfuración (Setti y col., 1997; McFarland, 1999; Stanislaus y col., 2010).

TABLA 1.7. Distribución del azufre presente en las distintas fracciones del petróleo fraccionado (Javadli y Klerk, 2012)

Intervalo T ^a (°C)	Azufre (%)	Distribución de compuestos azufrados (%)			
		Tioles	Sulfuros	Tiofenos	BT-DBT y derivados
70 – 180	0,02	50	50	-	-
160 – 240	0,2	25	25	35	15
230 – 350	0,9	15	15	35	35
350 – 550	1,8	5	5	30	60
> 550	2,9	-	-	10	90

El azufre es un elemento esencial para las bacterias, su contenido en peso seco se encuentra entre el 0,5 y el 1%, y requieren de este nutriente para su crecimiento y actividad biológica, ya que forma parte de cofactores, aminoácidos y proteínas (Soleimani y col., 2007; Kertesz, 1999).

La idea de utilizar microorganismos para eliminar el azufre de los combustibles aprovechando su metabolismo comienza a desarrollarse a mediados del siglo XX; las primeras patentes se publican a comienzos de la década de los cincuenta (Strawinski, 1950; ZoBell, 1953). Durante los años 70 y 80, se siguió investigando con nuevos microorganismos; sin embargo, los avances fueron escasos debido a que las bacterias descubiertas no eran apropiadas para el desarrollo de un proceso comercial y la legislación aún no apremiaba a disminuir el contenido de azufre en los combustibles (Ohshiro e Izumi, 1999). El punto de inflexión se produce en los años 90, con dos hechos significativos: el aumento en la preocupación por la contaminación por azufre y el descubrimiento de un nuevo microorganismo, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 que degrada DBT a HBP a través de una ruta no destructiva, sin afectar a la estructura carbonada (Kilbane, 1990). Estos dos hitos hicieron que a partir de los años 90 el estudio del proceso de biodesulfuración cobrara una elevada atención y experimentara un gran desarrollo.

Posibles rutas metabólicas

Las rutas metabólicas empleadas en biodesulfuración pueden clasificarse atendiendo a dos criterios, el empleo de oxígeno (rutas aerobias o anaerobias) y el mecanismo de ruptura de enlaces (ruptura oxidativa o reductiva, ruptura del enlace carbono-carbono o del enlace carbono-azufre) (Gupta y col., 2005).

Ruptura oxidativa del enlace C-C

Consiste en la oxidación parcial del compuesto azufrado sin afectar a los enlaces C-S para la obtención de productos solubles en agua. Las rutas metabólicas que rompen el enlace C-C se denominan rutas *destructivas* y, en este caso, al no eliminarse el azufre de la molécula de partida, se trata de una *degradación* y no de una *desulfuración* (Soleimani y col., 2007). Es una ruta **aerobia** y se conoce como Ruta Kodama (Kodama y col., 1970 y 1973). Los primeros microorganismos descubiertos que llevan a cabo esta ruta fueron *Pseudomonas jijani* y *Pseudomonas abikonesis* (Kodama y col., 1970). Posteriormente, han sido varias las especies descubiertas que metabolizan el DBT de la misma manera, como las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* ERC-8 (Hou y Laskin, 1976), *Beijerinckia sp.* y *Rhizobium melioli* (Frassinetti y col., 1998) o los hongos *Cunninghamella elegans* (Crawford y Gupta, 1999) y *Pleurotas ostreatus* (Bezalel y col., 1996).

Ruptura reductiva del enlace C-S

Algunas bacterias **anaerobias** del género *Desulfovibro* son capaces de eliminar el azufre de determinados compuestos orgánicos como el BT y el DBT (Kim y col., 1995), concretamente *Desulfovibro desulphicans* M6 convierte DBT en HBP y H₂S (Kim y col., 1990). Otras especies que también emplean esta ruta son *Desulfovibro longreachii* y *Desulfovibro escambium* (Yamada y col., 2001). También se ha investigado la BDS anaerobia empleando microorganismos termófilos con buenos resultados (Bahrami y col., 2001). En condiciones anaeróbicas, la generación de gomas, ácidos, compuestos coloreados y otros productos indeseables es mínima (McFarland, 1999). Sin embargo, el mantenimiento de un proceso anaeróbico es difícil y la actividad de los microorganismos utilizados actualmente es muy baja (Soleimani y col., 2007).

Ruptura oxidativa de los enlaces C-C y C-S

Algunos microorganismos son capaces de utilizar los compuestos orgánicos azufrados como fuente de carbono y de azufre. En esta ruta destructiva y **aerobia**, se elimina el azufre en forma de sulfato y se rompe la estructura carbonada. Son muy pocos los microorganismos conocidos que utilicen esta ruta, entre ellos se encuentran *Brevibacterium sp.* (Van Affender y col., 1990) y *Arthrobacter* DBTS2 (Sato y Clark., 1995).

Ruptura oxidativa del enlace C-S

Consiste en la eliminación del azufre de forma selectiva sin afectar la cadena carbonada. Se trata de una ruta **aerobia** y no destructiva que, debido a que mantiene el poder energético del combustible, ha concentrado el interés de las investigaciones en los últimos veinte años en detrimento del resto de rutas (Gupta y col., 2005). Esta ruta se conoce como ruta 4S, llevada a cabo por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Kilbani y Jackowski 1992; Gallagher y col., 1993) y que se describe con mayor detalle a continuación.

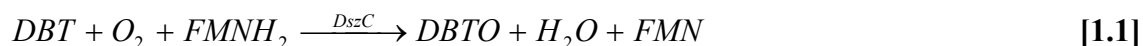
La ruta 4S

Con el objetivo de encontrar una ruta metabólica que eliminara el azufre sin afectar a la cadena carbonada, durante los años ochenta se aislaron multitud de cepas que no cumplieron las expectativas, pues todas ellas producían la ruptura del enlace C-C (Soleimani y col., 2007). En 1989, Kilbane propuso una hipotética ruta oxidativa que podría eliminar selectivamente el azufre del DBT (Kilbane, 1989). La ruta se denominó **Ruta 4S** e implicaba la oxidación consecutiva de DBT a sulfóxido (DBTO), sulfona (DBTO₂), sulfinato (HBPS) y la posterior desulfuración a hidroxibifenilo (HBP). Desde ese momento, se trató de aislar un microorganismo que empleara la ruta descrita por Kilbane, después de algunos intentos prometedores con *Brevibacterium sp.* DO (Van Afferder y col., 1990), el *Institute of Gas Technology* comenzó a buscar una bacteria que empleara la ruta 4S tanto por screening como utilizando mutaciones selectivas (Soleimani y col., 2007). Por fin, en 1990, se aisló la cepa *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, capaz de realizar de forma natural la ruta 4S (Kilbane y Jackowski, 1992).

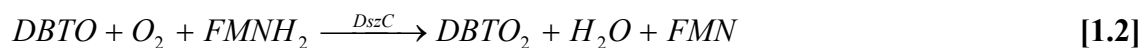
Como se ha indicado, la ruta 4S consiste en la transformación de DBT en 2-hidroxibenilo (HBP) por medio de cuatro reacciones en serie (Gallagher y col., 1993). En ella participan las enzimas DszA, DszB y DszC, codificadas respectivamente por los genes *dszA*, *dszB* y *dszC* (Gray y col., 1996), que forman parte del operón *dsz*, localizado en un plásmido de 120 kb de tamaño. Esta denominación sustituyó a la utilizada inicialmente que nombraba el operón *sox* (Denome y col., 1994). Para que la ruta 4S se lleve a cabo es necesario un aporte de poder reductor. La actividad de las enzimas DszA y DszC depende de la oxidación de NADH y FMNH₂, para lo que es necesario una enzima NADH:FMN oxidorreductasa que regenere el poder reductor (Ohshiro y col., 1994 y 1995); esta enzima se localizó en *Rhodococcus erythropolis*

IGTS8 y se denominó DszD (Xi y col., 1997). El esquema de reacción de la ruta 4S se representa en la Figura 1.12 y sus reacciones se detallan a continuación.

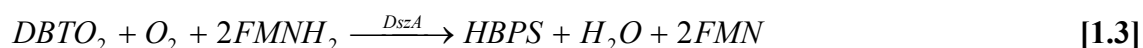
Primera reacción: oxidación de DBT a DBTO. Catalizada por la enzima DszC, proteína tetramérica de 180 kDa (Gray y col., 1996). Por cada molécula de DBT se requiere el aporte de una molécula de oxígeno y de la oxidación de una molécula de FMNH₂. Se produce en el proceso una molécula de DBTO, una de agua y una de FMN (Oldfield y col., 1997).



Segunda reacción: oxidación de DBTO a DBTO₂. Una de las excepcionalidades de la enzima DszC es que actúa en las dos primeras reacciones (Lei y Tu, 1996). El mecanismo es exactamente igual al descrito para la primera reacción.



Tercera reacción: oxidación de DBTO₂ a HBPS con apertura del anillo tiofénico y formación de hidroxifenilo. Catalizada por la enzima DszA, proteína dimérica de 100 kDa (Gray y col., 1996). Por cada molécula de DBTO₂ se requiere una molécula de oxígeno y dos de FMNH₂ para producir una molécula de HBPS, una de agua y dos de FMN.



Cuarta reacción: desulfuración de HBPS a HBP. Catalizada por la enzima DszB, proteína monomérica de 40 kDa (Gray y col., 1996). Por cada molécula de HBPS se requiere una molécula de agua y produce una molécula de HBP y una de SO₃²⁻ que vuelve a ser asimilado por la célula (BBD, 2007). Esta reacción no es FMNH₂ dependiente.



Aporte de poder reductor: La generación del FMNH₂ necesario para las tres primeras reacciones se obtiene a partir de NADH mediante la enzima DszD, proteína monomérica de 20 kDa (Xi y col., 1997), según la siguiente reacción:



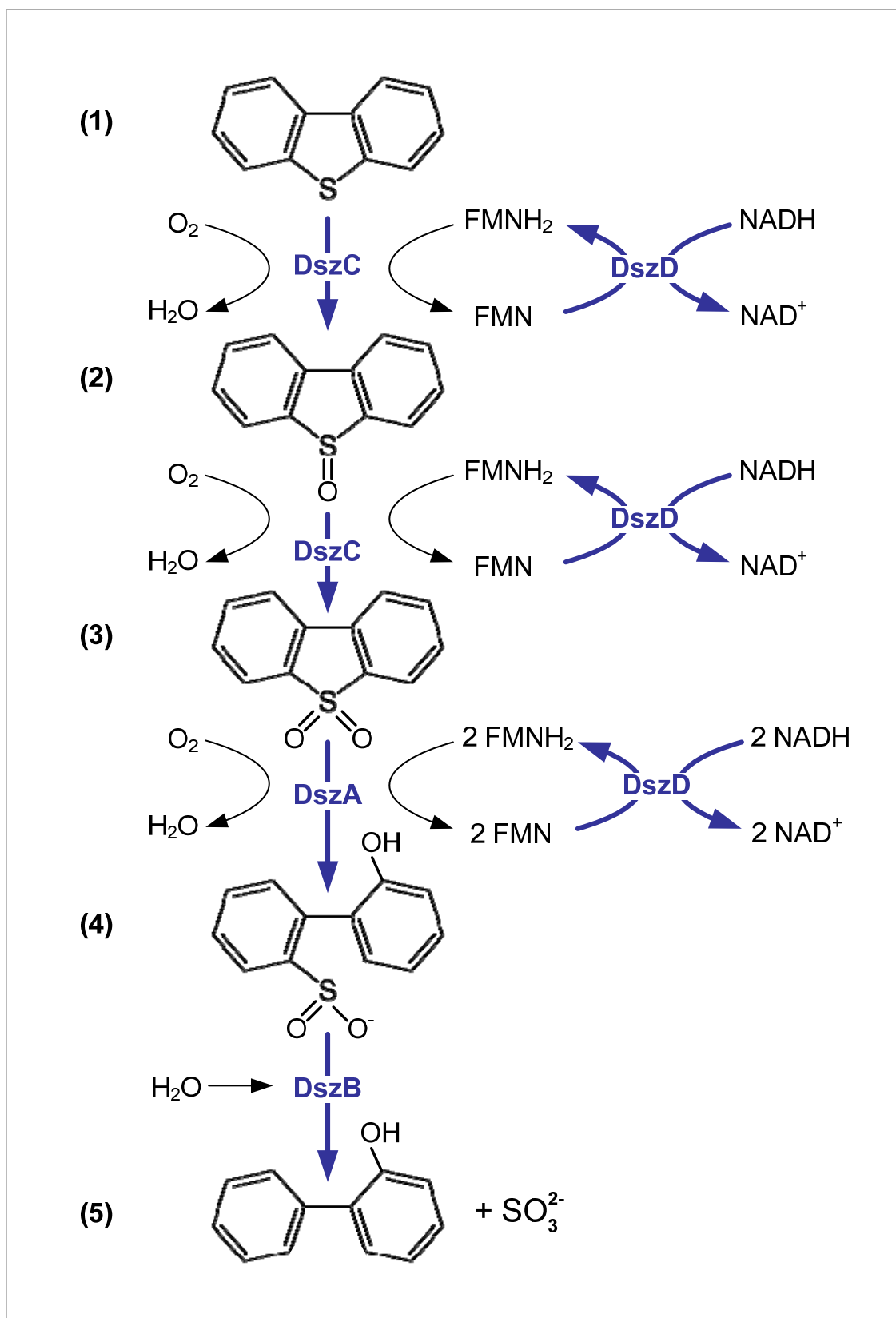


FIGURA 1.12. Esquema de la ruta 4S de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. (1) DBT, dibenzotiofeno; (2) DBTO, dibenzotiofeno sulfóxido; (3) DBTO₂, dibenzotiofeno sulfona; (4) HBPS, hidroxifenilbenceno sulfonato; (5) 2-HBP, 2-hidroxibifenilo

Microorganismos empleados en biodesulfuración siguiendo la ruta 4S

Desde el aislamiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y el conocimiento de la ruta 4S, han sido multitud los microorganismos aislados y desarrollados para la eliminación del azufre empleando dicha ruta. Debido a sus características, la ruta 4S ha desplazado a las demás rutas en las investigaciones recientes (McFarland, 1999; Mohebbali y Ball, 2008). En la Tabla 1.8 se recogen algunos de los biocatalizadores más importantes desarrollados en los últimos años.

Se ha comprobado la capacidad desulfurante de determinados microorganismos termófilos como *Paenibacillus* sp. (Ishii y col., 2000), *Bacillus subtilis* (Kirimura y col., 2001), *Mycobacterium* sp X7B (Li y col., 2007), *Mycobacterium phlei* GTIS10 (Kayser y col., 2002), *Rhodococcus* sp. IMP-S02 (Castorena y col., 2002) y *Klebsiella* sp. 13T (Bhatia y Sharma, 2012). El empleo de organismos termófilos puede ser ventajoso en algunos aspectos como el aumento de las velocidades enzimáticas, menor riesgo de contaminación, mejores condiciones fluidodinámicas del combustible y menor gasto en enfriamiento de la corriente a tratar (Soleimani y col., 2007).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la utilización de **microorganismos modificados genéticamente** (OMG) para mejorar el proceso de biodesulfuración. Las técnicas de Ingeniería Genética pueden modificar la información genética de los seres vivos para aportarles nuevas o mejores capacidades (Le Borgne y Quintero, 2003) pero también permiten profundizar en el conocimiento del metabolismo, genética y enzimología del proceso (Suzuki, 1999). La aplicación de esta tecnología ha permitido caracterizar los genes implicados en la biodesulfuración en *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y su expresión (Denome y col., 1994; Gray y col., 1996). El siguiente paso es el desarrollo de microorganismos modificados genéticamente que presentan más actividad desulfurante, transforman más compuestos azufrados y son más estables bajo diversas condiciones de operación (McFarland, 1999; Le Borgne y Quintero, 2003).

Son muchos los biocatalizadores para BDS que se han desarrollado empleando técnicas de Ingeniería Genética. Los genes *dszABC* se han integrado en el cromosoma de varios microorganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Raheb y col., 2010) y *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (Ma y col., 2006) mejorando el rendimiento del proceso. Estos genes también se han introducido mediante plásmidos en *Gordonia alkanivorans* RIPI 90A (Shavandi y col., 2009) y *Escherichia coli* BL21 (Raheb y col., 2012). Por otra parte, se han introducido genes de desulfuración similares a los de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, como los genes *HcuABC*, de *Pseudomonas*

delafieldii R-8, introducidos en *Rhodococcus erythropolis* LSSE8-1 (Wang y col., 2011). *Pseudomonas putida* CECT5279 se creó integrando en un plásmido el operon dszABC de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y expresando la oxidorreductasa HpaC de *Escherichia coli* W mejorándose la eliminación de DBT (Galan y col., 2000). También han sido identificados los genes que codifican para las enzimas en microorganismos termófilos (Kirimura, 2004). Se han empleado técnicas de mutagénesis dirigida para aumentar la actividad de la enzima DszD como alternativa a la búsqueda de nuevos biocatalizadores con más actividad (Kamali y col., 2010). Otro aspecto en el que se emplea la Ingeniería Genética es en el diseño de biocatalizadores resistentes a disolventes orgánicos, como *Pseudomonas putida* DS23 (Tao y col., 2011).

TABLA 1.8. Algunos microorganismos empleados en biodesulfuración

Microorganismo	OMG	Termófilo	Referencia
<i>Bacillus sp.</i> KS1			Rath y col., 2012
<i>Enterobacter sp.</i>			Lakshmanraj y col., 2012
<i>Klebsiella sp.</i> 13T		X	Bhatia y Sharma, 2012
<i>Rhodococcus erythropolis</i> LSSE8-1	X		Wang y col., 2011
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> DMT-7			Bahaguna y col., 2011
<i>Pseudomonas putida</i> DS23	X		Tao y col., 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	X		Raheb y col., 2010
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Kho1			Ardakani y col., 2010
<i>Pantoea agglomerans</i> D23W3			Bhatia y Sharma, 2010
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SHT87			Davoodi y col., 2010
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279	X		Calzada y col., 2009
<i>Gordonia alkanivorans</i> RIPI90A	X		Shavandi y col., 2009
<i>Mycobacterium sp.</i> ZD-19			Chen y col., 2008
<i>Gordonia alkanivorans</i> 1B			Alves y col., 2008
<i>Mycobacterium goodii</i> X7B			Li y col., 2007
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FSD-2			Zhang y col., 2007
<i>Corynebacterium sp.</i> ZD-1			Wang y col., 2006
<i>Rhodococcus erythropolis</i> XP			Yu y col., 2006
<i>Rhodococcus sp.</i> 1awq			Ma y col., 2006b
<i>Sphingomonas subarctica</i> T7b			Gunam y col., 2006
<i>Arthrobacter sulfureus</i>			Labana y col., 2005
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279	X		Alcon y col., 2005
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279	X		Martín y col., 2004
<i>Mycobacterium sp.</i> X7B		X	Li y col., 2003
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8			Luo y col., 2003
<i>Rhodococcus sp.</i> FMF			Akbarzadeh y col., 2003

TABLA 1.8 (Continuación). Algunos microorganismos empleados en biodesulfuración

Microorganismo	OMG	Termófilo	Referencia
<i>Mycobacterium phlei</i> GTIS10		X	Kayser y col., 2002
<i>Rhodococcus sp.</i> IMP-S02		X	Castorena y col., 2002
<i>Bacillus subtilis</i> WU-S2-B		X	Kirimura y col., 2001
<i>Gordonia sp.</i> F.5.25.8.			Duarte y col., 2001
<i>Rhodococcus sp.</i> P32C1			Maghsoudi y col., 2001
<i>Paenibacillus sp.</i> A1-2		X	Ishii y col., 2000
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA2-5-1			Kobayashi y col., 2000

Formas de operación

Las posibilidades de operación en el proceso de biodesulfuración son variadas. En cuanto al estado del biocatalizador, se puede trabajar tanto con células enteras como con enzimas libres; en el caso de utilizar células enteras, pueden emplearse tanto en crecimiento como en estado de células en reposo o *resting cells*. El proceso puede llevarse a cabo en fase acuosa o empleando mezclas bifásicas. En cuanto a la escala del proceso, éste puede realizarse a escala de matraz o empleando biorreactores. El diseño del biorreactor de BDS también admite varias posibilidades, pueden ser continuos o discontinuos y el contacto entre la fase orgánica (diésel hidrodesulfurado o diésel simulado) y la fase orgánica (con el biocatalizador) puede realizarse tanto de manera directa, utilizando células inmovilizadas o mediante la aplicación de sistemas de separación con membranas.

Estudios a escala de matraz

Cuando se considera la posibilidad de emplear un microorganismo como biocatalizador en un proceso de biodesulfuración, en primer lugar se realizan unos estudios para comprobar su actividad en un sistema acuoso. Debido a la baja actividad mostrada por la desulfuración enzimática (Ohshiro y col., 1994; Setti y col., 1997), en la actualidad todos los estudios se realizan empleando células enteras. Estos estudios preliminares pueden llevarse a cabo utilizando células en crecimiento o en estado de *resting cells*, condición esta última en la cual se eliminan los compuestos necesarios para el crecimiento celular, dirigiendo el metabolismo al mantenimiento y la desulfuración. En la Tabla 1.9 se muestra una comparación de la capacidad desulfurante de distintos microorganismos tanto en crecimiento, como en estado de *resting cells*, en ella se observa que el empleo de *resting cells* proporciona mejores resultados y permite emplear concentraciones mayores de DBT. Los parámetros para definir el proceso de

biodesulfuración son los el **grado de desulfuración máximo** (X_{BDS}) y la **productividad específica** (S_{BDS}), definidos en las siguientes ecuaciones.

$$X_{BDS} = \left(\frac{C_{HBP}^{\max}}{C_{DBT}^0} \right) \quad [1.6]$$

$$S_{BDS} \left[\frac{\text{mol}_{HBP}}{\text{h} \cdot \text{g}_{DCW}} \right] = \frac{C_{HBP}^{\max}}{t_{BDS}^{\max} \cdot C_X} \quad [1.7]$$

TABLA 1.9. Capacidad desulfurante en fase acuosa de algunos microorganismos

Microorganismo	Estado celular	[DBT] ₀ (μM)	X _{BDS}	S _{BDS} (μmol/g·h)	Ref.
<i>S. maltophilia</i> Kho1	Crecimiento	1000	0.06	-	Ardakani (2010)
<i>Gordonia</i> sp. AHV-01	Crecimiento	1000	0.07	-	Aminsefat (2012)
<i>L. sphaericus</i> DMT-7	Crecimiento	200	0.60	-	Bahaguna (2011)
<i>G. alkanivorans</i> 1B	Crecimiento	480	0.26	0.10	Alves (2005)
<i>R. erythropolis</i> IGTS8	<i>Resting</i>	25	0.75	8.93	del Olmo (2005)
<i>Bacillus</i> sp. KS1	Crecimiento	320	0.34	-	Rath (2012)
	<i>Resting</i>	3200	0.56	12.86	
<i>R. erythropolis</i> SHT87	Crecimiento	250	0.76	-	Davoodii (2010)
	<i>Resting</i>	3000	0.46	11.67	
<i>Mycobacterium</i> sp. ZD-19	Crecimiento	360	1.00	1.20	Chen (2008)
<i>P. putida</i> CECT5279	<i>Resting</i>	25	1.00	11.90	Martin (2005)

Debido a la naturaleza de los combustibles el proceso de biodesulfuración debe llevarse a cabo en presencia de una fase orgánica. Las mezclas bifásicas proporcionan una buena biodisponibilidad de DBT como consecuencia de procesos de solvatación (Setti y col., 1995). Estas mezclas, sin embargo, presentan problemas relacionados con la transferencia de materia entre fases. La velocidad de transferencia de materia se ha descrito como la etapa limitante del proceso (Boltes y col., 2013; Maghsoudi y col., 2001; Setti y col., 1994). Otro problema asociado a las mezclas bifásicas es la separación de la mezcla microorganismo – fase orgánica – fase acuosa; hasta la fecha no se ha desarrollado ningún procedimiento económicamente viable.

Para simplificar el estudio de mezclas bifásicas, la fase orgánica suele simularse empleando para ello alcanos de cadena larga, como n-tetradecano y n-hexadecano,

compuestos representativos de los hidrocarburos presentes en los combustibles reales. La Tabla 1.10 presenta una comparación de la capacidad desulfurante de diferentes microorganismos empleados en procesos bifásicos, en ella se observa que los valores obtenidos son coherentes con los mostrados en la Tabla 1.9, correspondiente a procesos acuosos.

TABLA 1.10. Capacidad desulfurante en mezclas bifásicas de algunos microorganismos

Microorganismo	Estado celular	Fase orgánica	X_{BDS}	P_{BDS} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{h}$)	Ref.
<i>R. erythropolis</i> SHT87	Resting	C14 (1:1)	0.60	15,00	Davoodii (2010)
<i>Bacillus</i> sp. KS1	Resting	C14 (1:1)	0.69	15,71	Rath (2012)
<i>Rhodococcus</i> sp. P32C1	Resting	C16 (1:1)	0.12	10,83	Maghsoudi (2001)
	Resting	Oil (1:3)	0.48	-	
<i>P. putida</i> CECT5279	Resting	C16 (1:1)	0.42	-	Caro (2007)
<i>R. erythropolis</i> IGTS8	Resting	C16 (1:1)	0.80	-	Caro (2007)
<i>Rhodococcus</i> sp. IMP-S02	Crecimiento	Oil (1:25)	0.60	-	Castorena (2002)
<i>R. erythropolis</i> XP	Resting	Oil	0.62	-	Yu (2006)
<i>R. erythropolis</i> LSSE8-1vgb	Resting	C8 (1:2)	1.00	-	Zhang (2011)

Estudios en biorreactor

Para continuar con el desarrollo del proceso de biodesulfuración es necesario aplicar todo el conocimiento adquirido a escala de matraz en el escalado a nivel de biorreactor. Aunque las velocidades de reacción deben ser independientes de la geometría y el tamaño del sistema, pueden verse fuertemente afectadas por diferentes fenómenos de transporte. Algunas variables, como pH y temperatura, pueden estudiarse y optimizarse a escala de matraz, pero otras variables, como la velocidad de agitación y de aireación son aspectos clave en el desarrollo del proceso (Gomez y col., 2006; del Olmo y col., 2005; Martin y col., 2005) y deben estudiarse a escalas mayores. Hasta la fecha se han realizado pocos estudios de biodesulfuración en biorreactor, y la mayor parte de ellos no describen la selección de las variables de operación (Kobayashi y col., 2001; Schilling y col., 2002; Yang y col., 2007; Lin y col., 2012).

En cuanto al tipo de operación, los procesos continuos presentan algunas ventajas sobre los discontinuos, tales como reducción de costes y mayor facilidad de control del proceso. Los estudios de desulfuración en continuo realizados hasta la fecha

(Wang y col., 1996; Schilling y col., 2002; Amin y col., 2011) apuntan a la necesidad de trabajar en este sentido para el desarrollo del proceso a nivel industrial.

Entre los tipos de reactor que pueden emplearse se encuentran reactores de interfase (Oda y Ohta, 2002), biorreactor tipo air-lift (Boltes y col., 2008; Nandi, 2010) o biorreactores de microaireación (Lin y col., 2012).

El empleo de células **inmovilizadas** en soportes sólidos se ha estudiado en bastante profundidad (McFarland y col., 1998; Pacheco y col., 1999). Este tipo de operación presenta varias ventajas: la separación de las células en un sistema bifásico es sencilla, disminuye el riesgo de contaminación y aumenta tanto la estabilidad como la vida útil del biocatalizador (Hou y col., 2005). Son varios los métodos que pueden emplearse para la inmovilización, como atrapamiento en alginato cálcico (Li y col., 2005), adsorción en soportes inorgánicos (Dinamarca y col., 2010) o técnicas de inmovilización magnética (Zhang y col., 2012). En este caso pueden emplearse biorreactores con diversas configuraciones como tanques agitados (Hou y col., 2005), lechos fluidizados (Chang y col., 2000) o reactores de rotación vertical (Amin, 2011).

Un sistema en el que se produce una separación total entra las fases orgánica y acuosa, es mediante el empleo de **membranas** entre las fases (*Membrane Bioreactor for Biotransformations*, MBB). Este sistema aún no se ha empleado en BDS pero sí en otros procesos biológicos con resultados satisfactorios (Doig y col., 1998). Se basa en la separación física de las dos fases por medio de una membrana que permita el paso selectivo de las moléculas a tratar, tal y como se muestra en la Figura 1.13.

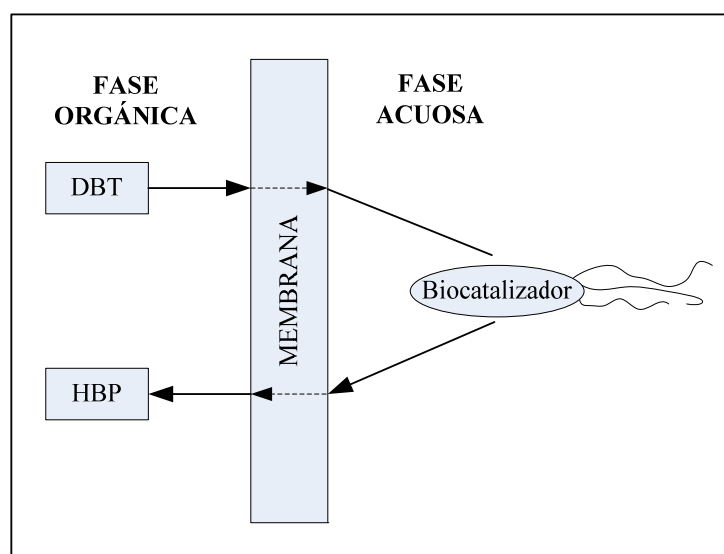


FIGURA 1.13. *Fundamento del proceso de biorreactor de membrana*

Factores que afectan a la capacidad desulfurante

Condiciones de crecimiento

Para un desarrollo óptimo del proceso de BDS es necesario controlar las condiciones de crecimiento de los microorganismos para que expresen correctamente la maquinaria enzimática responsable de la desulfuración (Nuhu, 2012). Factores como la composición del medio (Li y col., 2007b; Martin y col., 2004; Alves y col., 2005, 2008b), la aireación (Gomez y col., 2006) y la temperatura (Martin y col., 2005) son fundamentales para obtener los máximos rendimientos del proceso, tanto si se trabaja en crecimiento como en *resting cells*.

Para el desarrollo del proceso de BDS, es importante conocer en qué condiciones los genes de desulfuración se expresan o se reprimen (Soleimani y col., 2007). Se ha observado la represión del gen *dsz* en *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en presencia de determinadas cantidades de varios compuestos azufrados como dimetil sulfóxido, cisteína, metionina o sulfato (Li y col., 1996). La solución pasa por el diseño de microorganismos recombinantes en los que se reemplaza el promotor de la ruta, evitando así los problemas de represión por sulfato (Gallardo y col., 1997; Matsui y col., 2002) o sustituir la fuente de azufre por otra que no afecte a la expresión de los genes (Mohebbali, 2008).

Inhibición por producto

Otro aspecto importante relacionado con la ruta 4S es la toxicidad del HBP para algunos microorganismos (Alves y Paixao, 2011; Chen y col., 2008b). Altas concentraciones de HBP inhiben tanto el crecimiento como la desulfuración por lo que se recomienda la eliminación continua del HBP acumulado y el uso de microorganismos con altas tasas de crecimiento. Recientemente, se ha descrito una extensión de la ruta 4S en la bacteria *Mycobacterium* sp. ZD-19 en la que el HBP se convierte por metoxilación en 2-metoxibifenil (MBP), compuesto con menos efectos inhibitorios tanto en el crecimiento como en la desulfuración (Chen y col., 2009).

Efecto del medio bifásico

Gran parte de los microorganismos empleados en desulfuración no son capaces de presentar una alta actividad por mucho tiempo en un sistema bifásico (Nuhu, 2012). Como se comentó anteriormente, la toxicidad de la fase orgánica es distinta para cada microorganismo, para un correcto diseño del medio bifásico hay que tener en cuenta el

tiempo de contacto, la relación entre las fases y la eliminación de subproductos tóxicos. (Mehmia y col., 2004; Caro y col., 2008; Yang y col., 2007). En función del biocatalizador, la transferencia de DBT desde la fase orgánica también se puede ver afectada (Caro y col., 2008b).

Adición de suplementos

La adición de β -ciclodextrinas al medio de desulfuración de DBT usando *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 aumenta el rendimiento del proceso, mejora la difusión de DBT en la fase acuosa y disminuye la inhibición por producto (Caro y col., 2007b). El uso de surfactantes como el Tween 80® mejora la transferencia de DBT de la fase orgánica a la fase acuosa y aumenta el rendimiento del proceso (Feng y col., 2006; Miao-dong y col., 2006). La generación de FMNH₂ por medio de la adición de nicotinamida o riboflavina también aumenta la actividad del biocatalizador (Hai y col., 2008).

Desarrollo de un proceso de biodesulfuración industrial

La mayoría de las publicaciones de BDS se centran en la caracterización de biocatalizadores y su mejora utilizando técnicas de Ingeniería Genética mientras que hay muy pocos estudios sobre el diseño de un proceso industrial de BDS y el análisis de sus costes. Los estudios realizados concluyen que los costes de implantación y de operación de un proceso de BDS serían un 30% y un 15%, respectivamente, más bajos que los de la HDS (McFarland y col., 1998; Vazquez-Duhalt y col., 2002). Mientras que la mayoría de los bioprocesos comerciales se han desarrollado para la industria farmacéutica o de química fina, donde los costes de proceso son altos y los volúmenes de producto son muy bajos pero de un gran valor añadido, el volumen de producción de la BDS es mucho más alto que estos procesos y por ello representa uno de los mayores retos a los que se ha enfrentado la Biotecnología Industrial (Kilbane, 2006).

El diseño de un proceso industrial de BDS, siguiendo la secuencia lógica propia de un proceso de microbiología industrial puede resumirse en las siguientes etapas (Soleimani y col., 2007), realizadas todas ellas en condiciones de asepsia. Es de vital importancia el desarrollo de un protocolo de trabajo que permita obtener unos resultados reproducibles, aspecto clave en cualquier proceso biotecnológico.

Elección del microorganismo

En primer lugar es necesario seleccionar el microorganismo adecuado para el proceso de biodesulfuración. Para ello pueden emplearse varios métodos: utilizar un biocatalizador ya desarrollado, aislar un nuevo microorganismo (screening) o desarrollarlo por medio de técnicas de Ingeniería Genética.

Conservación del microorganismo

A escala industrial, es preferible evitar la transferencia periódica de cultivos a medios frescos, que puede causar mutaciones o cambios en el fenotipo del microorganismo seleccionado. Las técnicas más adecuadas para conservación de microorganismos son la ultracongelación en nitrógeno líquido o la liofilización.

Crecimiento del microorganismo

Esta es una de las etapas claves de todo proceso microbiológico industrial. Los microorganismos deben multiplicarse utilizando medios específicamente diseñados y en condiciones rigurosamente controladas de temperatura, agitación, pH y aireación. En este caso, durante el crecimiento controlado del microorganismo deben expresarse los genes *dszABC* y deben sintetizarse las enzimas responsables de la biodesulfuración. Los sistemas microbianos son heterogéneos, normalmente gas-líquido-sólido por lo que es fundamental el estudio del transporte de materia entre fases, prestando especial atención al transporte gas-líquido de oxígeno, que suele ser la etapa controlante del proceso (Gomez y col., 2006).

Proceso de biodesulfuración

Una vez obtenido el biocatalizador, se realiza la etapa de biodesulfuración de moléculas organosulfuradas. Este proceso puede realizarse de varias maneras, tal y como se explicó anteriormente.

Tratamientos posteriores

En un proceso industrial, los tratamientos posteriores al proceso (procesos *downstream*) pueden tener tanta o más importancia que el propio proceso. La economía del proceso va a depender de una eficiente separación del producto, de la recuperación del biocatalizador, separándolo de la fase orgánica si es necesario y de su posterior utilización, bien como desecho o reciclándolo en el proceso.

Energy BioSystems Corporation (EBC), ahora Enchira Biotechnology Corporation, es la única empresa que ha trabajado en el desarrollo de un proceso de BDS industrial (Kilbane, 2006). Además del tratamiento de diesel hidrodesulfurado, su estrategia también se enfocó en la producción de compuestos intermedios con alto valor añadido. El proceso se esquematiza en la Figura 1.14, la fase acuosa que contiene el biocatalizador se mezcla con el combustible en un reactor tipo tanque agitado que cuenta con un sistema de aireación y de control de pH y temperatura. En el reactor, los compuestos orgánicos azufrados se oxidan a productos solubles en agua mediante una ruta destructiva. La emulsión resultante se separa en dos corrientes, combustible desulfurado y mezcla agua-biocatalizador-azufre que vuelve a separarse para la reutilización del biocatalizador. La capacidad de tratamiento de la planta es de 5 barriles diarios, la vida media del biocatalizador es de 6-10 días pero el rendimiento obtenido no está claramente especificado (Rhodes, 1995). ECB comenzó a desarrollar el proceso en 1995 (Gupta y col., 2005) y en 2005 transfirió el proyecto a la compañía Petrostar, que actualmente ha cancelado la construcción de la planta debido a la baja actividad de los biocatalizadores empleados (Kilbane, 2006).

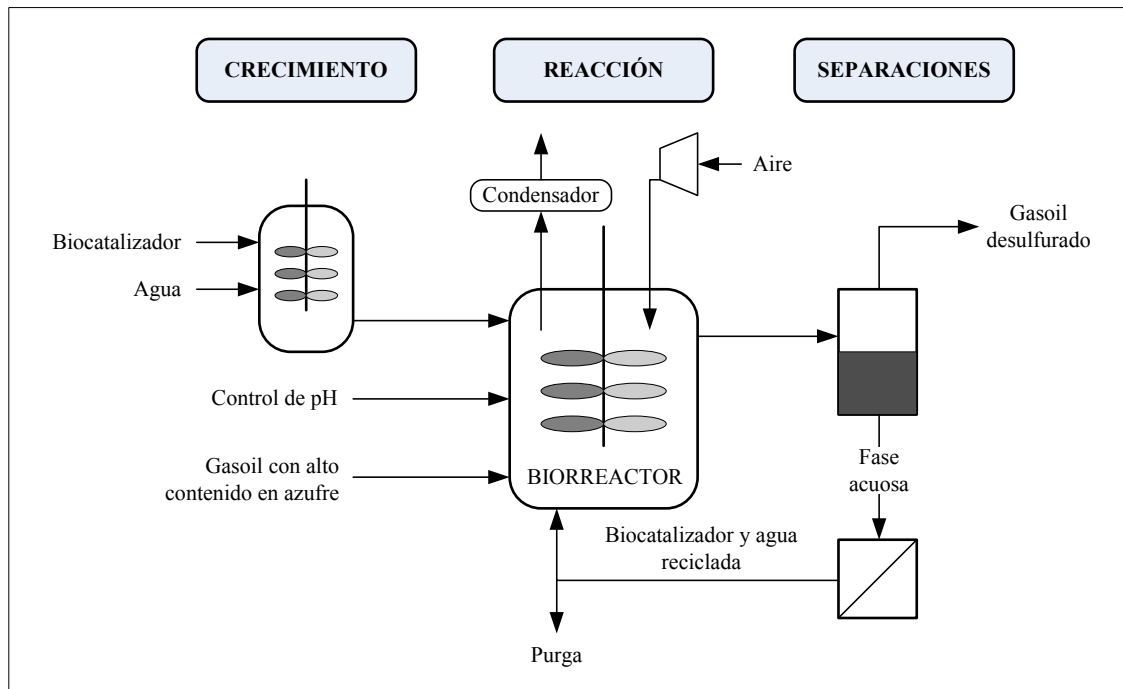


FIGURA 1.14. Esquema del proceso de biodesulfuración desarrollado por Energy BioSystems Corporation (Rhodes, 1995)

Perspectivas de la BDS

A pesar de los importantes avances realizados en los últimos años, para la implantación industrial de un proceso de BDS económicamente viable es necesario profundizar en varios aspectos. Además, el conocimiento obtenido en el estudio de la BDS puede aplicarse a otros procesos, tales como la producción de compuestos intermedios de alto valor añadido, como surfactantes basados en HBPS (Monticello, 2000), la biodenitrificación o eliminación del nitrógeno presente en combustibles, una fuente de las emisiones de óxidos de nitrógeno (Kilbane y col., 2000), la eliminación de metales pesados contenidos en combustibles (Fedorak y col., 1993), la transformación de fracciones pesadas en otras más ligeras (Premuzic y Lin, 1999) o la despolimerización de asfaltenos (Hofrichter y col., 1997).

Los grandes retos a los que se tiene que enfrentar la BDS para poder implantarse de manera industrial son los siguientes:

- Producción de biocatalizadores con mayor actividad, fundamentalmente a través de técnicas de Ingeniería Genética (Monticello, 2000; Kilbane, 2006; Moheballi y Ball, 2008; Xu y col., 2009).
- Producir biocatalizadores que sean capaces de eliminar el azufre de varias moléculas distintas (Gupta y col., 2005; Moheballi y Ball, 2008).
- En el caso de trabajar con mezclas bifásicas, aumentar la relación fase orgánica – fase acuosa empleando biocatalizadores con una mayor tolerancia al combustible (Moheballi y Ball, 2008; Soleimani y col., 2007; Tao y col., 2011).
- Mejorar las técnicas de separación del biocatalizador de la fase orgánica, fundamentalmente en el caso de que se formen emulsiones (Gupta y col., 2005); o desarrollar tecnologías que eviten el contacto entre fases (separación por membranas).

Los estudios realizados sobre las técnicas generales de eliminación de azufre en combustibles coinciden en mostrar la BDS como una tecnología muy prometedora debido a que reduciría los costes de operación y mejoraría la economía del proceso ya que se trabaja en unas condiciones suaves de presión y temperatura y el fluido de proceso es agua (Stanislaus y col., 2010; Srivastava, 2012; Javadi y de Klerk, 2012). Sin embargo, actualmente la BDS no es un proceso que pueda sustituir a la tradicional HDS (Stanislaus y col., 2010). La opción más atractiva para el empleo industrial de la biodesulfuración es utilizarla en un proceso integrado, junto con la hidrosulfuración,

debido a que los compuestos más recalcitrantes a la HDS son degradados fácilmente por medio de la BDS (Stanislaus y col., 2010). El emplazamiento de la unidad de BDS dependería en gran medida de la forma de operación elegida, pudiendo situarse tanto antes como después del proceso de HDS (Figura 1.15).

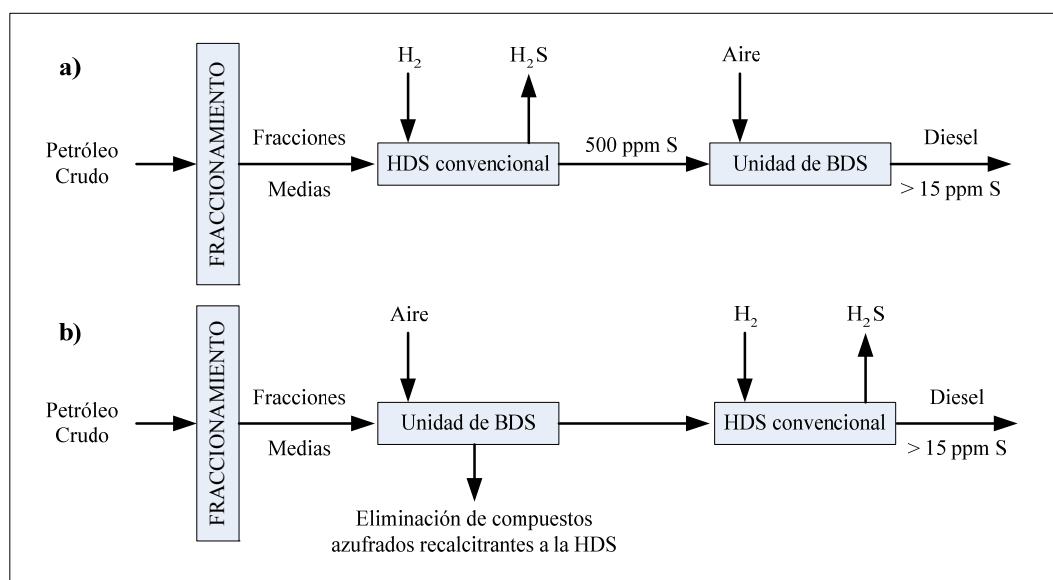


FIGURA 1.15. Opciones para la integración de los procesos de HDS y BDS. a) BDS después de la unidad de HDS, b) BDS antes de la HDS (Stanislaus y col., 2010)

1.5. PSEUDOMONAS PUTIDA KTH2 (pESOX3)

Pseudomonas putida KTH2 (pESOX3) es un organismo modificado genéticamente capaz de expresar los genes de la ruta 4S para degradar DBT. Porta el operón *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en un plásmido (Gallardo y col., 1997), y el gen *hpaC* de *Escherichia coli* W en su cromosoma (Galán y col., 2000).

Para obtener un biocatalizador con aplicabilidad industrial, se escogió el género *Pseudomonas* debido a que es uno de los microorganismos más abundantes de los encontrados en el petróleo (Leahy y Colwell, 1990), tiene una alta resistencia tanto a los disolventes orgánicos (Inoue y Horikoshi, 1991) como a los metales pesados presentes en los combustibles (Atlas, 1994) y se dispone de una gran variedad de herramientas que permiten su manipulación genética (de Lorenzo y Timmis, 1994).

Los genes *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se introdujeron en *Escherichia coli* para construir un *cassete* recombinante cuya expresión se controla por medio de un promotor heterólogo con el que se logró eliminar la represión de la ruta por

presencia de compuestos azufrados. El resultado es el plásmido pESOX1, que aporta la capacidad de desulfurar DBT en células de *Escherichia coli* JM109 (Gallardo y col., 1997). El plásmido pESOX1 se clonó en el plásmido PVL31 bajo el control del promotor *Ptac*, obteniendo el plásmido pESOX3, inducible por isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG) y con un gen de resistencia a tetraciclina. Este plásmido contiene un fragmento denominado DNARP4, que permite su movilización y transferencia a otras cepas receptoras (Gallardo y col., 1997). El plásmido pESOX3 que contiene los genes *dszABC* se introdujo en *Pseudomonas putida* KT2442 demostrándose su capacidad desulfurante (Gallardo y col., 1997). El esquema de la construcción de la serie de plásmidos pESOX se muestra en la Figura 1.16.

La enzima DszD de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, es una FMN:NADH reductasa que aporta el FMNH₂ necesario para el funcionamiento de las monooxigenasas DszA y DszC (Gray y col., 1996), aunque también es posible utilizar para este propósito flavin reductasas heterólogas (Xi y col., 1997; Lei y Tu, 1996; Galán y col., 2000). Para el diseño de *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3) se ha utilizado la reductasa HpaC de *Escherichia coli* W insertando el gen *hpaC* en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2442, bacteria que lleva el plásmido pESOX3 consiguiendo así un biocatalizador con más actividad que *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gallardo y col., 1997; Galán y col., 2000). En la Figura 1.17 se muestra un esquema del diseño genético de *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3).

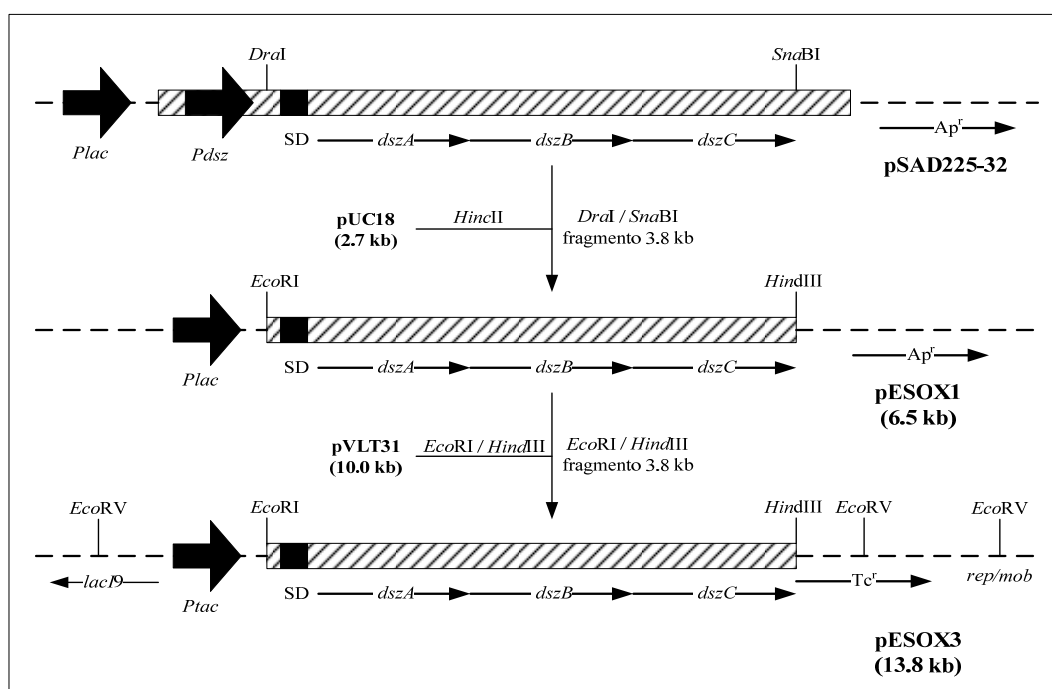


FIGURA 1.16. Esquema de construcción de los plásmidos pESOX (Gallardo y col., 1997)

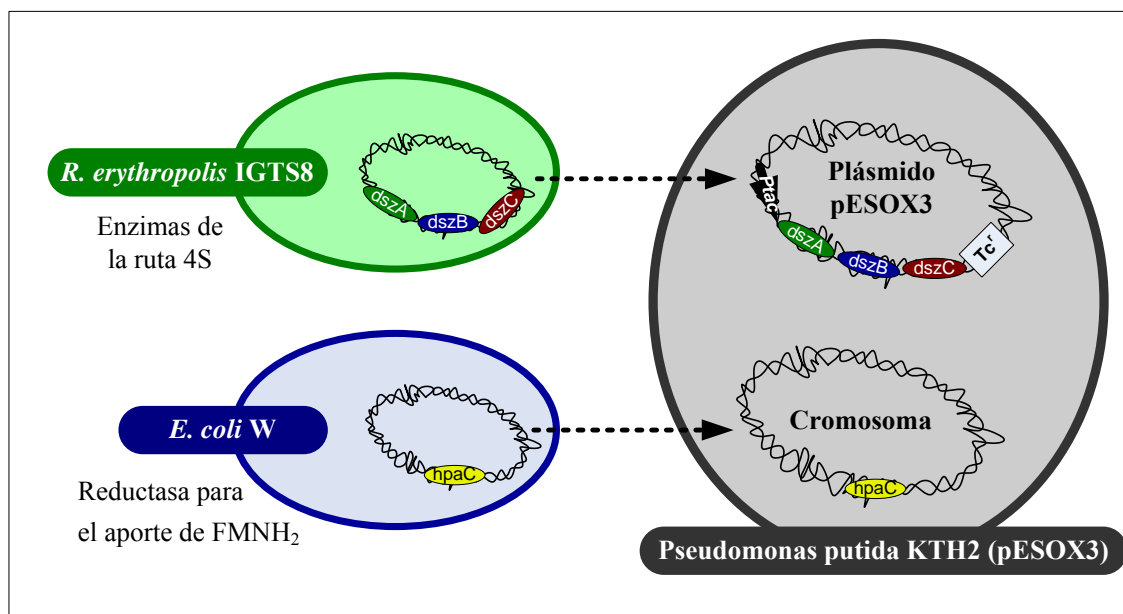


FIGURA 1.17. Diseño de *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3) con capacidad desulfurante. Transferencia del operón *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y del gen *hpaC* de *Escherichia coli* W

1.6. TRABAJOS PREVIOS del GRUPO de INVESTIGACIÓN

El grupo de investigación Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA) del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid comenzó a estudiar el proceso de biodesulfuración en el año 2002. Los biocatalizadores empleados desde entonces han sido *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y *Pseudomonas putida* CECT5279.

Rhodococcus erythropolis IGTS8

Rhodococcus erythropolis IGTS8 es el microorganismo más estudiado en relación con el proceso de biodesulfuración. Es por ello que los primeros estudios del grupo de investigación se realizaron con esta bacteria.

En primer lugar se estudió la influencia de la composición del medio de crecimiento en la actividad en *resting cells* de las células (del Olmo y col., 2005). Se estudiaron diferentes composiciones del medio de crecimiento para obtener un biocatalizador adecuado para su empleo en *resting cells*. La mayor velocidad de crecimiento se obtuvo empleando glucosa como fuente de carbono (20 g/L) y DMSO como fuente de azufre (500 μ M), mientras que la mayor capacidad desulfurante se

desarrolla empleando, también, glucosa como fuente de carbono (20 g/L) pero con una mayor concentración de DMSO (1300 µM).

El estudio de las condiciones de operación en crecimiento (del Olmo y col., 2005b) determinó la mayor capacidad desulfurante, que se obtiene operando en *resting cells* en las siguientes condiciones: 30 °C, pH controlado a 6,5 y una concentración de oxígeno disuelto constante e igual a 20 % de saturación.

Se desarrolló un modelo cinético capaz de representar el crecimiento microbiano bajo las condiciones de operación estudiadas y empleando diferentes medios de crecimiento (del Olmo y col., 2005b). Dicho modelo se expresa con la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{\max}} \right) \quad [1.8]$$

Para describir la evolución de la capacidad desulfurante durante el crecimiento, se desarrolló un modelo cinético, representado por la ecuación [1.9], que es capaz de predecir correctamente la conversión del proceso cuando este se lleva a cabo empleando *resting cells* obtenidas a diferentes edades de crecimiento (del Olmo y col., 2005b).

$$\frac{dX_{BDS}}{dt} = \alpha \frac{dC_x}{dt} - \beta \cdot C_x \quad [1.9]$$

***Pseudomonas putida* CECT5279**

El desarrollo del proceso empleando *Pseudomonas putida* CECT5279 comenzó con la determinación de las mejores condiciones para obtener el biocatalizador, para ello se desarrolló un protocolo de trabajo para fijar y optimizar la producción del inóculo (Martín, 2005), la composición del medio de crecimiento (Martín y col., 2004) y las condiciones de operación (Martín y col., 2005; Gómez y col., 2006b).

En cuanto a la composición del medio de crecimiento (Martín y col., 2004), los resultados mostraron que la velocidad de crecimiento es similar para las tres fuentes de carbono empleadas (glucosa, citrato y ácido glutámico), y que la presencia o ausencia de NH₄Cl no afectaba al crecimiento del microorganismo; sin embargo, la mayor actividad desulfurante se obtuvo usando ácido glutámico (20 g/L) y añadiendo 670 ppm de NH₄Cl.

En el estudio de las condiciones de operación del crecimiento celular (Martín y col., 2005) se hallaron diferencias entre las condiciones que maximizan el crecimiento y

las que producen las mejores capacidades desulfurantes. Así, la mayor concentración de biomasa se obtuvo a 26 °C y con una alta velocidad de transferencia de oxígeno, mientras que las mejores condiciones para la producción de células desulfurantes fueron 30 °C y baja velocidad de transporte de oxígeno (Gómez y col., 2006b).

Se determinó la influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura y transporte de oxígeno) en las velocidades iniciales de las reacciones de la ruta 4S (Santos y col., 2007). Los valores óptimos determinados fueron los mismos para todas las reacciones de la ruta 4S (30 °C, pH 8-9 y una agitación de 200 rpm), siendo las tres primeras reacciones (catalizadas por monooxigenasas), las que se vieron más influenciadas. En este trabajo se determinó que el parámetro con más influencia es la temperatura y que la velocidad limitante del proceso es la última reacción de la ruta 4S, la verdadera desulfuración.

Una vez determinadas las condiciones para la obtención del biocatalizador, se estudiaron los fenómenos clave involucrados en el proceso de biodesulfuración.

Mediante una serie de experimentos *in vivo* e *in vitro*, se determinó que no existen limitaciones para el transporte de los compuestos de la ruta 4S a través de la membrana celular (Alcón y col., 2005). Debido al requerimiento de FMNH₂ por parte de las tres primeras reacciones de la ruta 4S, se determinó la concentración inicial de equivalentes reducidos, observándose una clara influencia con la edad celular (Alcón y col., 2005), pero sin limitar el proceso de biodesulfuración.

Se observó que el rendimiento del proceso depende de la edad celular y que presenta un máximo cuando se utilizan células cultivadas durante aproximadamente 9 h (Martín y col., 2004; Martín y col., 2005; Calzada y col., 2009). Para tratar de explicar este comportamiento se midió la actividad de todas las enzimas de la ruta 4S, observándose que las enzimas monooxigenasas DszA y DszC presentan un máximo de actividad para células de 23 h de tiempo de crecimiento y la desulfinaasa DszB presenta un máximo de actividad en células de solo 5 h de crecimiento (Calzada y col., 2009), como se puede observar en la Figura 1.18. Debido a esta tendencia se propuso emplear mezclas de células de dos edades para obtener un biocatalizador con más actividad que utilizando células de un solo tiempo de crecimiento (5 y 23 horas), siendo la mezcla óptima la formada por 0,7 g/L de células de 5 horas de edad celular y 1,4 g/L de células de 23 horas de edad celular (Calzada y col., 2011).

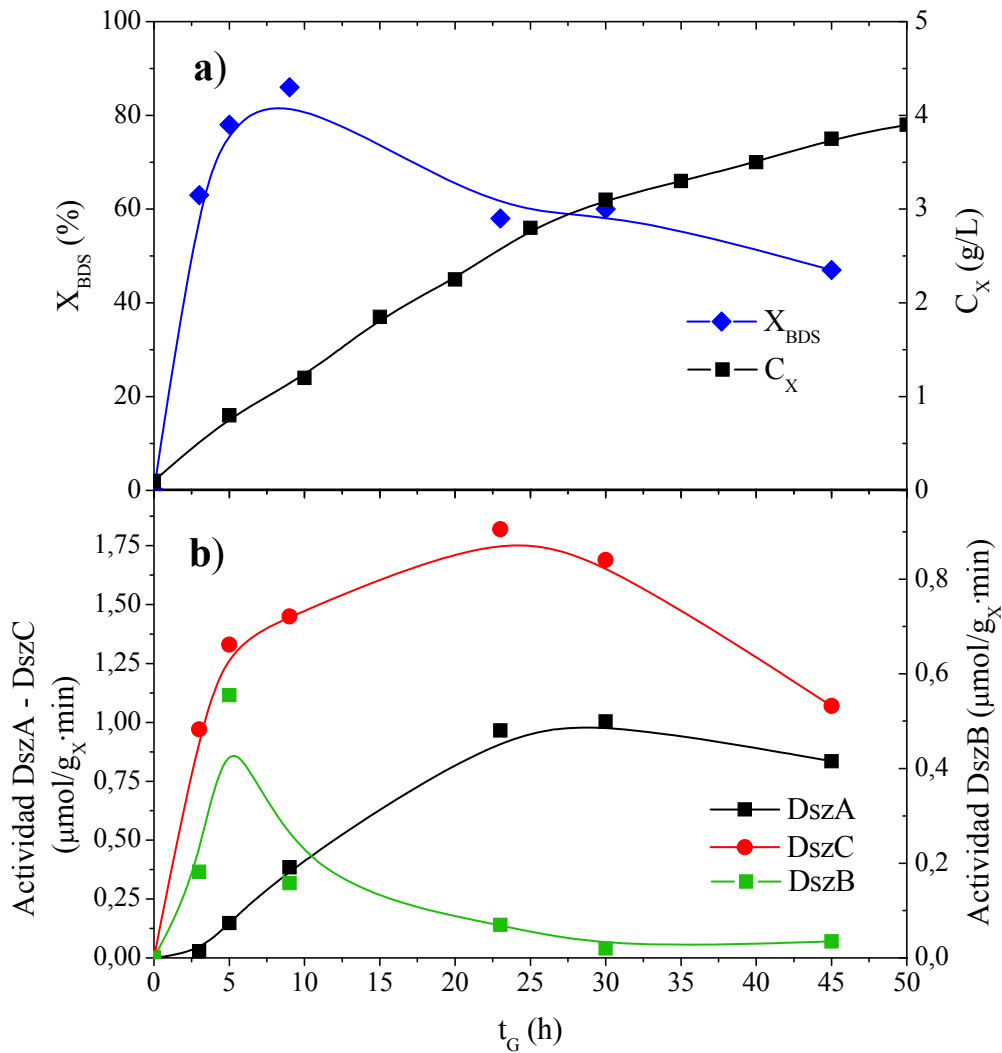


FIGURA 1.18. a) Evolución de la concentración de biomasa y la capacidad desulfurante del biocatalizador a lo largo del tiempo de crecimiento. b) Evolución de las actividades intracelulares de las enzimas DszABC a lo largo del tiempo de crecimiento.

En cuanto a la descripción cinética del crecimiento celular (Martin y col., 2005), se empleó el mismo modelo definido para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, representado por la ecuación [1.8]. Al igual que para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, este modelo permite describir la evolución del crecimiento celular bajo todas las condiciones de operación estudiadas, así como a todas las composiciones del medio empleadas. Para el desarrollo de un modelo cinético que describa la evolución de todos los compuestos de la ruta 4S, los primeros estudios mostraron que las tres primeras reacciones de la ruta pueden representarse mediante cinéticas simples de Michaelis-Menten y que la cuarta reacción presenta inhibición por producto, HBP (Alcon y col., 2008), obteniéndose el siguiente sistema de ecuaciones:

$$r_1 = \frac{k_1 \cdot C_{DBT}}{K_1 + C_{DBT}} \quad [1.10]$$

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{DBTO}} \quad [1.11]$$

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot C_{DBTO_2}}{K_3 + C_{DBTO_2}} \quad [1.12]$$

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot C_{HBPS}}{K_4 \left(1 + \frac{C_{HBP}}{K_1} \right) + C_{HBPS}} \quad [1.13]$$

Las ecuaciones cinéticas previamente mostradas pueden explicar el comportamiento del sistema durante los primeros 90 minutos del proceso (Alcon y col., 2008); momento a partir del cual las reacciones pierden velocidad y tienden a estabilizarse. Debido a este comportamiento, se propuso la introducción de un término empírico de desactivación enzimática en las ecuaciones cinéticas (Calzada y col., 2012), obteniéndose el sistema formado por las ecuaciones [1.14] a [1.17]. Aplicando estas ecuaciones para la formulación del modelo cinético, no solo se puede describir correctamente la evolución de los compuestos de la ruta 4S, sino que también es posible simular el comportamiento de las mezclas de células de distinta edad (Calzada, 2010).

$$r_1 = \frac{k'_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \quad [1.14]$$

$$r_2 = \frac{k'_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \quad [1.15]$$

$$r_3 = \frac{k'_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \quad [1.16]$$

$$r_4 = \frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \quad [1.17]$$

1.7. OBJETO y ALCANCE del TRABAJO

En este trabajo se estudia la **biodesulfuración de dibenzotiofeno** en fase acuosa empleando como biocatalizador la bacteria *Pseudomonas putida* KTH2 en estado de *resting cells*.

Debido a la naturaleza del catalizador empleado (células vivas), el objeto general es la identificación, y el posterior estudio, de los fenómenos y variables que es previsible presenten mayor influencia en el empleo del proceso a mayor escala. Para ello se propone una aproximación al cambio de escala enfocada en los siguientes aspectos: por una parte, tratando de aumentar la capacidad desulfurante y de obtener un biocatalizador con una mayor vida útil; por otra parte, realizando un estudio a nivel de biorreactor en el que se determinarán las condiciones fluidodinámicas más adecuadas para llevar a cabo el proceso de biodesulfuración. A partir de los datos experimentales se planteará un modelo cinético que describa adecuadamente los mismos estos fenómenos.

Partiendo de los resultados previos del grupo de investigación (Calzada y col., 2011), en los que se formuló un biocatalizador óptimo empleando células de dos edades en diferente proporción, se estudiará el comportamiento de las células de diferentes edades solas y sus mezclas en discontinuo y *fed-batch* (matraz *Erlenmeyer*) con el objeto de determinar su vida útil.

En base a los trabajos existentes en la literatura sobre la influencia positiva de la adición de cosustratos pertenecientes al Ciclo de Krebs (Sanchez y col., 2008; Wang y col., 2007; Wichmann y Vasic-Racki, 2005; Faber, 2004), se estudiará la incorporación de estas sustancias al medio de desulfuración. Se emplearán diversos compuestos (ácido acético, ácido succínico y ácido cítrico), en diferentes concentraciones (de 2,5 hasta 30 g/L), utilizando, de nuevo, como biocatalizadores células de las dos edades y sus mezclas, tanto en *batch*, como en *fed-batch*. Los resultados se compararán con los obtenidos en el estudio anterior.

Para describir la evolución de los compuestos de la ruta 4S con el tiempo se desarrollará un modelo cinético capaz de explicar y describir todos los resultados experimentales, teniendo en cuenta la concentración de compuestos intracelulares si fuera necesario.

El siguiente paso consistirá en llevar a cabo el proceso en un biorreactor tipo tanque agitado de 1 L. Se comprobará el comportamiento del sistema en dicho biorreactor respecto al obtenido en matraz *Erlenmeyer*, adaptando, si es necesario, el medio de reacción a las nuevas condiciones experimentales establecidas por el cambio de escala. Con el objetivo de optimizar el rendimiento del proceso de biodesulfuración, se realizará un estudio de la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno (ya que *P. putida* presenta una elevada velocidad de consumo del mismo). Dicho estudio se llevará a cabo variando las condiciones fluidodinámicas (agitación y caudal y composición del aire), debido a su gran influencia en el cambio de escala en procesos biotecnológicos. Este estudio se cuantificará, en la medida de lo posible, determinando velocidades de transferencia y consumo de oxígeno en las diversas condiciones probadas.

1.8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbad-Andaloussi, S.; Warzywoda, M. y Monot, F. (2003). Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacteria strains. *Oil & Gas Science and Technology - Revue de Institut Français du Pétrole*, 58, 505-513.
- Akbarzadeh, A.; Raheb, J.; Aghaei, A. y Karkhane, A. (2003). Study of desulfurization rate in *Rhodococcus* FMF native bacterium. *Iran J. Biotech.* 1, 36-40.
- Alcon, A.; Martín, A.B.; Santos, V.E.; Yustos, P. y García-Ochoa, F. (2005). Biodesulfurization of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem. Eng. J.* 26, 168-175.
- Alcon, A.; Martín, A.B.; Santos, V.E.; Gomez, E. y García-Ochoa, F. (2008). Kinetic model of DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT5279. *Biochem. Eng. J.* 39, 486-495.
- Alves, L.; Salgueiro, R.; Rodrigues, C.; Mesquita, E.; Matos, J. y Gírio, F.M. (2005). Desulfurization of Dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120, 199-208.

- Alves, L.; Marques, S.; Matos, J.; Tenreiro, R. y Girio, F.M. (2008). Dibenzothiophene desulfurization by *Gordonia alkanivorans* strain 1B using recycled paper sludge hydrolyzate. *Chemosphere*, 70, 967-973.
- Alves, L. y Paixao, S.M. (2011). Toxicity evaluation of 2-hydroxybiphenyl and other compounds involved in studies of fossil fuels biodesulphurisation. *Biores. Technol.* 102, 9162-9166.
- Amin, G.A. (2011). Integrated two-stage process for biodesulfurization of model oil by vertical rotating immobilized cell reactor with the bacterium *Rhodococcus erythropolis*. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 2, 1-4.
- Aminsefat, A.; Rasekh, B. y Ardakani, M.R. (2012). Biodesulfurization of dibenzothiophene by *Gordonia* sp. AHV-01 and optimization by using of response surface design procedure. *Microbiol.* 81. 154-159.
- Ardakani, M.R.; Aminsefat, A.; Rasekh, B.; Yazdiyan, F.; Zargar, B.; Zarei, M. y Najafzadeh, H. (2010). Biodesulfurization of DBT by a newly isolated, *Stenothrophomonas maltophilia* strain Kho1. *World App. Sci. J.* 10, 272-278.
- Atlas, R.M. (1994). *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing, Nueva York (Estados Unidos).
- Babich, I.V. y Moulijn, J.A. (2003). Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review. *Fuel.* 82, 602-631.
- Bahrami, A.; Shojaosadati, S.A. y Mohebali, G. (2001). Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria. *Biotechnol. Lett.* 23, 899-901.
- Bahuguna, A.; Lily, M.K.; Munjal, A.; Singh, R.N. y Dangwal, K. (2011). Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 isolated from diesel contaminated soil. *J. Environ. Sci.* 23, 975-982.
- BBD: *Biocatalyst Biodegradation Database*. (2007). Universidad de Minnesota. Recuperado el 10 de septiembre de 2012, de <http://umbbd.ethz.ch/>
- Bezalel, L.; Hadar, Y.; Fu, P.P; Freeman, J.P. y Cemiglia, C.E. (1996). Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorine and DBT by the fungus *Pleurotas ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2554- 2559.

- Bhatia, S. y Sharma, D.K. (2010). Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3. *Biochem. Eng. J.* 50, 104-109.
- Bhatia, S. y Sharma, D.K. (2012). Thermophilic desulfurization of DBT and different petroleum oils by *Klebisella* sp. 13T. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3491-3497.
- Banco Mundial. (2012). Recuperado el 6 de septiembre de 2012, de <http://datos.bancomundial.org/>
- Boltes, K.; Caro, A.; Leton, P.; Rodríguez, A. y García-Calvo, E. (2008). Gas-liquid mass transfer in oil-water emulsions with an airlift bio-reactor. *Chem. Eng. Proc.* 47, 2408-2412.
- Boltes, K.; Alonso del Aguila, R. y García-Calvo, E. (2013). Effect of mass transfer on biodesulfurization kinetics of alkylated forms of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida* CECT5279. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 422-431.
- Bosmann, A.; Datsevich, L.; Jess, A.; Lauter, A.; Schmitz, C. y Wasserscheid, P. (2001). Deep desulfurization of diesel fuel by extraction with ionic liquids. *Chem. Commun.* 23, 2494-2495.
- BP Statistical Review of World Energy (2012). Recuperado el 27 de agosto de 2012, de <http://www.bp.com/sectionbodycopy.do?categoryId=7500&contentId=7068481>
- Breyse, M.; Djega-Mariadassou, G.; Pessayre, S.; Geantet, C.; Vrinat, M.; Perot, G. y Lemaire, M. (2003). Deep desulfurization: reactions, catalysts and technological challenges. *Catal. Today.* 84, 129-138.
- Brunet, S.; Mey, D.; Perot, G.; Bouchy, C. y Diehl, F. (2005). On the HDS of FCC gasoline: a review. *Appl. Cata. A: Gen.* 278, 143- 172.
- Calzada, J.; Zamarro, M.T.; Alcón, A.; Santos, V.E.; Díaz, E.; García, J.L. y García-Ochoa, F. (2009). Analysis of DBT desulfurization in a recombinant *Pseudomonas putida* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 875-877.
- Calzada, J.; Heras, S.; Alcón, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2009b). Biodesulfurization of dibenzothiophene (DBT) using *Pseudomonas putida* CECT5279: a biocatalyst formulation comparison. *Energy Fuels.* 23, 5491-5495.

- Calzada, J. (2010). *Desulfuración de dibenzotiofeno con Pseudomonas putida CECT5279: Formas de Operación*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2011). Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochem.* 46, 1323-1328.
- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2012). Extended kinetic model for DBT desulfurization using *Pseudomonas putida* CECT5279 in resting cells. *Biochem. Eng. J.* 66, 52-60.
- Caro, A.; Boltes, K.; Letón, P. y García-Calvo, E. (2007). DBT biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria. *Biochem. Eng. J.* 35, 191-197.
- Caro, A.; Letón, P.; García-Calvo, E. y Setti, L. (2007b). Enhancement of dibenzothiophene biodesulfurization using β -cyclodextrins in oil-to-water media. *Fuel.* 86, 2632-2636.
- Caro, A.; Boltes, K.; Letón, P. y García-Calvo, E. (2008). Biodesulfurization of dibenzothiophene by growing cells of *Pseudomonas putida* CECT5279 in biphasic media. *Chemosphere.* 73, 663-669.
- Caro, A.; Boltes, K.; Letón, P. y García-Calvo, E. (2008b). Description of by-product inhibition effects on biodesulfurization of dibenzothiophene in biphasic media. *Biodegradation.* 19, 599-611.
- Castillo, F.; Roldán, M.D.; Blasco, P.; Huertas, M.J.; Caballero, F.J.; Moreno-Vivián, C. y Martínez-Luque, M. (2007). *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tebar, Madrid (España).
- Castorena, G.; Suárez, C.; Valdez, I.; Amador, G.; Fernández, L. y LeBorgne, S. (2002). Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus* sp. strains, *FEMS Microbiol. Lett.* 215, 157-161.
- Comunidades Europeas. (1993). Directiva 93/12/CEE del Consejo, de 23 de marzo de 1993 relativa al contenido de azufre en determinados combustibles líquidos. Diario Oficial L74 de 27/02/93, 81-83.

- Comunidades Europeas. (1994). Directiva 94/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de marzo de 1994 relativa a las medidas que deben adoptarse contra la contaminación atmosférica causada por las emisiones de los vehículos de motor y por la que se modifica la Directiva 70/220/CEE. Diario Oficial L100 de 19/04/94, 42-52.
- Comunidades Europeas. (1996). Directiva 96/62/CE del Consejo, de 27 de septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente. Diario Oficial L296 de 21/11/96, 55-63.
- Comunidades Europeas. (1998). Directiva 98/70/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 1998 relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo y por la que se modifica la Directiva 93/12/CEE del Consejo. Diario Oficial L350 de 28/12/1998, 58-75.
- Chang, J.H.; Chang, Y.K.; Ryu, H.W. y Chang, H.M. (2000). Desulfurization of light gas oil in immobilized-cell systems of *Gorgona* sp. CYKS1 and *Nocardia* sp. CYKS2. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 309-312.
- Chen, H.; Zhang, W.J.; Chen, J.M.; Cai, Y.B. y Li, W. (2008). Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6-DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD-19. *Bioresource Technol.* 99, 3630-3634.
- Chen, H.; Zhang, W.J.; Cai, Y.B.; Zhangm Y. y Li, W. (2008b). Elucidation of 2-hydroxybiphenyl effect on dibenzothiophene desulfurization by *Microbacterium* sp. strain ZD-M2. *Bioresource Technol.* 99, 6928-6933.
- Chen, H.; Cai, Y.; Zhang, W. y Li, W. (2009). Methoxylation pathway in biodesulfurization of model organosulfur compounds with *Mycobacterium* sp. *Bioresource Technol.* 100, 2085-2087.
- Crawford, D.L. y Gupta, R.K. (1990). Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr. Microbiol.* 21, 229-232.
- Davoodi, F.; Vosoughi, M. y Ziaee, A.A. (2010). Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Bioresource Technol.* 101, 1102-1105.

- de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. *Methods Enzymol.* 235, 386-405.
- de Ranson, I. y Rivas, C. (1999). Biocatalizador para remover azufre orgánico en hidrocarburos. *Visión Tecnológica.* 7, 15-20.
- del Olmo, C.H.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2005). Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT BDS: Influence of media composition. *Enzyme Microb. Tech.* 37, 157-166.
- del Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y García-Ochoa, F. (2005b). Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.* 22, 229-237.
- Denome, S.A.; Oldfield, C.; Nash, L.J. y Young, K.D. (1994). Characterization of the BDS genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J. Bacteriol.* 176, 6707-16.
- Dinamarca, M.A.; Quiroga, C.I.; Baeza, P.; Galvez, S.; Villarroel, M.; Olivero, P. y Ojeda, J. (2010). Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. *Bioresource Technol.* 101, 2375-2378.
- Doig, S.D.; Boam, A.T.; Leak, D.I.; Livingston, A.G. y Stuckey. (1998). A membrane bioreactor for biotransformations of hydrophobic molecules. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 587-594.
- Duarte, G.F.; Rosado, A.S.; Seldin, L.; De Araujo, W. y van Esas, J.D. (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1052-1062.
- European Environment Agency. (2008). Recuperado el 29 de agosto de 2012, de <http://www.eea.europa.eu/es>
- Environmental Protection Agency. (2001). *2000 air quality trends report*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estados Unidos).
- Faber, K. (2004). *Biotransformations in organic chemistry*. Editorial Springer, Berlin (Alemania).

- Farag, H.; Sakanishi, K.; Kouzu, M.; Matsumura, A.; Sugimoto, Y. y Saito, I. (2003). Investigation of the influence of H₂S on hydrodesulfurization of dibenzothiophene over a bulk MoS₂ catalyst. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 306-310.
- Fedorak, P.M.; Semple, K.M.; Vazquez-Duhalt, R. y Westlake, D. (1999). Chloroperoxidase-mediated modifications of porphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 429-437.
- Feng, J.; Zeng, Y.; Ma, C.; Cai, X.; Zhang, Q.; Tong, M.; Yu, B. y Xu, P. (2006). The surfactant Tween 80 enhances BDS. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7390-93.
- Finlayson-Pitts, B.J. y Pitts, J.N. (2000). *Chemistry of the upper and lower atmosphere. Theory, experiments and applications*. Academic Press, San Diego (Estados Unidos).
- Frassinetti, S.; Setti, L.; Corti, A.; Farrinelli, P.; Montevecci, P. y Vallini, G. (1998). Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 44, 289-297.
- Fujikawa, T.; Kimura, H. y Hagiwara, K. (2006). Development of ultra-deep HDS catalyst for production of clean diesel fuels. *Catal. Today.* 111, 188-93.
- Fujikawa, T. (2009). Highly active HDS catalyst for producing ultra low sulfur diesel fuels. *Top. Catal.* 52, 872-879.
- Galán, B.; Díaz, E. y García, J.L. (2000). Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysis. *Environ. Microbiol.* 2, 687-694.
- Gallagher, J.R.; Olson, E.S. y Stanley, D.C. (1993). Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 31-36.
- Gallardo, M.E.; Fernández, A.; de Lorenzo, V.; García, J.L. y Díaz, E. (1997). Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J. Bacteriol.* 179, 7156-7160.
- García-Gutiérrez, J.L.; Fuentes, G.A.; Hernández, M.E.; García, P.; Murrieta, F. y Jiménez, F. (2008). Ultra-deep oxidative desulfurization of diesel fuel by the Mo/AlO₃-H₂O₂ system: the effect of system parameters on catalytic activity. *Appl. Catal. A: Gen.* 334, 366-373.

- Georgoulas, A.K.; Balis, D.; Koukouli, M.E.; Meleti, C.; Bais, A. y Zerefos, C. (2009). A study of the total atmospheric sulfur dioxide load using ground-based measurements and the satellite derived Sulfur Dioxide Index. *Atmos. Environ.* 43, 1693-1701.
- Gomez, E.; Santos, V.E.; Alcon, A.; Martín, A.B. y García-Ochoa, F. (2006). Oxygen-uptake and mass-transfer rates on the growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on biodesulfurization capability. *Energy Fuels*. 20, 1565-1571.
- Gray, K.A.; Pogrebinsky, O.S.; Mrachko, G.T.; Xi, L.; Monticello, D.J. y Squires, C.H. (1996). Molecular mechanism of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat. Biotechnol.* 14, 1705-1709.
- Gunam, I.; Yaku, Y.; Hirano, M.; Yamamura, K.; Tomita, F.; Sone, T. y Asano, K. (2006). Biodesulfurization of alkylated forms of DBT and BT by *Sphingomonas subarctica* T7b. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 322-327.
- Gupta, N.; Roychoudhury, P.K. y Deb, J.K. (2005). Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 356-366.
- Hai, Y.; Xudong, S.; Qianqian, X.; Zhao, M.; Chengbin, X. y Jun, N. (2008). Effects of nicotinamide and riboflavin on the BDS activity of DBT by *Rhodococcus erythropolis* USTB-03. *J. Environ. Sci.* 20, 613-618.
- Hofrichter, M.; Bublitzm F. y Fritsche, W. (1997). Fungal attack in coal: Modification of hard coal by fungi. *Fuel Process. Technol.* 52, 55-64.
- Horii, Y.; Onuki, H.; Doi, S.; Mori, T.; Takatori, T.; Sato, H.; Ookuro, T. y Sugawara, T. (1996). *Desulfurization and denitrogenation of light oil by extraction*. US Patent 5.494.572.
- Hou, C.T. y Laskin, A.J. (1976). Microbial conversion of dibenzothiophene. *Develop. Ind. Microbiol.* 17, 351-362.
- Hou, Y.; Kong, Y.; Jinrong, Y.; Zhang, J.; Shi, D. y Xin, W. (2005). BDS of DBT by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1. *Fuel*. 84, 1975-1979.

- ICCT. The International Council on Clean Transportation. (2011). *Introducción a la refinación del petróleo y producción de gasolina y diésel con contenido ultra bajo en azufre*. Recuperado el 23 de septiembre de 2012, de http://www.theicct.org/sites/default/files/ICCT_RefiningTutorial_Spanish.pdf
- International Energy Agency Office, 2012. Recuperado el 24 de agosto de 2012, de <http://www.iea.org/stats/index.asp>
- Inoue, A. y Horikoshi, K. (1991). Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 194-196.
- Ishii, Y.; Konishi, J.; Okada, H.; Hirasawa, H.; Onaka, T. y Suzuki, M. (2000). Operon structure and functional analysis of the genes encoding thermophilic desulfurizing enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 81-88.
- Javadli, R. y de Klerk, A. (2012). Desulfurization of heavy oil. *Appl. Petrochem. Res.* 1, 3-19.
- Jess, A. y Esser, J. (2005). Deep desulfurization of fuels by extraction with ionic liquids. IIB: fundamentals, progress, challenges and opportunities. *Transform. Process.* 902, 83-96.
- Kamali, N.; Tavallaie, M.; Bambai, B.; Karkhane, A. y Miri, M. (2010). Site-directed mutagenesis enhances the activity of NADH-FMN oxidoreductase (DszD) activity of *Rhodococcus erythropolis*. *Biotechnol. Lett.* 32, 921-927.
- Kayser, K.J.; Cleveland, L.; Park, h.; Kwak, J.; Kolhatkar, A. y Kilbane, J.J. (2002). Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 737-746.
- Kertesz, M.A. (1999). Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 135-175.
- Kiely, G. (1998). *Ingeniería Ambiental*. Editorial McGraw Hill, Madrid (España).
- Kilbane, J.J. (1989). Desulfurization of coal: the microbial solution. *Trends Biotechnol.* 7, 97-101.

- Kilbane, J.J. (1990). Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resour. Conserv. Recy.* 3, 69-79.
- Kilbane, J.J. (2006). Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 305-314.
- Kilbane, J.J. y Jackowski, K. (1992). BDS of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1107-1114.
- Kilbane, J.J.; Ranganathan, R.; Cleveland, L.; Kayser, K.J. Ribiero, C. y Linhares, M.M. (2000). Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 688-693.
- Kim, T.S.; Kim, H.Y. y Kim, B.H. (1990). Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide. *Biotechnol. Lett.* 12, 757-761.
- Kim, B.H.; Kim, H.Y.; Kim, T.S. y Park, D.H. (1995). Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M6 on different petroleum products. *Fuel Process. Technol.* 43, 87-94.
- Kim, J.H.; Ma, X.; Zhou, A. y Song, C. (2006). Ultra clean desulfurization and denitrogenation of diesel fuel by selective adsorption over three different adsorbents: a study on adsorptive selectivity and mechanism. *Catal. Today.* 111, 74-83.
- Kirimura, K.; Furuya, T.; Nishii, Y.; Ishii, Y.; Kino, K. y Usami, S. (2001). Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 262-266.
- Kirimura, K.; Harada, K.; Iwasawa, H.; Tanaka, T.; Iwasaki, Y.; Furuya, T.; Ishii, Y. y Kino, K. (2004). Identification and functional analysis of the genes encoding dibenzothiophene-desulfurizing enzymes from thermophilic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 703-713.
- Kobayashi, M.; Onaka, T.; Ishii, Y.; Konishi, J.; Takaki, M.; Okada, H.; Ohta, Y.; Koizumi, K. y Suzuki, M. (2000). Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 187, 123-126.

- Kobayashi, M.; Horiuchi, K.; Yoshikawa, O.; Hirasawa, K.; Ishii, Y.; Fujino, K.; Sugiyama, H. y Maruhashi, K. (2001). Kinetic análisis of microbial desulfurization of model and Light gas oils containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 298-304.
- Kodama, K.; Nakatani, S.; Umehara, K.; Shimizu, K.; Minoda, Y. y Yamada, K. (1970). Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part III: isolation and identification of products from DBT. *Agric. Biol. Chem.* 34, 1320-1324.
- Kodama, K.; Umehara, K.; Shimizu, K.; Nakatani, S.; Minoda, Y. y Yamada, K. (1973). Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric. Biol. Chem.* 37, 45-50.
- Konishi, J.; Ishii, Y.; Onaka, T.; Okumura, K. y Suzuki, M. (1997). Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3164-3169.
- Konishi, J.; Ishii, Y.; Onaka, T.; Ohta, Y.; Suzuki, M. y Maruhashi, K. (2000). Purification and characterization of dibenzothiophene sulfone monooxygenase and FMN-dependent NADH oxidoreductase from the thermophilic bacterium *Paenibacillus* sp. strain A1 1-2. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 607-613.
- Kropp, K.G. y Fedorak, P.M. (1998). A review of the occurrence, toxicity and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. *Can. J. Microbiol.* 44, 605-622.
- Labana, S.; Pandey, G. y Jain, R.K. (2005). Desulphurization of dibenzothiophene and diesel oils by bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 159-163.
- Lakshmanraj, L.; Ganesh, V. y Chandiran. (2012). Desulfurization of diesel by *Pseudomonas* species isolated from Indian refineries sites and optimization of process parameters by factorial design. *Hitek J. Bio. Sci. Bioengg.* 1, 1-21.
- Le Borgne, S. y Quintero, R. (2003). Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Process. Technol.* 81, 155-169.
- Leahy, J.G. y Colwell, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.

- Lee, S.; Applegate, D.V.; Ahmed, S.; Calderone, S.G. y Harvey, T.L. (2005). Hydrogen from natural gas: part I - autothermal reforming in an integrated fuel processor. *Int. J. Hydrogen Energ.* 30, 829-842.
- Lei, B. y Tu, S. (1996). Gene overexpression, purification and identification of a desulfurization enzyme from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 as a sulfide/sulfoxide monooxygenase. *J. Bacteriol.* 178, 5699-5705.
- Li, Z.M.; Squires, C.H.; Monticello, D.J. and Childs, J.D. (1996). Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory region of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *J. Bacteriol.* 178, 6409-6418.
- Li, F.; Xu, P.; Ma, C.; Luo, L. y Wang, X. (2003). Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 301-307.
- Li, F.; Xu, P.; Feng, J.; Meng, L.; Zheng, Y.; Luo, L. y Ma, C. (2005). Microbial desulfurization of gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B immobilized-cell system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 276-281.
- Li, F.; Zhang, Z.; Feng, J.; Cai, X. y Xu, P. (2007). Biodesulfurization of DBT in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. *J. Biotechnol.* 127, 222-228.
- Li, Y.; Xing, L.; Li, W.; Xiong, X.; Xin, X. y Liu, H. (2007b). Medium optimization of *Rhodococcus erythropolis* LSSE8-1 by Taguchi methodology for petroleum biodesulfurization. *Korean J. Chem. Eng.* 24, 781-786.
- Lin, X.; Liu, J.; Zhu, F.; Wei, X.; Li, Q. y Luo, M. (2012). Enhancement of biodesulfurization by *Pseudomonas delafieldii* in a ceramic microsparging aeration system. *Biotechnol. Lett.* 34, 1029-1032.
- Liu, Z.; Zhang, Q.; Zheng, Y. y Chen, J. (2008). Effects of nitrogen and aromatics on hydrodesulfurization of light cycle oil predicted by a system dynamics model. *Energy Fuels*, 22, 860-866.
- Luo, M.; Xing, J.; Gou, Z.; Li, S. y Liu, H. (2003). Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane. *Biochem. Eng. J.* 13, 1-6.

- Ma, X.; Sakanishi, K. y Mochida, I. (1994). Hydrodesulfurization reactivities of various sulfur compounds in diesel fuel. *Ind. Eng. Chem. Res.* 33, 218-222.
- Ma, T.; Li, G.; Li, J.; Liang, F. y Liu, R. (2006). Desulfurization of dibenzothiophene by *Bacillus subtilis* recombinant carrying dszABC and dszD genes. *Biotechnol. Lett.* 28, 1095-1100.
- Ma, C.; Feng, J.; Zeng, Y.; Cai, X.; Sun, B.; Zhang, Z.; Blankespoor, H. y Xu, P. (2006b). Methods for the preparation of a biodesulfurization biocatalyst using *Rhodococcus* sp. *Chemosphere.* 65, 165-169.
- Maghsoudi, S.; Vossoughi, M. Kheiriloom, A.; Tanaka. y Katoh, S. (2001). Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem. Eng. J.* 8, 151-156.
- Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2004). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene biodesulfurization for different media compositions. *Energy Fuels.* 18, 851-857.
- Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2005). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels.* 19, 775-782.
- Martin, A.B. (2005). *Desulfuración de dibenzotiofeno con Pseudomonas putida CECT5279*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Matsui, T.; Noda, K.; Tanaka, Y.; Maruhashi, K. y Kurane, R. (2002). Recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09 can desulfurize DBT in the presence of inorganic sulfate. *Curr. Microbiol.* 45, 240-244.
- McFarland, B.L. (1999). Biodesulfurization. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 257-264.
- Mehmia, M.R.; Towfighi, J.; Bonakdarpour, B. y Akbarnegad, M.M. (2004). Influence of top-section design and draft-tube height on the performance of airlift bioreactors containing water-in-oil microemulsion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 260-267.
- Miao-dong, W.; Wei, L.; Yao, S.; Da-hui, W. y Hai, F. (2006). Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium* sp. ZD-1 in the presence of organic phase. *J. Zhejiang Univ. Sci.* A7 (Suppl. II). 371-375.

- Michaud, R.; Lemberon, J.L. y Perot, G. (1998). Hydrodesulfurization of dibenzothiophene and 4,6-dimethyldibenzothiophene: effect of an acid component on the activity of a sulfided NiMo on alumina catalyst. *Appl. Catal. A: Gen.* 169, 343-353.
- Mohebali, G. y Ball, A.S. (2008). Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology.* 154, 2169-2183.
- Monticello, D.J. y Finnerty, W.R. (1985). Microbial desulfurization of fossil fuels. *Annu. Rev. Microbiology,* 39, 371-389.
- Monticello, D.J. (2000). Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 540-546.
- Nandi, S. (2010). Biodesulfurization of hydro-desulfurized diesel in airlift reactor. *J. Sci. Ind. Res.* 69, 543-547.
- Nemoto, S. (2002). Status of fuels and lubricants for diesel engines in Japan. Presentation at Motor Fuels: Energy Efficiency and Emissions in Transportation. Washington D.C. October 9-10.
- Nuhu, A.A. (2012). Bio-catalytic desulfurization of fossil fuels: a mini review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* Online. DOI 10.1007/s11157-012-9267-x.
- Oda, S. y Ohta, H. (2002). Biodesulfurization of dibenzothiophene with *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 and its mutant in an interface bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 474-477.
- Ohshiro, T.; Hine, Y. e Izumi, Y. (1994). Enzymatic desulfurization of dibenzothiophene by a cell- free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 341-344.
- Ohshiro, T.; Kanbayashi, Y.; Hine, Y. e Izumi, Y. (1995). Involvement of flavin coenzyme in dibenzothiophene degrading enzyme system from *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1349-1351.
- Ohshiro, T.; Hirata, T.; Hashimoto, I. e Izumi, Y. (1996). Characterization of DBT desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 610-612.

- Ohshiro, T. e Izumi, Y. (1999). Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1-9.
- Oldfield, C.; Pogrebinsky, O.; Simmonds, J.; Olson, E. y Kulpa, C. (1997). Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology.* 143, 2961-2973.
- Orozco, C.; Pérez, A.; González, M^a.; Rodríguez, F.J. y Alfayate, J.M. (2003). *Contaminación Ambiental: Una visión desde la química*. Editorial Thomson, Madrid (España).
- Pacheco, M.A.; Lange, E.A.; Pienkos, P.T.; Yu, P.T.; Rouse, M.P.; Lin, Q. y Linguist, L. (1999). *Recent advances in biodesulfurization of diesel fuel*. Annual Meeting. National Petrochemical and Refiners Association. San Antonio. 1-26.
- Park, J.G.; Ko, C.H.; Yi, K.B.; Park, J.H.; Han, S.S.; Cho, S.H. y Kim, J.N. (2008). Reactive adsorption of sulfur compounds in diesel on nickel supported on mesoporous silica. *Appl. Catal.B: Environ.* 81, 244-250.
- Pope, C.A.; Brunet, R.T.; Thun, M.J.; Calle, E.E.; Krewski, D.; Ito, K. y Thurston, G.D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 287, 1132-1141.
- Premuzic, E.T. y Lin, M.S. (1999). Induced biochemical conversions of heavy crude oils. *J. Pet. Sci. Eng.* 22, 171-180.
- Qian, E.W. (2008). Development of novel ninhydrogenation desulfurization process: oxidative desulfurization of distillate. *J. Jpn. Petrol. Inst.* 51, 14-31.
- Raheb, J.; Hajipour, M.J. y Memari, B. (2010). Increasing of biodesulfurization activity of newly recombinant *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 by cloning the flavin reductase gene. *Int. J. Biotech. Biochem.* 6, 219-229.
- Raheb, J.; Rasekh, B.; Irani, S.; Hajipour, M.J.; Mozarafi, M.; Kefayati, M.E. y Memari, B. (2012). The study of biodesulfurization activity in recombinant *Escherichia coli* strain by cloning the dsz genes involve in 4S pathway. *J. Sci. Islam. Rep. Iran.* 22, 213-219.
- Rath, K.; Mishra, B. y Vuppu, S. (2012). Bio degrading ability of organo-sulphur compounds of a newly isolated microbe *Bacillus* sp. KS1 from the oil contaminated soil. *Arch. Appl. Sci. Res.* 4, 465-471.

- Rhodes, A. (1995). Enzymes desulfurizing diesel fuel in pilot plant tests. *Oil Gas J.* 93, 39-40.
- Sanchez, C.; Neves, A.R.; Cavalheiro, J.; dos Santos, M.M.; Garcia-Quintans, N. y Lopez, P. (2008). Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1136-1144.
- Santos, V.E.; Alcón, A.; Martín, A.B.; Gómez, E. y García-Ochoa, F. (2007). Desulfurization of DBT using the 4S route: influence of operational conditions on initial reaction rates. *Biocatal. Biotransform.* 25, 286-294.
- Sato, H. y Clark, D.P. (1995). Degradation of dibenzothiophene sulphoxide and sulphone by *Arthrobacter* strain DBTS2. *Microbios.* 83, 145-159.
- Schindler, D. (1988). Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science.* 239, 149-157.
- Schilling, B.M.; Alvarez, L.M.; Wang, D.I.C. y Cooney, C.L. (2002). Continuous desulfurization of dibenzothiophene with *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968). *Biotechnol. Prog.* 18, 1207-1213.
- Setti, L.; Lanzarini, G. y Pifferi, P.G. (1994). Diffusion as a rate controlling step in heavy-oil biodesulfurization processes. *Fuel Process. Technol.* 40, 311-317.
- Setti, L.; Lanzarini, G. y Pifferi, P.G. (1995). Dibenzothiophene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. in model solution. *Process Biochem.* 30, 721-728.
- Setti, L.; Lanzarini, G. y Pifferi, P.G. (1997). Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process. *Fuel Process. Technol.* 52, 145-153.
- Shavandi, M.; Sadeghizadeh, M.; Zomorodipour, A. y Khajeh, K. (2009). Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Bioresource Technol.* 100, 475-479.
- Shavandi, M.; Sadeghizadeh, M.; Khajeh, K.; Mohebbali, G. y Zomorodipour, A. (2010). Genomic structure and promoter analysis of the dsz operon for DBT BDS from *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1455-1461.
- Smith, S.J.; van Aardenne, J.; Klimont, Z.; Andres, R.J.; Volke, A. y Delgado, S. (2011). Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850-2005. *Atmos. Chem. Phys.* 11, 1101-1116.

- Soleimani, M.; Bassi, A. y Margaritis, A. (2007). Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnol. Adv.* 25, 570-596.
- Srivastava, V.C. (2012). An evaluation of desulfurization technologies for sulfur removal from liquid fuels. *RSC Adv.* 2, 759-783.
- Stanislaus, A.; Marafi, A. y Rana, M. (2010). Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel) production. *Catal. Today.* 153, 1-68.
- Strawinski, R.J. (1950). *Method of desulfurizing crude oil.* US Patent 2.521.761.
- Sun, C.Y. y Chen, G.J. (2003). Experimental and modeling studies on sulfur solubility in sour gas. *Fluid Phase Equilibr.* 214, 187-195.
- Suzuki, M. (1999). Enzymology and molecular genetics of biodesulfurization. *Recent Res. Devol. Microbiology.* 3, 515-534.
- Tao, F.; Liu, Y.; Luo, Q.; Su, F.; Xu, Y.; Li, F.; Yu, B.; Ma, C. y Xu, P. (2011). Novel organic solvent-responsive expressions vectors for biocatalysis: Application for development of an organic solvent tolerant strain. *Bioresource Technol.* 102, 9380-9387.
- Torkamani, S.; Shayegan, J.; Yaghmaei, S. y Alemzadeh, I. (2008). Study of a newly isolated thermophilic bacterium capable of Kuhemond heavy crude oil and dibenzothiophene biodesulfurization following 4S pathway at 60 °C. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1689-1693.
- Unión Europea. (2003). Directiva 2003/17/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de marzo de 2003 por la que se modifica la Directiva 98/70/CE relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo. Diario Oficial L76 de 22/03/2003, 10-19.
- Unión Europea. (2009). Directiva 2009/30/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009 por la que se modifica la Directiva 98/70/CE en relación con las especificaciones de la gasolina, el diésel y el gasóleo, se introduce un mecanismo para controlar y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, se modifica la Directiva 1999/32/CE en relación con las especificaciones del combustible utilizado por los buques de navegación interior y se deroga la Directiva 93/12/CEE. Diario Oficial L140 de 05/06/09, 88-113.
- Van Affender, M.; Schacht, S.; Klein, J. y Trüper, H.G. (1990). Degradation of debenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO. *Arch. Microbiol.* 153, 324-328.

- Van Hamme, J.D.; Singh, A. y Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 503-549.
- Vazquez-Duhalt, R.; Torres, E.; Valderrama, B. y Le Borgne, S. (2002). Will biochemical catalysis impact the petroleum refining industry? *Energy Fuels*. 16, 1239-1250.
- Velu, S.; Ma, X. y Song, C. (2003). Selective adsorption for removing sulfur from jet fuel over zeolite based adsorbents. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5293-5304.
- Wang, P. Humphrey, A.E. y Krawiec, S. (1996). Kinetic analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3066-3068.
- Wang, M.; Li, W.; Shi, Y.; Wang, D. y Feng, H. (2006). Effects of surfactants on biodesulfurization by *Corynebacterium* sp. ZD-1 in the presence of organic phase. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE A*. 7, 371-375.
- Wang, Z.; Chen, S.; Sun, M. y Yu, Z. (2007). A fundamental dual regulatory role of citrate on the biosyntheses of thuringiensin and poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus thuringiensis* YBT-032. *Biotechnol. Lett.* 29, 779-784.
- Wang, Z.; Wang, D.; Li, Q.; Li, W.; Tang, H. y Xing, J. (2011). Enhanced biodesulfurization by expression of dibenzothiophene uptake genes in *Rhodococcus erythropolis*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1965-1970.
- Wichmann, R. y Vasic-Racki, D. (2003). Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 92, 225-260.
- Wilfred, C.D.; Kiat, C.F.; Man, A.; Bustam, M.A.; Mutalib, M. y Phak, C.Z. (2012). Extraction of dibenzothiophene from dodecane using ionic liquids. *Fuel Process. Technol.* 93, 85-89.
- Xi, L.; Squires, C.H.; Monticello, D.J. y Childs, J.D. (1997). A flavin reductase stimulates DszA and DszC proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 73-75.
- Xu, P.; Jinhui, F.; Yu, B.; Li, F. y Ma, C. (2009). Recent developments in BDS of fossil fuels. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 113, 255-274.

- Yamada, K.O.; Morimoto, M. y Tani, Y. (2001). Degradation of dibenzothiophene by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of nitrogen gas. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 91-93.
- Yang, J.Z.; Hu, Y.; Zhao, D.; Wang, S.; Lau, P.C. y Marison, I.W. (2007). Two-layer continuous process design for the biodesulfurization of two diesel oils under bacterial growth conditions. *Biochem. Eng.* 37, 212-218.
- Yin, C.; Zhu, G. y Xia, D. (2002). Determination of organic sulphur compounds in naphtha. Part II. Identification and quantitative analysis of thiophenes in FCC and RFCC naphthas. *Preprints - American Chemical Society. Division of Petroleum Chemistry.* 47 (4), 398-401.
- Yu, B.; Xu, P.; Shi, Q. y Ma, C. (2006). Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 54-58.
- Zhang, Q.; Tong, M.Y.; Li, Y.S.; Gao, H.J. y Fang, X.C. (2007). Extensive BDS of diesel by *Rhodococcus erythropolis*. *Biotechnol. Lett.* 29, 123-27.
- Zhang, T.; Li, W.; chen, X.; Tang, H.; Li, Q.; Xing, J. y Liu, H. (2011). Enhanced BDS by magnetic immobilized *Rhodococcus erythropolis* LSSE8-1-vgb assembled with nano- γ -Al₂O₃. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 299-305.
- Zhang, B.; Jiang, Z.; Li, J.; Zhang, Y.; Lin, F.; Liu, Y. y Li, C. (2012). Catalytic oxidation of thiophene and its derivatives via dual activation for ultra-deep desulfurization of fuels. *J. Catal.* 287, 5-12.
- ZoBell, C.E. (1953). *Process for removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus.* US Patent 2.641.564.

2. PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 2.- PARTE EXPERIMENTAL

Indice

2.1.	<i>MATERIALES y EQUIPOS</i>	87
2.1.1.	<i>Pseudomonas putida KTH2 (pESOX3)</i>	87
2.1.2.	<i>Reactivos comerciales y sintetizados</i>	88
2.1.3.	<i>Composición de medios de cultivo</i>	92
2.1.4.	<i>Disoluciones tampón y medios de conservación</i>	94
2.1.5.	<i>Equipos</i>	95
2.2.	<i>PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES</i>	101
2.2.1.	<i>Obtención del biocatalizador</i>	101
2.2.2.	<i>Ensayos de biodesulfuración en resting cells</i>	104
2.3.	<i>MÉTODOS de ANÁLISIS</i>	105
2.3.1.	<i>Seguimiento de la biomasa</i>	105
2.3.2.	<i>Análisis de los compuestos de la ruta 4S</i>	106
2.3.3.	<i>Análisis de cosustratos</i>	109
2.3.4.	<i>Análisis de ATP</i>	110
2.3.5.	<i>Análisis de NADH</i>	112
2.3.6.	<i>Observaciones en microscopio óptico</i>	113
2.3.7.	<i>Observaciones en microscopio electrónico de transmisión</i>	113
2.4.	<i>MÉTODOS MATEMÁTICOS</i>	115
2.5.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	117

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

Para la realización del trabajo descrito en esta Memoria ha sido necesaria la puesta a punto y utilización de diversas técnicas analíticas y experimentales que se detallan en el presente capítulo, así como las características principales de los equipos, materiales y métodos matemáticos utilizados.

2.1. MATERIALES y EQUIPOS

En este apartado se describen los aspectos relacionados con el microorganismo empleado, los reactivos (comerciales y sintéticos) utilizados, los medios de cultivo y tampones preparados, así como los equipos necesarios para la realización del presente trabajo.

2.1.1. *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3)

El microorganismo empleado en el presente trabajo es *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3), en adelante *Pseudomonas putida* KTH2, proporcionado por el departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

Se trata de un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvado, con uno o varios flagelos polares (Figura 2.1). Es una bacteria quimioheterótrofa, oxidasa positiva y aerobia estricta. Para el catabolismo de los glúcidos emplea la ruta de Etner-Doudoroff y el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos. Las subespecies de

Pseudomonas putida son muy empleadas en la industria biotecnológica debido a su abundancia en la naturaleza, su relativamente alta tolerancia a disolventes orgánicos y a su facilidad de manipulación genética (Poblete-Castro y col., 2012). Entre sus aplicaciones más destacadas se incluyen la producción de biopolímeros, la síntesis y conversión de productos químicos y la degradación de compuestos orgánicos aromáticos.

Pseudomonas putida KTH2 es un organismo modificado genéticamente capaz de expresar los genes de la ruta 4S para degradar DBT. Porta el operón *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en un plásmido (Gallardo y col., 1997), y el gen *hpaC* de *Escherichia coli* W integrado en el cromosoma (Galán y col., 2000).

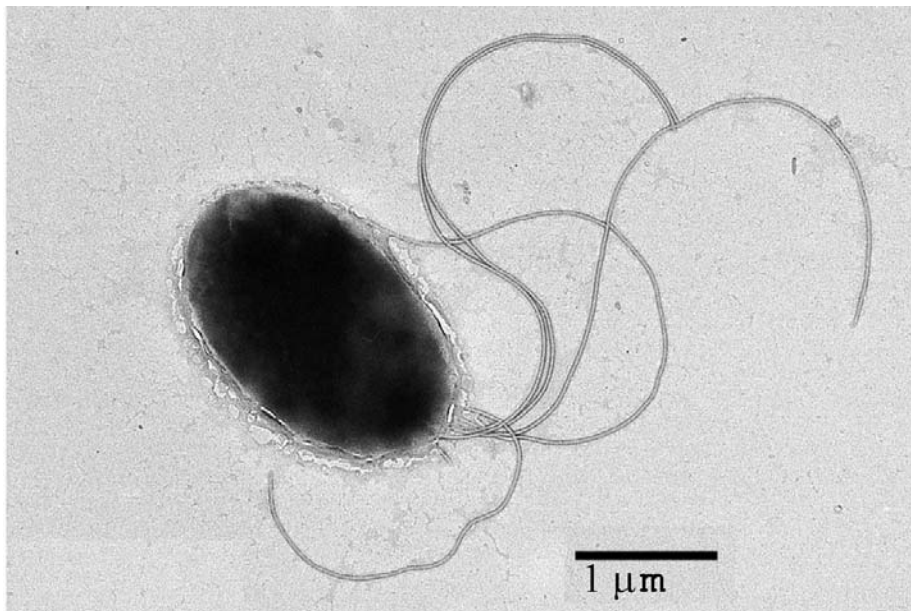


FIGURA 2.1. *Micrografía electrónica de transmisión de Pseudomonas putida*

2.1.2. Reactivos comerciales y sintetizados

A continuación se enumeran los reactivos utilizados en la parte experimental del presente trabajo. La Tabla 2.1 incluye los reactivos empleados para la formulación de los medios de crecimiento y conservación del microorganismo. La Tabla 2.2 muestra los reactivos usados en el estudio de cosustratos. En la Tabla 2.3 se listan los reactivos utilizados en la medida del poder desulfurante en los ensayos de biodesulfuración llevados a cabo en condiciones de *resting cells*. En la Tabla 2.4 se recogen los reactivos utilizados en los análisis de ATP y NADH.

TABLA 2.1. *Reactivos para medios de cultivo y conservación del microorganismo*

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Agar-agar	Panreac	-	141792.1211
Triptona	Fluka	-	T7293
Extracto de levadura	Fluka	-	70161
NaCl	Panreac	PRS	141659.1211
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Panreac	PRS	141965.1211
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	Panreac	PA	121512.1211
NH ₄ Cl	Panreac	PRS	141121.1211
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Panreac	PRS	141396.1210
CaCl ₂ ·H ₂ O	Sigma	≥93%	C1016
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Panreac	PRS	141358.1210
Ácido L-Glutámico	Panreac	PRS	142042.1210
Glicerina	Panreac	QP	211339.1211
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Probus	≥96%	121310
Tetraciclina	Fluka	≥98%	87128
Silicona	Panreac	QP	211628.1210
Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)	Sigma	≥99.9%	I6758

TABLA 2.2. *Reactivos para el estudio de cosustratos*

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Ácido acético	Aldrich	≥99.7%	24,285-3
Ácido cítrico	Panreac	≥99%	151808.1211
Ácido succínico	Sigma	≥99%	S3674
Glucosa	Panreac	PRS	141.341
Ácido sulfúrico	Scharlau	≥96%	AC2071

TABLA 2.3. Reactivos para la medida del poder desulfurante en resting cells

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Dibenzotiofeno (DBT)	Sigma	≥99%	347833
Dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO)	Sintetizado por el grupo de investigación		
Dibenzotiofeno sulfona (DBTO ₂)	Aldrich	≥97%	D3,240-7
2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfonato (HBPS)	Sintetizado por el grupo de investigación		
2-hidroxibifenil (HBP)	Fluka	≥98%	54890
2-propanol	Panreac	PA	131090.1211
Acetonitrilo	Lab-Scan	≥99.9%	C02C11X
(N-2-Hidroxietil)-piperazine-N ² -(2-ácido etanosulfónico) (HEPES)	Panreac	≥99%	375229.1209
Tween 80	Sigma	-	P1754
Ácido acético	Aldrich	≥99.7%	24,285-3
Ácido cítrico	Panreac	≥99%	151808.1211
Ácido succínico	Sigma	≥99%	S3674

TABLA 2.4. Reactivos para el análisis de ATP y NADH

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Kit enzimático ATP	Biothema	-	266-311
Tris hidroximetil aminometano	Panreac	PA	131940.1211
NADH	Sigma	-	N0786

Dos de los compuestos presentes en la ruta 4S no son comerciales (DBTO y HBPS) por lo que ha sido necesario sintetizarlos en laboratorio como se detalla a continuación:

DBTO: *Dibenzotiofeno sulfóxido*

Se prepara una disolución de 5 g de DBT (27,17 mmoles) en 60 mL de metanol en un matraz de tres bocas con un condensador de reflujo, un embudo de goteo y tubos de entrada y salida de nitrógeno. La disolución se mantiene a 67 °C en un baño de cloroformo/nitrógeno líquido. Se añaden 27,65 mmoles g de hipoclorito de t-butilo, preparado por reacción de alcohol t-butílico a 0 °C con 1 equivalente de disolución comercial de hipoclorito sódico y 1 equivalente de ácido acético. A continuación, se separa y se seca sobre sulfato sódico, obteniendo un aceite amarillo, con Bp = 77-78° (760 mmHg); esta mezcla se agita durante 30 min. Tras esto, se añaden 3g de carbonato de sodio anhidro y la mezcla se mantiene agitada a temperatura ambiente. La disolución se filtra y el metanol se elimina con un rotavapor. El sólido blanco obtenido (5,16 g, rendimiento = 95%) se recristaliza con metanol. Este producto se analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, detector MSD 5973) con una columna HP-INNOWAX (Crosslinked PEG) de 30 m x 0,25 mm con partículas de 0,25 µm de diámetro, en las siguientes condiciones: Caudal de gas portador (Helio) = 1,8 mL/min; T₁ = 250 °C; T_d = 230 °C; Horno (T₀ = 200 °C; 1 min; velocidad = 25 °C/min; T₁ = 220 °C; 3 min; velocidad = 3 °C/min; T₂ = 250 °C; 20 min; tiempo total = 34,8 min), relación de split = 40:1. El análisis por GC-MS del producto indicó DBTO con una pureza mayor del 90%.

HBPS: *2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato*

Se prepara una disolución de 10 g de o-hidroxibifenil (59 mmol) en 50 mL de de cloruro de metileno, esta disolución se añade a una segunda de cloruro de tionilo (4,7 mL, 64 mmol) en cloruro de metileno (50 mL) a 0 °C en hielo seco. A continuación, se adiciona trietilamina (8,2 mL, 58 mmol) por goteo durante 5 min. La mezcla se agita durante 15 min a 0 °C y durante 15 min más a 25 °C, después se filtra por succión y se añade, por goteo, durante 15 min y con agitación vigorosa, una suspensión de cloruro de aluminio (16 g, 120 mmol) en cloruro de metileno (250 mL a 0 °C en helio seco). Se obtiene una disolución verde oscura que se agita a 0 °C durante 1 h y, posteriormente a 25 °C durante 12 h. Se añaden 250 mL de agua, se filtra, se lava con ácido (300 mL, 3N), se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el disolvente. De esta manera se

obtiene un aceite rojo-anaranjado (9,02 g, rendimiento = 71%) que cristaliza rápidamente: Mp 94-97 °C. Este producto se analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, detector MSD 5973) con una columna HP- INNOWAX (Crosslinked PEG) de 30 m x 0,25 mm con partículas de 0,25 µm de diámetro, en las siguientes condiciones: Caudal de gas portador (Helio) = 1,8 mL/min; T = 250 °C; T_D = 230 °C, T₀ = 250 °C; tiempo total = 30 min, relación de split = 40:1. El análisis GC/MS del producto indicó HBPS con una pureza mayor del 95%.

2.1.3. Composición de medios de cultivo

A continuación se presentan la composición de los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo (Martín y col., 2004), su composición se detalla en la Tabla 2.5. Todas las disoluciones se realizan en agua ultrapura.

Medio LB (Luria-Bertani)

Es un medio complejo que se emplea para el crecimiento rápido de los microorganismos; en este trabajo se utiliza para la preparación de inóculos y para la obtención de *stocks*.

Medio BSM (Basal Salt Medium)

Es un medio sintético, de composición definida, que se emplea para el cultivo de microorganismos en condiciones controladas. Se añaden las fuentes de carbono, nitrógeno y azufre en formas asimilables por el microorganismo, junto con determinados oligoelementos necesarios para el crecimiento.

Para la formulación del medio BSM se utilizan cuatro disoluciones, (A, B, C y D) de la que se toman los volúmenes necesarios para obtener la concentración deseada. La composición de estas disoluciones se muestra en la Tabla 2.6.

TABLA 2.5. Composición de los medios de cultivo

Composición del medio LB	
Extracto de levadura	10 g/L
Triptona	5 g/L
Cloruro de sodio	10 g/L
Tetraciclina	$25 \cdot 10^{-3}$ g/L
Composición del medio BSM	
Ácido L-glutámico	20 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4 g/L
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4 g/L
NH ₄ Cl	2 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	$2,45 \cdot 10^{-2}$ g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10^{-3} g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	10^{-3} g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	$4,44 \cdot 10^{-1}$ g/L
Glicerol	$2,45 \cdot 10^{-2}$ g/L
Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	$2 \cdot 10^{-6}$ g/L
Tetraciclina	$25 \cdot 10^{-3}$ g/L

TABLA 2.6. Composición de las disoluciones madre para formular el medio BSM

Disolución A	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	40 g/L
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40 g/L
NH ₄ Cl	20 g/L
Disolución B	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	50 g/L
Disolución C	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	$5 \cdot 10^{-4}$ g/L
Disolución D	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	$5 \cdot 10^{-4}$ g/L

2.1.4. Disoluciones tampón y medios de conservación

La composición de las disoluciones tampón, utilizadas en los ensayos de desulfuración (Martín y col., 2004) y en el análisis de NADH (Wos y Pollard, 2006), así como del medio empleado para la conservación del microorganismo, se comentan a continuación y su composición detallada se muestra en la Tabla 2.7. Todas las disoluciones se realizan en agua ultrapura.

HEPES (N-2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico)

Es el medio en el que se realizan los experimentos para evaluar la capacidad desulfurante del biocatalizador. Es un compuesto con capacidad de tamponar el medio sin que pueda ser utilizado como nutriente por parte del microorganismo.

Tris (Tris hidroximetil aminometano)

Es el medio de extracción del NADH intracelular. La incubación con tampón Tris caliente produce la lisis celular y la liberación del NADH.

Glicerol en suero salino

Es el medio empleado para la conservación del microorganismo por congelación. El empleo de suero salino impide que, al congelar las muestras, se formen cristales de hielo que puedan dañar al biocatalizador.

TABLA 2.7. Composición de las disoluciones tampón y medio de conservación

Tampón HEPES	
(N-2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico)	12 g/L
pH ajustado a 8 con NaOH	
Tampón Tris	
Tris hidroximetil aminometano	2,423 g/L
pH ajustado a 7,75 con NaOH	
Medio de conservación	
Glicerol	500 g/L
NaCl	4,5 g/L

2.1.5. Equipos

A continuación, se describen los equipos e instalaciones utilizados para llevar a cabo la parte experimental del presente trabajo.

Autoclave

La esterilización de todos los materiales y medios empleados se ha realizado en un autoclave de la marca JP SELECTA, modelo Presoclave II 80. Se trata de un modelo de autoclave vertical, con un rango de temperaturas de 115 °C a 134 °C (0.62 bar a 2 bar) y de 80 litros de capacidad.

Balanza de precisión

Para la cuantificación del peso de los diferentes compuestos utilizados en el presente trabajo se ha utilizado una balanza de precisión marca SARTORIUS, modelo Handy. La precisión de la balanza es de $\pm 0,1$ mg.

Baño agitado

Los experimentos de desulfuración en matraz *Erlenmeyer* se han realizado en un baño agitado termostatzado de la marca JUTACO, modelo SW20. El rango de agitación es de 40 rpm a 200 rpm y la temperatura máxima es de 99 °C.

Biorreactores

Para el crecimiento controlado de células de *Pseudomonas putida* KTH2 y para determinados experimentos de desulfuración se han utilizado biorreactores de la marca SARTORIUS, modelo BIOSSTAT[®] B plus. Se trata de un biorreactor tipo tanque agitado, constituido por una cuba de cultivo y una unidad de medida, control y regulación de temperatura, agitación, pH, caudal de gas y concentración de oxígeno disuelto, tal y como se muestra en la Figura 2.2, con las siguientes características:

- **Cuba de cultivo:** Está realizada en vidrio borosilicatado. Dispone de una camisa formada por una doble pared de vidrio por la que se pasa el fluido termostatzante y de una tapa de acero inoxidable provista del eje de agitación y de diferentes orificios para la conexión de dispositivos. Se dispone de dos tamaños distintos de cubas, de 3 L de volumen total (2 L de volumen de trabajo máximo) y de 1,5 L de volumen total (1 L de volumen de trabajo máximo).

- **Sistema de medida y control de la temperatura:** Los biorreactores están equipados con un controlador digital PID, la medida de temperatura se realiza con un sensor de Pt-100 que actúa como consigna para el control, actuando sobre la válvula de refrigeración y sobre la resistencia eléctrica de 600 W.
- **Sistema de medida y control de la agitación:** Se dispone de un motor de 180 W que mueve el eje de agitación. La velocidad de agitación se regula mediante un controlador digital PID y se mide con un tacómetro ajustable entre 0 y 1200 rpm. Los agitadores son del tipo turbina, utilizándose dos de 6 paletas cada uno.
- **Sistema de aireación:** La aireación de la cuba se realiza suministrando aire mediante un compresor, el aire pasa por un filtro estéril de 0,2 μm . La distribución en el interior de la cuba se realiza mediante un difusor toroidal. El caudal de aire se ajusta mediante un controlador de flujo másico.
- **Sistema de medida y control de oxígeno disuelto:** La medida del oxígeno disuelto se realiza con un electrodo HAMILTON, cuyo rango de medida varía entre 0 y 100%. Para el control se pueden seguir las siguientes estrategias:
 - Control digital PID del oxígeno disuelto en cascada, actuando sobre la velocidad de agitación.
 - Control *Gasmix* que actúa sobre la válvula de entrada de gas.
- **Sistema de medida y control del pH:** Para la medida del pH se utiliza un electrodo HAMILTON cuyo rango varía entre 2 y 12 unidades de pH. Para el control se usa un controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y base.



FIGURA 2.2. Fotografía del biorreactor Sartorius Biostat B plus

Cabina de flujo laminar

Para la manipulación de los microorganismos, medios y materiales en condiciones de esterilidad se ha utilizado una cabina de flujo laminar vertical marca TELSTAR, modelo Micro-V/PCR, de clase 100. Consta de un impulsor de aire (velocidad de impulsión de hasta 0,45 m/s), un filtro de aspiración, un filtro absoluto HEPA y una lámpara de luz ultravioleta para esterilizar en el interior.

Centrífuga

Para la centrifugación de muestras se ha utilizado una centrífuga de mesa refrigerada de la marca SIGMA, modelo 4-16K. Las características de este equipo son:

- Intervalo de temperatura: -20 °C a 70 °C
- Velocidad máxima de giro: 15000 rpm.
- Rotores intercambiables:
 - Botes 6x250 mL, velocidad máxima de giro: 9000 rpm.
 - Tubos *Eppendorf* 30x1,5 mL, velocidad máxima de giro: 15000 rpm.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Para el análisis de los compuestos de la ruta 4S y de los cosustratos se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) de la marca Agilent modelo Agilent Series 1100. Este equipo consta de varios módulos, que se describen a continuación y se muestran en la Figura 2.3.

- **Desgasificador:** Elimina las burbujas de gas de los canales de eluyentes.
- **Bomba cuaternaria:** Proporciona el caudal programado de eluyente. Permite generar gradientes de composición y caudal. Dispone de una válvula de purga para cebar la cabeza de la bomba.
- **Sistema de inyección automático:** Consta de una bandeja portaviales, un brazo automático que toma el vial en el orden programado y una zona de inyección en la que la jeringa extrae una cantidad de muestra y la introduce en una válvula de seis vías donde se mezcla con el eluyente.
- **Compartimento de columna:** Se trata de un compartimento termostatzado en el que se conecta la columna a través de la cual fluye la muestra mezclada con el eluyente.

- **Detector UV-diodo de array:** Consta de una lámpara de deuterio cuya radiación se hace pasar a través de la muestra. La radiación emergente de la célula de flujo se dispersa por una red de difracción halográfica en radiaciones monocromáticas que se focalizan sobre un conjunto de fotodiodos. Permite obtener el espectro de absorción de la muestra en función de la longitud de onda y del tiempo en todo el intervalo UV-Vis.
- **Detector de índice de refracción:** Es en un refractómetro diferencial que mide la desviación de un rayo de luz debida a la diferencia del índice de refracción entre los líquidos de las celdas de muestra y de referencia de una única celda de flujo. El haz de luz de la lámpara atraviesa la celda de flujo, la cual está dividida diagonalmente en las celdas de muestra y de referencia. En la parte posterior de la celda de flujo, un espejo refleja la luz de nuevo a través de la celda de flujo y a través de un cristal se dirige el haz hasta el receptor de luz. El fotorreceptor de luz tiene dos diodos, cada uno de los cuales produce una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de luz que recibe.
- **Control del equipo:** Para el control del equipo por ordenador se dispone del software Agilent ChemStation® de Agilent Technologies. Entre otras, este software permite realizar las siguientes acciones:
 - Crear y modificar métodos de análisis.
 - Controlar la adquisición y almacenamiento de datos.
 - Analizar los datos obtenidos mediante sistemas de integración.



FIGURA 2.3. Fotografía del cromatógrafo HPLC Agilent series 1100

Electrodo de pH

Para la determinación del pH de las disoluciones tampón se ha utilizado un pH-metro de la marca CRISON, modelo BASIC 20, con electrodo de cuerpo de cristal, intervalo de medida de -2,00 a 16,00 unidades de pH. Su error es de $\pm 0,02$ unidades de pH y su reproducibilidad de $\pm 0,01$ unidades de pH.

Espectrofluorímetro

Para el análisis de NADH se ha utilizado un espectrofluorímetro de la marca JASCO, modelo FP-6500. Sus características son:

- Lámpara de Xe de 150 W
- Rango de longitud de onda de excitación y emisión: 220 – 750 nm
- Resolución mínima: 1 nm
- Control mediante el software *Spectra Manager*[®]

Espectrofotómetro de absorción UV/VIS

Para la medida de absorbancia de las muestras se ha utilizado un espectrofotómetro UV/VIS de doble haz, marca SHIMADZU, modelo UV 1603. Sus características técnicas son las siguientes:

- Intervalo de medida de longitudes de onda: 190 – 1100 nm
- Anchura de banda espectral: 2 nm
- Lámpara de deuterio para el intervalo de luz ultravioleta
- Lámpara halógena de tungsteno para el intervalo de luz visible e infrarrojo cercano

Estufa de cultivo

Para el cultivo de microorganismos en medio sólido se ha utilizado una estufa de cultivo bacteriológica marca HERAEUS, modelo B6. Su intervalo de temperaturas es de 5 a 70 °C, con una estabilidad de ± 1 °C en el espacio y de $\pm 0,2$ °C en el tiempo a 37 °C.

Estufa de secado

Para el secado de material o para el mantenimiento de diversos compuestos a altas temperaturas se ha utilizado una estufa de la marca SELECTA, modelo S-202. Este equipo consta de un termómetro de referencia, un termostato de regulación de

temperatura y un termostato de seguridad. El intervalo de temperaturas es de 40 – 200 °C con una estabilidad del 0,5%.

Incubadora orbital

Para el crecimiento del microorganismo se ha utilizado una incubadora orbital de la marca GALLENKAMP, modelo INR 200, con las siguientes características:

- Intervalo de temperatura: 5 a 70 °C.
- Fluctuación de temperatura en su interior: $\pm 0,1$ °C
- Variación máxima de temperatura: $\pm 0,5$ °C
- Intervalo de velocidad de agitación: 0 a 400 rpm
- Radio orbital: 32 mm
- Capacidad: 30 matraces *Erlenmeyer* de 250 mL

Luminómetro

Para el análisis de ATP se ha utilizado un luminómetro de la marca MGM Instruments, modelo OPTOCOMP I, con las siguientes características:

- Detector: tubo fotomultiplicador
- Longitudes de onda: 300 – 600 nm
- Rango de medidas: hasta 10^6 RLU/s
- Software: conexión a PC mediante la aplicación Hyperterminal

Microscopio óptico

Para el análisis microscópico del cultivo celular se ha utilizado un microscopio óptico de la marca NIKON®, modelo OPTIPHOT-2. Las imágenes se toman gracias a una cámara LEICA incorporada. El microscopio tiene un ocular de 20X y unos objetivos que varían entre los 10X y 100X, obteniéndose así un aumento máximo de 2000X.

Microscopio electrónico de transmisión

Para el análisis detallado de la morfología celular se empleó un microscopio electrónico de transmisión de la marca JEOL, modelo JEM 1010. Este microscopio permite el estudio de la ultraestructura celular en secciones ultrafinas (50-70 nm) obtenidas con un ultramicrotomo. Asimismo, mediante técnicas de tinción negativa es

posible el estudio de virus, bacterias, proteínas y sistemas de interacción nanopartícula-biomolécula. Las características técnicas del equipo son las siguientes:

- Voltaje de aceleración de 100 KV.
- Cañón de electrones termoiónico de B₆La.
- Resolución entre puntos de 0,35 nm.
- Captación de imágenes con cámara *megaview II*.
- Aumento máximo de 600.000x

Sistema de purificación de agua

Para la preparación de medios de cultivo, reactivos, disoluciones tampón y diluciones se utilizó agua ultrapura; para ello se dispone de un equipo de la marca SARTORIUS, modelo ARIUM 611UV, que permite obtener agua ASTM tipo I, resistividad superior a 18,2 MΩ·cm a 25 °C, carbono orgánico total menor de 1 ppb y contaminación bacteriana menor de 1 UFC/100 mL. La purificación del agua se realiza con dos cartuchos de carbón activo y una lámpara UV.

Ultracongelador

Para la conservación a largo plazo de los *stocks* de microorganismo se utilizó un congelador de la marca SANYO, modelo VIP Series MDF-U33V. Se trata de un ultracongelador vertical de 334 L de capacidad con un rango de temperaturas de -50 a -86 °C.

2.2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En este apartado se describen los protocolos experimentales desarrollados para la conservación, manipulación y crecimiento del microorganismo, así como para la realización de los ensayos de desufuración.

2.2.1. Obtención del biocatalizador

En cuanto a la obtención del biocatalizador, para asegurar la reproducibilidad de los experimentos se ha seguido un protocolo estandarizado (Martin y col., 2004; Martin y col., 2005) que incluye las etapas que se representan en el esquema de la Figura 2.4 y que se detallan a continuación.

Preparación de stocks de microorganismo y su conservación

La cepa de *Pseudomonas putida* KTH2, proporcionada por el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC en placa de agar, se incuba a 30 °C durante 24 h en estufa de cultivo. Posteriormente, se inocula desde la placa en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL que contienen 50 mL de medio líquido LB y 250 µL de tetraciclina; dichos matraces inoculados se incuban en incubadora orbital a 30 °C y 200 rpm; cuando se alcanza la fase de crecimiento exponencial se separa por centrifugación (5 minutos a 9000 rpm) el caldo de las células. Las células se resuspenden en una disolución al 50% de glicerina y suero salino (0,9% de NaCl). El resuspendido se introduce en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL a una concentración de 10 g/L. Para su almacenamiento se emplea un método de conservación a largo plazo, los tubos *Eppendorf* con el microorganismo se guardan a una temperatura de -80 °C. De esta forma el microorganismo se mantiene viable durante meses.

Obtención del inóculo

Las células conservadas se encuentran en estado de latencia. Su adaptación al medio de cultivo y la rapidez con la que alcanzan la fase exponencial de crecimiento influyen directamente en su capacidad desulfurante. Es por esto que, para emplear el *stock* congelado y obtener de él el biocatalizador, se realiza un cultivo en dos etapas consecutivas (preinóculo e inóculo) que permiten su adaptación al medio de crecimiento controlado, y así, lograr unas condiciones metabólicas idóneas y reproducibles.

El **preinóculo** se realiza para conseguir la adaptación del microorganismo al medio de cultivo. Se inoculan 0.5 mL del *stock* congelado (ligeramente atemperado) en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido LB y 250 µL de tetraciclina. Los matraces inoculados se incuban durante 12 horas en incubadora orbital a 30 °C y 200 rpm. En estas condiciones las células se encuentran en el final de la fase exponencial de crecimiento.

El **inóculo** se realiza para conseguir células de similar estado metabólico. Es un segundo crecimiento en medio líquido LB a partir del preinóculo. Se inocula el volumen necesario para una concentración inicial de microorganismo de 0,1 g/L en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL con 50 mL de medio líquido LB y 250 µL de tetraciclina. El inóculo se crece durante 4 horas en incubadora orbital a 30 °C y 200 rpm. En estas condiciones las células se encuentran en la primera mitad de la fase exponencial de crecimiento.

Crecimiento de microorganismo en biorreactor

Una vez obtenido el inóculo, formado por células de similar estado metabólico, se procede al crecimiento controlado en medio sintético para que se exprese la maquinaria enzimática necesaria para producir la desulfuración.

En condiciones de esterilidad, se introduce la cantidad necesaria de inóculo en un biorreactor de 2 L con 1800 mL de medio BSM para una concentración inicial de 0,1 g/L. Las condiciones de crecimiento, previamente determinadas (Martín y col., 2005), son: 30 °C de temperatura; aireación de 1 L_{aire}/L·min y agitación de 200 rpm.

Obtención y conservación de células de diferentes tiempos de crecimiento

En condiciones de esterilidad, se extraen del biorreactor muestras a diferentes tiempos de crecimiento. Las muestras extraídas se centrifugan a 9000 rpm (13131 g) durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en el volumen adecuado de disolución al 50% de glicerina y suero salino (9 g/L de NaCl) para obtener una concentración de biomasa de 10 g/L. Las células resuspendidas se conservan a -18 °C y constituyen el biocatalizador para los ensayos de desulfuración.

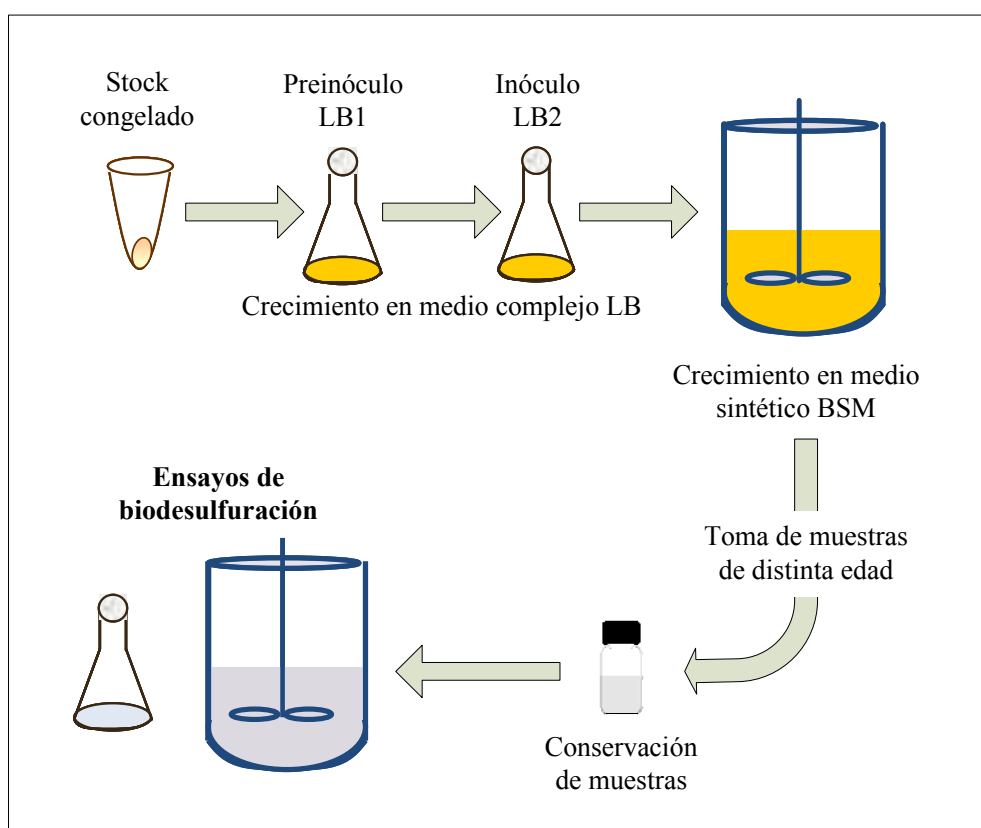


FIGURA 2.4. Protocolo de trabajo para la obtención de biocatalizador para su empleo en biodesulfuración

2.2.2. Ensayos de biodesulfuración en *resting cells*

Los experimentos de biodesulfuración se realizan en estado de *resting cells*, para ello se eliminan del medio los nutrientes que puedan ser empleados por el microorganismo para su crecimiento, dirigiendo así el metabolismo hacia el mantenimiento celular y la biodesulfuración. Para simplificar el estudio de los fenómenos del proceso de biodesulfuración se han realizado una serie de experimentos en fase acuosa, empleando el tampón biológico HEPES con un valor de pH de 8 como medio de reacción. Se han llevado a cabo dos tipos de experimentos en función de las variables a estudiar: en matraz *Erlenmeyer* y en biorreactor. Los procedimientos de trabajo para la realización de estos experimentos se describen a continuación y se esquematizan en la Figura 2.5.

En matraz Erlenmeyer

Los experimentos se llevan a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 100 mL que contienen 16 mL de HEPES, con un tapón de algodón y autoclavados. A ellos se añade la cantidad necesaria de DBT. Los matraces conteniendo el medio formulado se incuban en un baño termostatzado a 30 °C con una agitación de 200 rpm. Cuando se alcanza la temperatura de 30 °C, se añade el biocatalizador. Para calcular la cantidad exacta de biocatalizador a añadir, se mide la absorbancia de las muestras conservadas en el espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm. Durante el experimento se toman las muestras necesarias para el análisis de los compuestos de la ruta 4S, de los cosustratos empleados, del NADH y del ATP.

En biorreactor

Los experimentos en biorreactor se llevan a cabo en un biorreactor comercial (Braun BIOSTAT® Plus), de 1L de volumen de trabajo, con control de temperatura, agitación, aireación y de concentración de oxígeno disuelto. El volumen de HEPES se calcula en función de la concentración de biomasa deseada para un volumen final de reacción de 1L. El biorreactor, con el medio formulado, se autoclava y posteriormente se termostatiza a 30 °C, con los valores deseados de velocidad de agitación y caudal de aire. Una vez alcanzada esta temperatura se calibra la sonda de oxígeno para monitorizar el % de oxígeno disuelto durante el proceso; a continuación se añade el DBT y, posteriormente, se inocula la cantidad deseada de biocatalizador. Las

condiciones de operación empleadas han sido las siguientes: temperatura de 30 °C, caudal de oxígeno entre 1 y 2 L/L·min, velocidad de agitación entre 200 y 475 rpm. Durante el experimento se toman las muestras necesarias para el análisis de los compuestos de la ruta 4S.

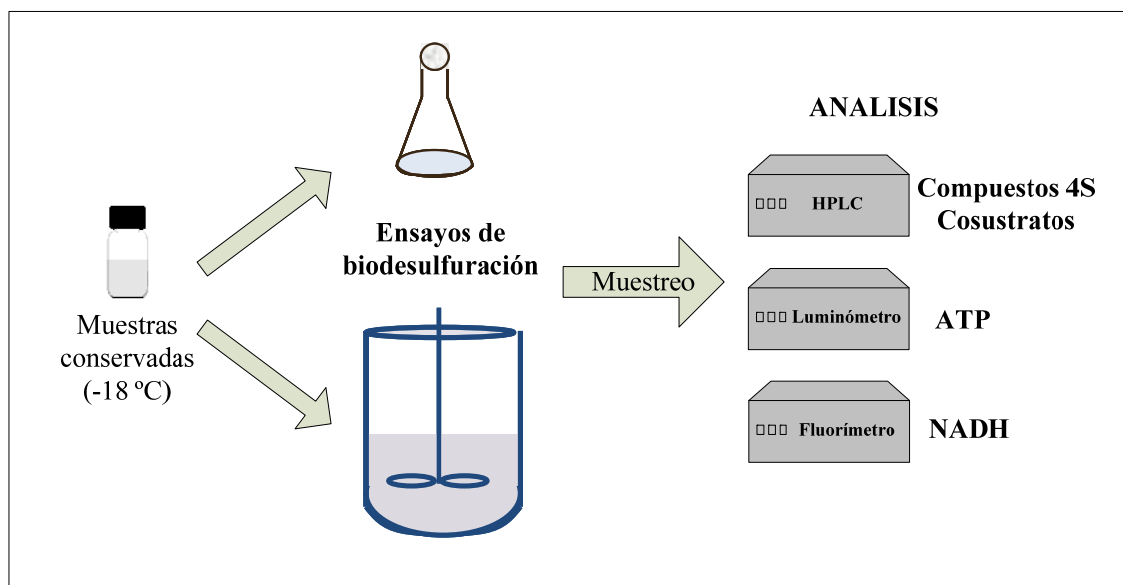


FIGURA 2.5. Esquema del procedimiento experimental seguido para estudiar el proceso de BDS en fase acuosa

2.3. MÉTODOS de ANÁLISIS

En este apartado se describen los métodos de análisis, junto con sus protocolos experimentales, empleados para la realización del presente trabajo.

2.3.1. Seguimiento de la biomasa

Para la medida de la cantidad de biomasa presente en el medio se ha empleado el método OD_{600} , la medida de la absorbancia del caldo a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible. Se ha realizado un calibrado para relacionar la absorbancia a 600 nm con la concentración de la biomasa en peso seco.

Para obtener la curva de calibrado, se crece el microorganismo en medio complejo LB en incubadora orbital a 210 rpm y 30 °C hasta que el medio alcanza una densidad óptica elevada. El caldo se centrifuga 10 minutos a 9000 rpm (13131 g) y se elimina el sobrenadante; la biomasa separada se seca en una estufa a 105 °C hasta

pesada constante. Se realizan diferentes diluciones del caldo y se mide la absorbancia de todas ellas. La linealidad entre concentración de biomasa y absorbancia se mantiene entre valores de 0,1 y 0,9 unidades de absorbancia. En el caso de que el valor de absorbancia de una muestra supere el extremo superior del intervalo, se diluye en agua ultrapura. Con los pares de valores concentración de biomasa – absorbancia y mediante regresión lineal se obtiene la ecuación [2.1] del tipo Lambert-Beer, que permite relacionar la absorbancia del caldo con un valor de concentración de biomasa en base seca. Los resultados del calibrado se muestran en la Figura 2.6.

$$C_x \text{ (g peso seco / L)} = 0,621 \cdot A_{600} \cdot \text{Dilución} \quad [2.1]$$

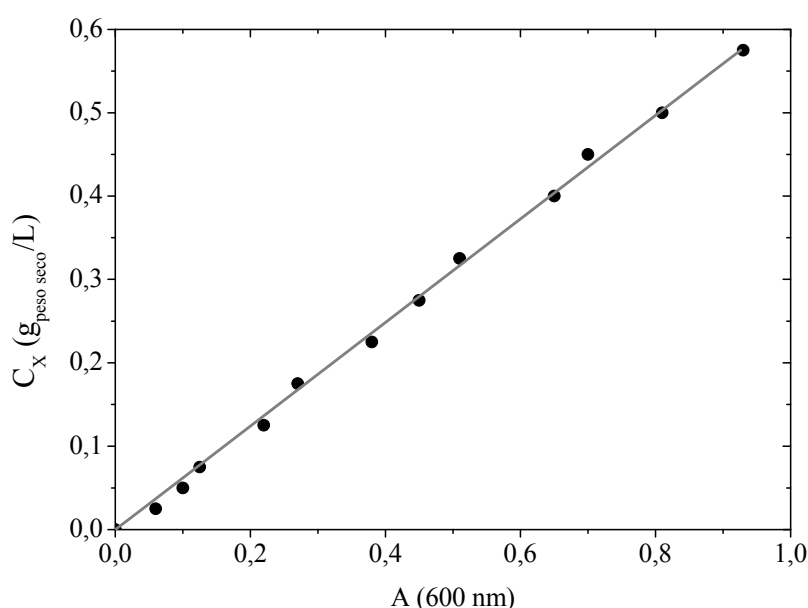


FIGURA 2.6. Curva de calibrado para la relación de absorbancia a 600 nm y concentración de biomasa en peso seco para *Pseudomonas putida* KTH2

2.3.2. Análisis de los compuestos de la ruta 4S

Para estudiar la capacidad desulfurante del microorganismo se analizaron los diferentes compuestos generados en la ruta 4S de desulfuración. Se ha empleado un método de análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando el equipo descrito anteriormente. Las características del método de análisis son las siguientes:

- Columna: Teknokroma® C18 5 µm 150 x 4,6 mm
- Fase móvil: Mezcla de acetonitrilo y agua ultrapura en relación 55:45

- Caudal: 1 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Volumen de inyección: 60 µL
- Detector: UV-diodo de array

La toma de muestras se realiza con una pipeta automática, se toman 0,5 mL para cada muestra y se mezclan con 0,5 mL de acetonitrilo en un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, de esta manera se detiene la reacción y se solubilizan los compuestos de la ruta 4S para su posterior análisis por HPLC.

Las muestras recogidas en los tubos *Eppendorf* se centrifugan durante 10 minutos a 14000 rpm (21480 g) en una ultracentrífuga. Con una pipeta automática se toman 0,7 mL del sobrenadante y se añaden a un vial de HPLC, donde se acidifican con 75 µL de HCl 35% por cada mL de muestra antes de ser analizado.

Los picos de los compuestos de la ruta 4S se monitorizan a las longitudes de onda y tiempos de retención que aparecen en la Tabla 2.8. La representación de un cromatograma tipo se muestra en la Figura 2.7. Las ecuaciones de calibrado obtenidas para cada uno de los compuestos de la ruta 4S se muestran a continuación y se representan en la Figura 2.8.

$$C_{DBT} = 0,0129 \cdot A \quad [2.2]$$

$$C_{DBTO} = 0,0347 \cdot A \quad [2.3]$$

$$C_{DBTO_2} = 0,0164 \cdot A \quad [2.4]$$

$$C_{HBPS} = 0,0179 \cdot A \quad [2.5]$$

$$C_{HBP} = 0,0181 \cdot A \quad [2.6]$$

TABLA 2.8. Tiempos de retención y longitudes de onda para la monitorización de los compuestos de la ruta 4S mediante HPLC

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Longitud de onda (nm)
DBT	14,2	234
DBTO	2,3	220
DBTO ₂	3,7	234
HBPS	9,1	206
HBP	8,5	206

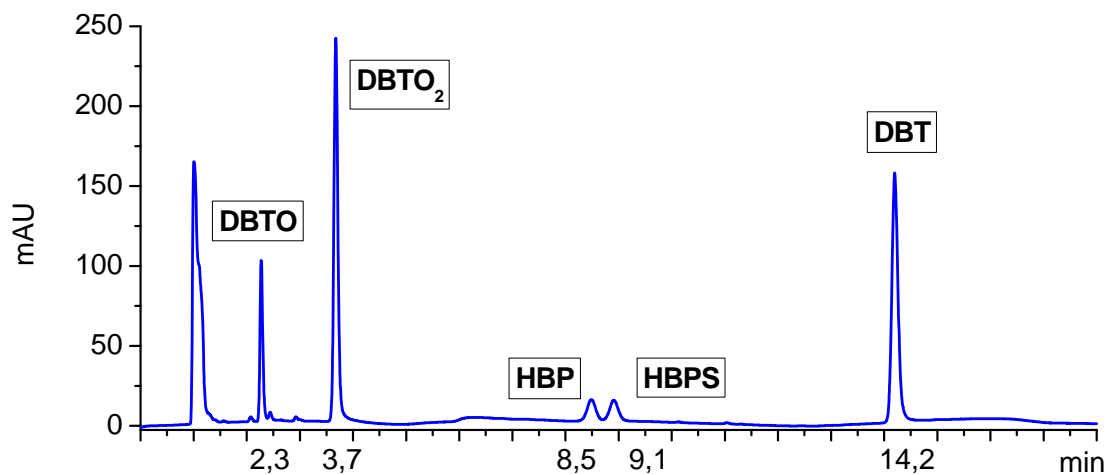


FIGURA 2.7. Cromatograma tipo obtenido por HPLC para el análisis de los compuestos de la ruta 4S

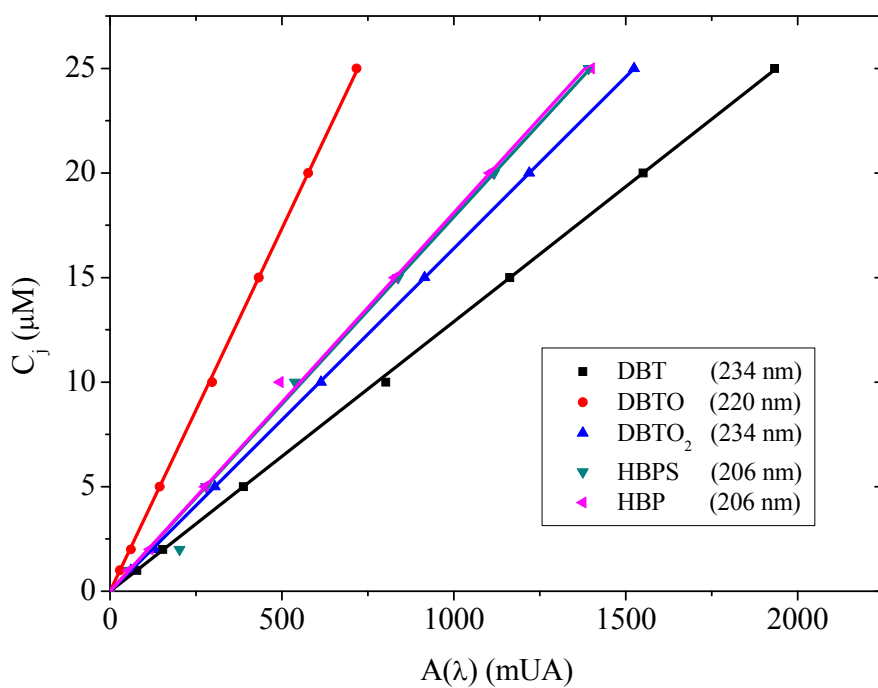


FIGURA 2.8. Rectas de calibrado que relacionan la concentración de los compuestos de la ruta 4S en fase acuosa con el área de los picos obtenidos por HPLC

2.3.3. Análisis de cosustratos

Se desarrolló un método de HPLC para la determinación de la concentración de los diversos cosustratos empleados en este trabajo. Las características del método de análisis son las siguientes:

- Columna: Phenomenex® Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8 %) 300 x 7,8 mm
- Fase móvil: Agua ácida (H₂SO₄ 5·10⁻³ M)
- Caudal: 0,5 mL/min
- Temperatura: 60 °C
- Volumen de inyección: 15 µL
- Detector: Índice de refracción (RID)

La toma de muestras se realiza con una pipeta automática, se toma 1 mL para cada muestra y se añade a un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL. Posteriormente, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 14000 rpm (21480 g) en una ultracentrífuga. Con una pipeta automática se toman 0,7 mL del sobrenadante y se añaden a un vial de HPLC para su análisis.

Los compuestos analizados son los ácidos acético, cítrico y succínico. Los picos de dichos compuestos se monitorizaron a los tiempos de retención que aparecen en la Tabla 2.9. Un cromatograma tipo se representa en la Figura 2.9. Las ecuaciones de calibrado para cada uno de los cosustratos se muestran a continuación.

$$C_{\text{acético}} = 9,13 \cdot 10^{-6} \cdot A \quad [2.7]$$

$$C_{\text{cítrico}} = 2,14 \cdot 10^{-8} \cdot A \quad [2.8]$$

$$C_{\text{succínico}} = 5,36 \cdot 10^{-6} \cdot A \quad [2.9]$$

TABLA 2.9. Tiempos de retención y longitudes de onda para la monitorización de DBT y HBP en fase orgánica mediante HPLC

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Ácido acético	19,3
Ácido cítrico	11,6
Ácido succínico	15,5

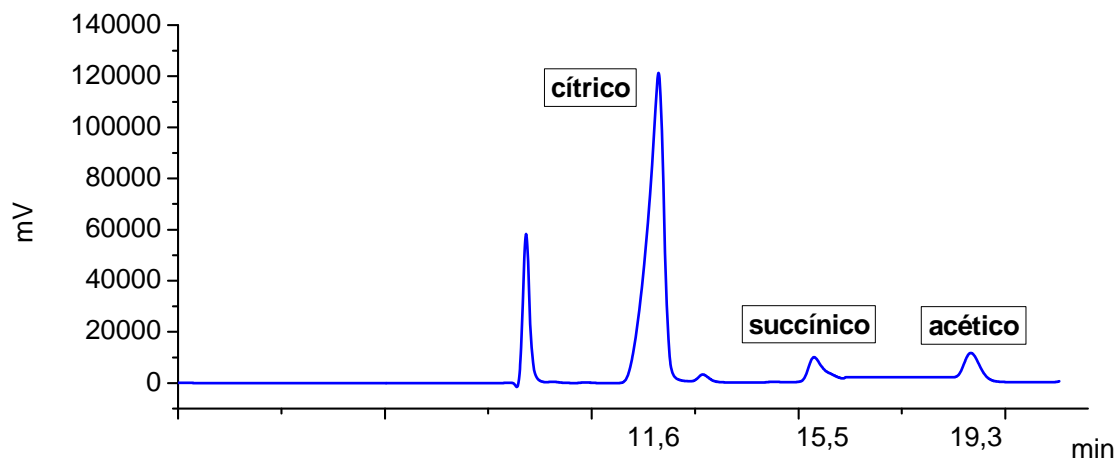


FIGURA 2.9. Cromatograma tipo obtenido por HPLC para el análisis de cosustratos

2.3.4. Análisis de ATP

Para estudiar el contenido energético de las células durante el proceso de desulfuración se analizó el ATP (tanto intracelular como extracelular) empleando el kit enzimático ATP Biomass Kit HS de la marca Biothema. El contenido del kit se muestra en la Tabla 2.10. El fundamento de este método de análisis es la reacción entre el ATP y el complejo luciferin-luciferasa para producir luz como se esquematiza en la ecuación [2.10].

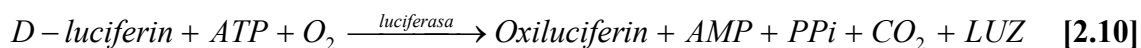


TABLA 2.10. Contenido del kit enzimático ATP Biomass Kit HS de la marca Biothema

Compuesto	Descripción
ATP Reagent HS	Liofilizado que contiene el complejo luciferin-luciferasa
Diluent B	Buffer para reconstituir el liofilizado enzimático
Extractant B/S	Solución para extraer el ATP intracelular y neutralizar las ATPasas
ATP Standard	Disolución de ATP 100 nM

La luz emitida se mide utilizando un luminómetro. El procedimiento de análisis es el siguiente:

- 1) Añadir 50 μL de Extractant B/S a una cubeta de luminómetro.
- 2) Añadir 50 μL de muestra (Diluida 10 veces en agua ultrapura).
- 3) Vortear la cubeta durante unos dos segundos.
- 4) Añadir 200 μL del reactivo reconstituido.
- 5) Vortear la cubeta durante unos dos segundos.
- 6) Medir la emisión de luz en el luminómetro durante 30 segundos.

Para poder relacionar la luz emitida con la concentración de ATP se obtuvo una curva de calibrado preparando distintas diluciones de concentración conocida de ATP (usando el ATP Standard incluido en el kit) y midiendo la emisión de luz de las mismas. El procedimiento para medir la emisión de luz de las muestras del calibrado es el mismo que para las muestras biológicas, utilizando disoluciones de ATP en el paso 2) del procedimiento anterior. Con los pares de valores Luz emitida – Concentración de ATP y mediante regresión lineal se obtiene la ecuación [2.11]. Los resultados del calibrado se muestran en la Figura 2.10. Si los valores de emisión de luz superan el límite de medida del equipo ($4 \cdot 10^8$ RLU, *Relative Light Units*), la muestra se diluye en agua ultrapura.

$$\text{ATP (nmol}_{\text{ATP}} / \text{g}_X) = 1,59 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{\text{RLU}}{C_X (\text{g/L})} \quad [2.11]$$

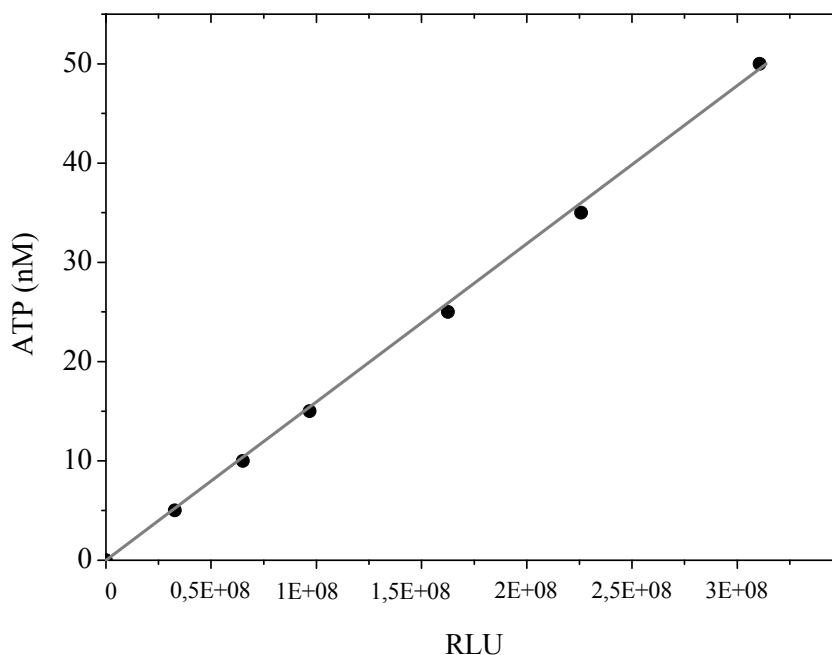


FIGURA 2.10. Curva de calibrado para la relación entre las unidades de luz emitidas y la concentración de ATP

2.3.5. Análisis de NADH

Debido a que el precursor de la ruta 4S de desulfuración es el NADH se desarrolló un método para su análisis, basado en medidas de fluorescencia de las muestras (Farabegoli y col, 2003). De los distintos métodos para extraer el NADH intracelular se optó por la extracción en tampón Tris caliente (Karl, 1980) debido a su mayor reproducibilidad respecto a otros métodos (Wos y Pollard, 2006). Para el análisis del NADH se utiliza un espectrofluorímetro. El procedimiento de extracción y análisis es el siguiente:

- 1) Se añade 1 mL de muestra en un tubo *Eppendorf*.
- 2) Se centrifuga la muestra a 14000 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante.
- 3) El pellet se resuspende en 3 mL de tampón Tris estéril a 80 °C.
- 4) El pellet resuspendido se mantiene en un tubo de ensayo a 80 °C en una estufa durante 20 minutos, posteriormente se enfría a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 5) Se centrifuga 1 mL de la muestra a 14000 rpm durante 10 minutos.
- 6) El sobrenadante se analiza en el espectrofluorímetro a las siguientes longitudes de onda: excitación a 340 nm y emisión a 440 nm.

Para relacionar los valores de absorbancia obtenidos con las concentraciones de NADH se realizó una curva de calibrado midiendo la absorbancia de muestras de concentración conocida de NADH. Para ello se resuspende el NADH comercial en tampón Tris a 80°C, se preparan disoluciones de concentración conocida y se sigue el método descrito anteriormente a partir del paso 4).

Con los pares de valores absorbancia – concentración de NADH y mediante regresión lineal se obtiene la ecuación [2.12]. Los resultados del calibrado se muestran en la Figura 2.11. Si los valores de absorbancia superan el límite de medida del equipo (1000 unidades), la muestra se diluye en agua ultrapura.

$$NADH (\mu mol_{NADH} / g_X) = 1,17 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{A_{440}}{C_X (g/L)} \quad [2.12]$$

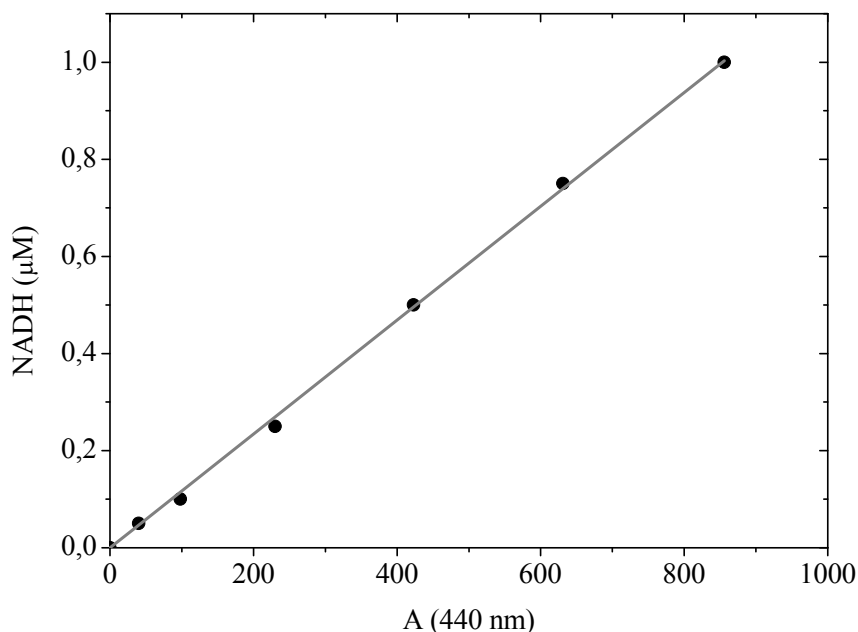


FIGURA 2.11. Curva de calibrado para la relación absorbancia - concentración de NADH

2.3.6. Observaciones en microscopio óptico

El procedimiento para el análisis de las muestras en el microscopio óptico es el siguiente:

- 1) Se añaden 5 μL de muestra sobre un portaobjetos.
- 2) Se cubre la muestra con un cubreobjetos.
- 3) Se presiona la muestra para fijar las células y detener su movimiento.
- 4) Se analiza la muestra directamente en el microscopio

2.3.7. Observaciones en microscopio electrónico de transmisión

Para el análisis de la ultra microestructura celular en el microscopio electrónico de transmisión se emplearon dos técnicas distintas. La preparación inicial de las muestras es común para ambas técnicas y consiste en su fijación con una disolución formada por paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2,5% en HEPES. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se añade 1 mL de muestra en un tubo *Eppendorf*
- 2) Se centrifuga la muestra a 5000 rpm durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante.
- 3) El pellet se resuspende en 1 mL de la disolución fijadora. Se conserva en nevera durante 4 horas.
- 4) Se realizan cuatro lavados con medio HEPES y se deja fijar overnight la muestra a 4 °C.

Tinción negativa

- 1) Se añade una gota de la muestra sobre parafilm.
- 2) Se coloca una rejilla recubierta de Formvar al 0,16 % sobre la muestra.
- 3) Se seca por capilaridad empleando un papel de filtro.
- 4) Se añade una gota de la solución de tinción (acetato de uranilo al 2 %) y se mantiene durante 20 segundos, posteriormente se vuelve a secar por capilaridad.
- 5) Se analiza la muestra en el microscopio electrónico de transmisión.

Cortes ultrafinos

- 1) Se realiza una posfijación añadiendo a la muestra 1 mL de tetróxido de osmio al 1 %. Se mantiene una hora a temperatura ambiente.
- 2) Se lava la muestra 3 veces en agua.
- 3) Se realiza una deshidratación mediante lavados con mezclas acetona:agua con concentración creciente de acetona (30% - 50% - 80% - 90% - 95% - 100%). El objetivo de este paso es la sustitución del agua intracelular por acetona.
- 4) Se realiza una infiltración con resina mediante lavados con mezclas de resina:acetona de concentración creciente de resina (25% - 50% - 75% - 100%) con el objetivo de sustituir la acetona intracelular por resina.
- 5) Se polimeriza la muestra a 70 °C durante, al menos, 72 horas.
- 6) Se realizan cortes ultrafinos (50-70 nm) con un ultramicrotomo.
- 7) Se tiñe la muestra con acetato de uranilo al 2 % durante 20 minutos y con citrato de plomo durante 3 minutos.
- 8) Se analiza la muestra en el microscopio electrónico de transmisión.

2.4. MÉTODOS MATEMÁTICOS

En este apartado se describen los métodos de cálculo y ajuste empleados en la presente Memoria para la interpretación de los resultados experimentales y la determinación de los modelos cinéticos propuestos.

Para la determinación de las velocidades de reacción y los parámetros que intervienen en las ecuaciones cinéticas se ha empleado el *método de las velocidades de producción* (García-Ochoa y col., 1993b), basado en la ecuación [2.13] que, de forma matricial se transforma en la ecuación [2.14]:

$$R_j = \sum_{i=1}^{NR} v_{ij} \cdot r_i, (j = 1, \dots, NC) \quad [2.13]$$

$$\mathbf{R} = \mathbf{v} \cdot \mathbf{r} \quad [2.14]$$

En trabajos previos (García-Ochoa y Romero, 1993) se desarrolló una metodología para la resolución de modelos cinéticos de redes de reacciones basada en la determinación de las ecuaciones cinéticas (y el cálculo de los valores de sus parámetros) de forma separada. Este método de cálculo se denomina *método de las velocidades de reacción*, y puede aplicarse en el caso de que la matriz de los coeficientes estequimétricos (\mathbf{v}) de la ecuación [2.14] sea cuadrada, despejándose el vector de velocidades de reacción (\mathbf{r}) y obteniendo la ecuación [2.15]:

$$\mathbf{r} = \mathbf{v}^{-1} \cdot \mathbf{R} \quad [2.15]$$

La aplicación de este método permite obtener valores discretos de la velocidad de las distintas reacciones presentes en la red. Una vez conocidos dichos valores, es posible determinar la forma de la función de la ecuación cinética que mejor represente la evolución para cada una de las reacciones.

Ambos métodos de cálculo presentados pueden aplicarse tanto de forma diferencial como integral, sin embargo, en la presente Memoria se van a aplicar en su forma integral, debido a que ésta presenta un error menor que la forma diferencial (García Ochoa y col., 1992 y 1993b).

Para la determinación de los modelos cinéticos y su simulación, se han empleado los dos métodos descritos anteriormente. El método de las velocidades de reacción se ha empleado, además, para la obtención de valores iniciales de los parámetros cinéticos.

Para la optimización de los valores de dichos parámetros, así como para la simulación de los modelos cinéticos se ha empleado el método de las velocidades de producción. El proceso de determinación de un modelo cinético se esquematiza en la Figura 2.12.

En el presente trabajo se ha empleado un método de ajuste no lineal. El algoritmo utilizado ha sido el denominado NL2SOL (non-linear least-squares solver), que emplea como función objetivo la minimización de la suma del cuadrado de los residuos (SCR), según la ecuación [2.16] (Dennis y col., 1981). Para aplicar el método integral es necesario acoplar al algoritmo anterior uno de integración numérica, en este caso el método implícito de Euler con paso variable, lo que permite tener un control del error, un menor gasto de recursos de cálculo y una mayor precisión en los resultados (Gautschi, 1997).

$$SCR = \sum_{j=1}^{NR} \frac{\sum_{i=1}^{Ndat} (C_j^{\text{exp}} - C_j^{\text{teo}})_i^2}{N} \rightarrow \text{mínimo} \quad [2.16]$$

En función del método de cálculo empleado, el método de ajuste se ha aplicado en simple respuesta (método de las velocidades de reacción), o en múltiple respuesta (método de las velocidades de producción).

La bondad del ajuste se ha determinado atendiendo a los siguientes parámetros estadísticos: *F de Fischer*, indicativo del grado global de ajuste y *SRC*, indicativo de la calidad en la reproducción de los datos experimentales. La comprobación de la bondad del ajuste se ha realizado a partir de la comparación con los valores de los parámetros estadísticos calculados, con los tabulados para el 95% de confianza, según el número de parámetros a calcular y el número de grados de libertad.

Para la realización de los cálculos explicados en este Apartado, se ha empleado el software Aspen Custom Modeler® v7.1.

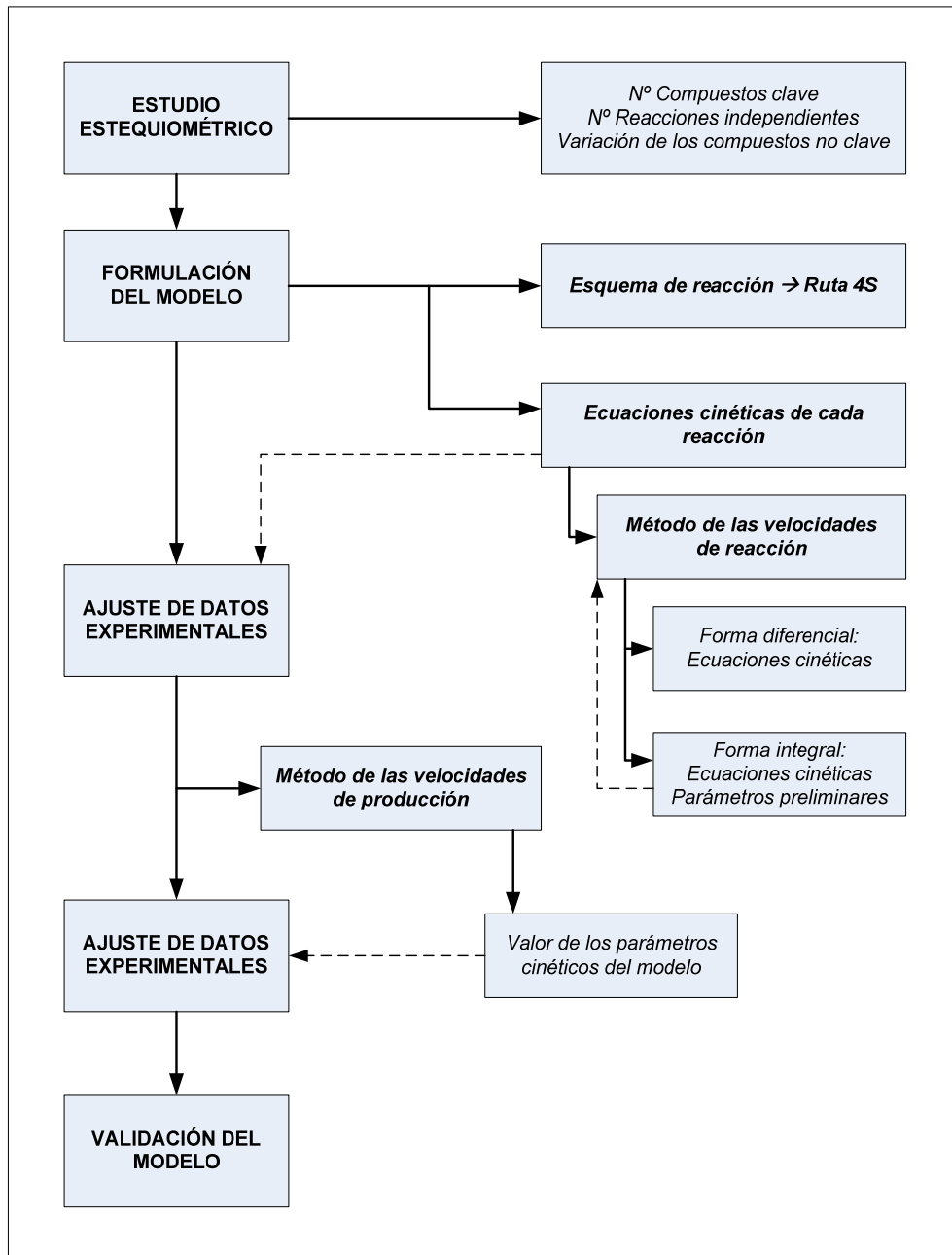


FIGURA 2.12. Esquema del proceso de desarrollo de un modelo cinético

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Dennis, J.E.; Gay, D.M. y Welsch, R.E. (1981). Algorithm 573: NL2SOL - An adaptive nonlinear least-squares algorithm. *ACM T. Math. Software.* 7, 369-383.

Farabegoli, G.; Hellinga, C.; Heijnen, J.J. y Van Loosdrecht, M.C.M. (2003). Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring wastewater treatment systems. *Water Res.* 37, 2732-2738.

- Galán, B.; Díaz, E. y García, J.L. (2000). Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysis. *Environ. Microbiol.* 2, 687-694.
- Gallardo, M.E.; Fernández, A.; de Lorenzo, V.; García, J.L. y Díaz, E. (1997). Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J. Bacteriol.* 179, 7156-7160.
- García-Ochoa, F.; Romero, A. y Santos, V.E. (1992). Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *Int. Chem. Eng.* 32, 538-551.
- García-Ochoa, F. y Romero, A. (1993). Kinetic modeling of reaction networks. *Trends Chem. Eng.* 1, 285-305.
- García-Ochoa, F.; Romero, A.; Santos, V.E. y Rodríguez, C.O. (1993b). Studies of the use of the differential method in the determination of kinetic models for complex reactions. *Int. Chem. Eng.* 33, 634-648.
- Gautschi, W. (1997). *Numerical analysis; an introduction*. Editorial Birkhäuser, Boston (USA).
- Karl, D. (1980). Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44, 739-796.
- Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2004). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene biodesulfurization for different media compositions. *Energy Fuels.* 18, 851-857.
- Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2005). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels.* 19, 775-782.
- Poblete-Castro, I.; Becker, J.; Dohnt, K.; dos Santos, V.M. y Wittmann, Ch. (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2279-2290.
- Wos, M. y Pollard, P. (2006). Sensitive and meaningful measures of bacterial metabolic activity using NADH fluorescence. *Water Res.* 40, 2084-2092.

**3. BIODESULFURACIÓN CON
CÉLULAS DE DISTINTA EDAD:
MODELO CINÉTICO**

CAPÍTULO 3.- BIODESULFURACIÓN CON
CÉLULAS DE DISTINTA EDAD:
MODELO CINÉTICO

Indice

3.1.	<i>ESTUDIO de la BDS con CÉLULAS de DISTINTA EDAD.....</i>	124
3.1.1.	<i>Resultados experimentales</i>	125
3.1.2.	<i>Discusión de los resultados.....</i>	129
3.2.	<i>FORMULACIÓN de un MODELO CINÉTICO EMPÍRICO</i>	135
3.3.	<i>MODELO CINÉTICO INCLUYENDO la CONCENTRACIÓN de</i> <i>EQUIVALENTES REDUCIDOS.....</i>	150
3.3.1.	<i>Evolución de la concentración de NADH. Resultados experimentales</i>	151
3.3.2.	<i>Determinación del modelo cinético.....</i>	152
3.4.	<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	161

CAPÍTULO 3

BIODESULFURACIÓN CON CÉLULAS DE DISTINTA EDAD: MODELO CINÉTICO

En este capítulo se desarrolla un modelo cinético para describir la evolución de los compuestos de la ruta 4S de biodesulfuración (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) empleando como biocatalizador células de *Pseudomonas putida* KTH2 en estado de *resting cells*.

Como se ha comentado con anterioridad, en estudios previos del grupo de investigación se ha descrito la influencia que el tiempo de crecimiento del microorganismo tiene sobre las actividades de las enzimas que catalizan la ruta 4S (Calzada y col., 2007). Dicho estudio se realizó con *Pseudomonas putida* CECT5279, una bacteria modificada genéticamente similar a la empleada en este trabajo. Los resultados mostraron que la máxima actividad desulfinasas, aportada por la enzima DszB se obtiene con células de 5 horas de edad de crecimiento, mientras que la máxima actividad monooxigenasa (enzimas DszA y DszC) se logra empleando células de 23 horas de edad de crecimiento. Una vez determinadas estas dos edades singulares de crecimiento (5 y 23 horas), el siguiente paso fue la formulación de un biocatalizador formado por mezclas de ambas edades para aprovechar de una forma óptima las distintas actividades enzimáticas. La mezcla óptima determinada está compuesta por un 66 % de células de 23 horas de edad y un 33 % de células de 5 horas de edad, siendo la concentración total de biomasa de 2,1 g/L (Calzada y col., 2011).

En este trabajo, se va a estudiar la mezcla de células de distinta edad de *Pseudomonas putida* KTH2. Debido a la alta capacidad desulfurante mostrada por la mezcla celular, en este estudio se propone el empleo de la operación en *fed-batch*, que permite el desarrollo del proceso durante un tiempo de experimentación mayor para avanzar en el conocimiento del comportamiento de un sistema en continuo.

Los modelos cinéticos desarrollados en este capítulo se determinarán considerando las células de 5 y 23 horas de edad de crecimiento como biocatalizadores independientes. El modelo cinético así obtenido se empleará para simular el comportamiento de la mezcla celular, tanto en operación en *batch*, como en *fed-batch*, para comprobar su validez.

3.1. ESTUDIO de la BDS con CÉLULAS de DISTINTA EDAD

En este apartado se detallan los experimentos de eliminación de DBT en *resting cells* realizados para estudiar el poder desulfurante de *Pseudomonas putida* KTH2 en diversas condiciones.

Los experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer* empleando células de dos edades de crecimiento diferentes (5 y 23 h) y la mezcla celular óptima determinada previamente (Calzada y col., 2011). Para estudiar la influencia del tiempo de operación en el proceso de biodesulfuración, se realizará también un experimento de desulfuración en *fed-batch*, empleando la mezcla celular óptima como biocatalizador.

Las células se obtienen siguiendo el protocolo estandarizado descrito en el apartado 2.2.1 de la presente Memoria. Los experimentos de desulfuración se realizan en estado de *resting cells* en un medio tamponado, de acuerdo al procedimiento explicado en el apartado 2.2.2. En todos los casos se emplea DBT como sustrato azufrado, con una concentración inicial de 25 μM ; en el experimento en *fed-batch*, se realizaron varias adiciones de DBT, alcanzando la misma concentración inicial. La concentración de biomasa es de 0,7 g/L o 2,1 g/L, cuando en los experimentos se emplea únicamente una edad celular, y de 2,1 g/L cuando se emplea la mezcla óptima como biocatalizador (0,7 g/L de células de 5 h de edad y 1,4 g/L de células de 23 h de edad). La planificación experimental para este estudio se muestra en la Tabla 3.1.

TABLA 3.1. Planificación experimental para el estudio de la BDS en *resting cells*

Experimento	$C_{X_{5h}}$ (g/L)	$C_{X_{23h}}$ (g/L)	DBT ₀ (μM)	t (min)	Operación
BDS-1	0,7	-	25	180	<i>Batch</i>
BDS-2	2,1	-	25	180	<i>Batch</i>
BDS-3	-	0,7	25	180	<i>Batch</i>
BDS-4	-	2,1	25	180	<i>Batch</i>
BDS-5	0,7	1,4	25	180	<i>Batch</i>
BDS-6	0,7	1,4	100 (25x4)	300	<i>Fed-batch</i>

3.1.1. Resultados experimentales

A continuación, en las Tablas 3.2 a 3.7, se presentan los resultados de los experimentos mostrados en la Tabla 3.1. Para cada experimento se ha medido la concentración de los compuestos clave involucrados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP) siguiendo el método de análisis explicado en el apartado 2.3.2. En todos los casos la concentración de HBPS se ha determinado por la estequiometría del sistema, aplicando la ecuación [3.1]. En el experimento BDS-04, correspondiente a la operación en *fed-batch* empleando la mezcla óptima como biocatalizador, se han realizado cuatro adiciones de DBT, cada una con una concentración de 25 μM; los tiempos de adición de DBT fueron 0, 45, 100 y 200 minutos, es decir, cuando todo el DBT de cada adición previa se ha consumido completamente.

$$C_{\text{HBPS}}^t = C_{\text{DBT}}^0 - (C_{\text{DBT}}^t + C_{\text{DBTO}}^t + C_{\text{DBTO}_2}^t + C_{\text{HBP}}^t) \quad [3.1]$$

TABLA 3.2. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para el Experimento BDS-1

t (min)	C _{DBT} (μM)	C _{DBTO} (μM)	C _{DBTO₂} (μM)	C _{HBPS} (μM)	C _{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	23,42	1,58	0,00	0,00	0,00
10	21,23	3,17	0,60	0,00	0,00
15	19,36	3,58	1,83	0,23	0,00
20	17,57	3,81	2,50	0,61	0,51
30	14,18	4,11	3,87	1,49	1,35
45	9,36	3,93	6,35	2,80	2,56
60	5,36	3,62	8,02	4,22	3,78
90	1,86	2,06	9,06	6,92	5,10
120	0,69	0,65	8,30	9,39	5,97
150	0,00	0,00	6,41	12,05	6,54
180	0,00	0,00	4,20	13,71	7,09

TABLA 3.3. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para el Experimento BDS-2

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	20,43	1,02	1,53	0,00	2,02
15	16,12	3,21	2,66	0,00	3,01
30	9,28	3,25	6,35	0,23	5,89
45	5,61	1,90	10,12	0,41	6,96
60	2,56	0,77	12,64	0,48	8,55
90	0,20	0,00	12,55	0,70	11,55
120	0,00	0,00	9,98	1,16	13,86
150	0,00	0,00	6,15	1,50	17,35
180	0,00	0,00	2,75	1,83	20,42

TABLA 3.4. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para el Experimento BDS-3

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	21,33	1,96	1,71	0,00	0,00
10	19,03	2,51	2,61	0,33	0,52
15	16,81	2,71	3,22	0,87	1,39
20	14,88	2,92	3,67	1,26	2,27
30	10,27	3,12	4,53	2,45	4,63
45	5,22	2,94	5,22	4,07	7,55
60	2,75	2,21	5,14	5,77	9,13
90	0,98	0,82	3,31	8,57	11,32
120	0,00	0,00	1,62	11,07	12,31
150	0,00	0,00	0,58	11,51	12,91
180	0,00	0,00	0,00	11,96	13,04

TABLA 3.5. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para el Experimento BDS-4

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	14,60	1,36	1,51	2,23	5,30
15	9,78	2,49	2,39	3,21	7,13
30	3,27	0,63	0,94	6,45	13,71
45	0,43	0,00	0,25	6,79	17,53
60	0,00	0,00	0,00	5,46	19,54
90	0,00	0,00	0,00	3,50	21,50
120	0,00	0,00	0,00	1,65	23,35
150	0,00	0,00	0,00	0,77	24,23
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 3.6. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para el Experimento BDS-5

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,25	2,44	1,93	0,42	3,96
10	9,77	3,01	4,98	1,44	5,80
15	4,53	2,52	5,64	3,06	9,25
20	1,56	1,33	5,12	4,19	12,80
30	0,00	0,00	3,24	4,16	17,60
45	0,00	0,00	0,00	2,92	22,08
60	0,00	0,00	0,00	1,14	23,86
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 3.7. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para el Experimento BDS-6

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,25	2,44	1,93	0,42	3,96
10	9,77	3,01	4,98	1,44	5,80
15	4,53	2,52	5,64	3,06	9,25
20	1,56	1,33	5,12	4,19	12,80
30	0,00	0,00	3,24	4,16	17,60
45	25,00	0,00	0,00	2,92	22,08
50	18,14	3,56	1,74	4,58	21,98
60	8,85	3,79	2,59	10,92	23,85
65	5,19	2,35	2,49	15,07	24,90
75	0,00	1,52	3,42	17,62	27,44
90	0,00	0,00	1,60	20,38	28,02
100	25,00	0,00	0,00	20,82	29,18
105	18,26	2,36	0,88	24,72	28,78
110	14,13	3,33	1,44	26,32	29,78
115	10,12	3,34	1,79	28,72	31,03
120	7,79	2,86	2,00	29,07	33,28
130	3,45	2,09	2,47	33,20	33,79
145	0,00	0,88	1,91	38,04	34,17
160	0,00	0,00	1,44	38,47	35,09
180	0,00	0,00	0,63	39,15	35,22
200	25,00	0,00	0,00	39,37	35,63
205	19,84	0,69	0,62	41,43	37,42
210	16,68	0,87	0,84	43,14	38,47
220	9,22	0,36	0,40	51,34	38,68
230	5,05	0,00	0,22	56,42	38,31
245	1,84	0,00	0,00	61,07	37,09
260	0,00	0,00	0,00	63,56	36,44
280	0,00	0,00	0,00	62,02	37,98
300	0,00	0,00	0,00	61,86	38,14

3.1.2. Discusión de los resultados

En la Figura 3.1 se muestra la comparación en la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP, respectivamente) para los experimentos BDS-1 y BDS-3. En general, confirman los datos obtenidos previamente en experimentos previos del grupo de investigación con *Pseudomonas putida* CECT5279 (Calzada, 2010).

Se observa que la velocidad de eliminación de DBT es mayor para células de 23 h respecto a las células de 5 h; sin embargo, el tiempo necesario para su completa degradación es similar para las dos edades: 120 minutos para células de 23 h y 150 minutos para células de 5 h.

Respecto a la evolución de DBTO, se observa que el DBTO acumulado se elimina antes cuando se emplean células de 23 h (120 minutos) que cuando se emplean células de 5 h (150 minutos).

La evolución de la concentración de DBTO₂ durante el proceso muestra que, al emplear células de 5 h, éstas no son capaces de eliminar todo el DBTO₂ generado en los 180 minutos que dura el experimento. Las células de 23 h emplean 180 minutos en eliminarlo.

Se observa que en ninguno de los experimentos en los que se emplean células de una sola edad como biocatalizador se elimina todo el HBPS producido. Al finalizar el experimento, queda una concentración de HBPS de 13,7 µM si se emplean células de 5 h de edad, y de 12,0 µM en el caso de utilizar células de 23 h de edad.

En cuanto la evolución de la concentración del compuesto final, HBP, en ninguno de los experimentos se consigue la conversión completa. Al emplear células de 23 h de edad se produce más HBP (13,0 µM) que con células de 5 h de edad (7,1 µM).

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Figura 3.1, se observa que se produce una ralentización del proceso con el tiempo. La formación de los compuestos DBTO y DBTO₂ se produce de una manera más rápida que su posterior degradación. La formación del producto final, HBP, también sufre una ralentización con el tiempo, tal y como se muestra en la Figura 3.1.

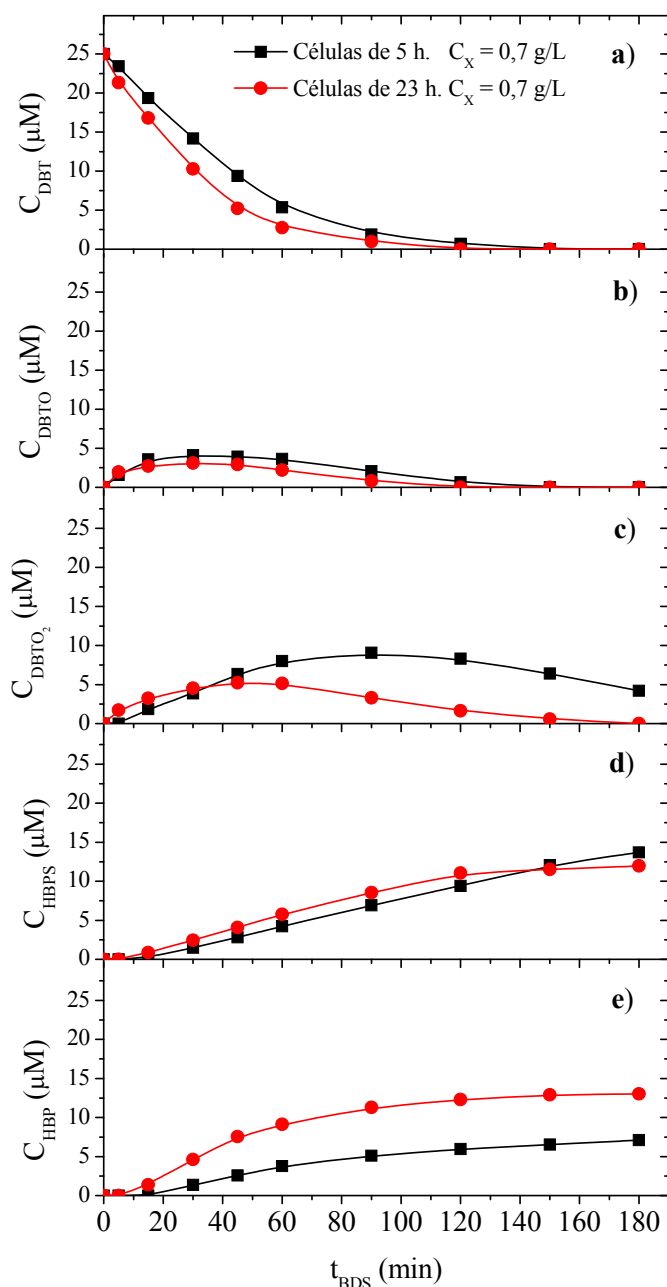


FIGURA 3.1. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para los experimentos BDS-1 y BDS-3. a) concentración de DBT; b) concentración de DBTO; c) concentración de DBTO₂; d) concentración de HBPS; e) concentración de HBP

En la Figura 3.2 se muestra la comparación en la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para los experimentos BDS-2, BDS-4 y BDS-5. Los resultados obtenidos confirman la idoneidad de emplear la mezcla celular optimizada por el grupo de investigación (Calzada y col., 2011) respecto de células de una misma edad celular. En dicha figura se observa que la evolución de la concentración de todos los compuestos transcurre con mayor velocidad al emplear como biocatalizador la

mezcla celular. Es de especial interés la evolución del compuesto final de la ruta 4S, HBP; en el caso de utilizar la mezcla celular óptima, se alcanza la conversión completa a HBP a los 90 minutos de experimento, usando células de 23 horas de edad la conversión completa se alcanza a los 180 minutos, mientras que al emplear células de 5 horas de edad únicamente se alcanza una conversión del 82 %.

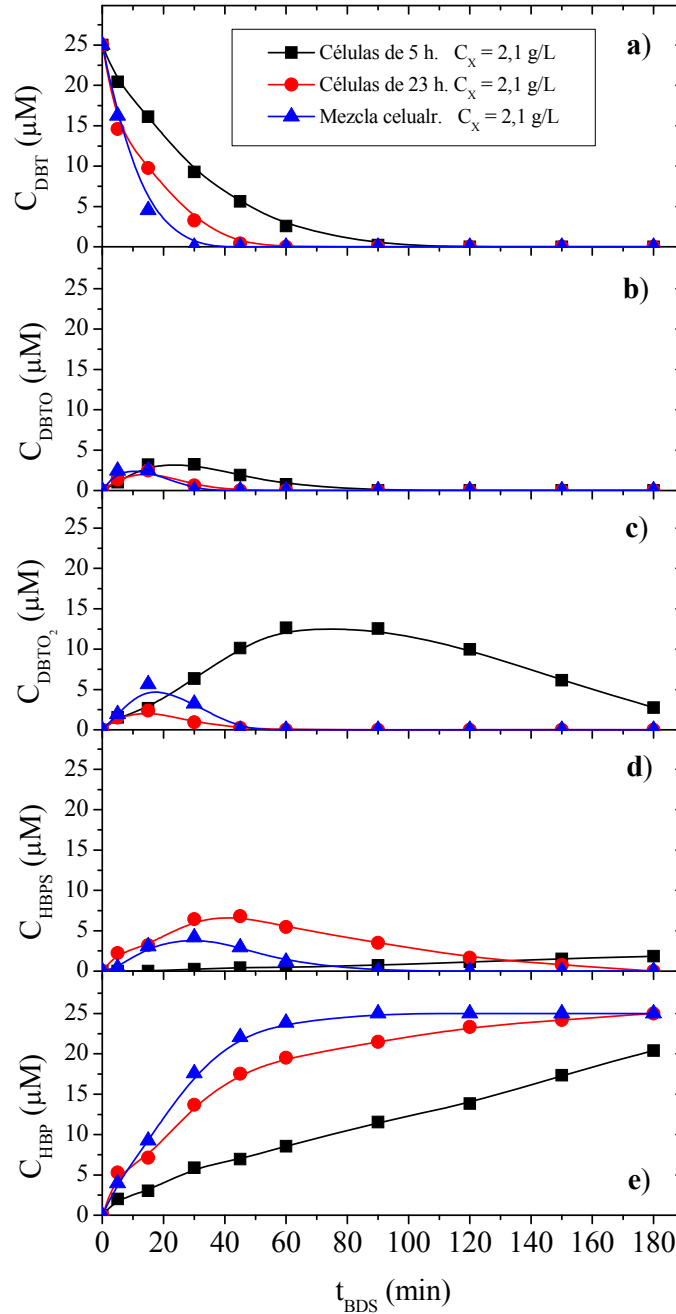


FIGURA 3.2. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S para los experimentos BDS-2, BDS-4 y BDS-5. a) concentración de DBT; b) concentración de DBTO; c) concentración de DBTO₂; d) concentración de HBPS; e) concentración de HBP

Para establecer una comparación del proceso de BDS en distintas condiciones de operación se han empleado los siguientes parámetros:

Grado de desulfuración máximo (X_{BDS}^{max})

Este parámetro representa la máxima capacidad desulfurante que presentan las células en las condiciones de desulfuración detalladas en el apartado 2.2.2 de la presente Memoria. Relaciona la mayor concentración de compuesto final alcanzada y la concentración inicial del compuesto azufrado de partida, según la ecuación [3.2].

$$X_{BDS}^{max} = \frac{C_{HBP}^{max}}{C_{DBT}^0} \quad [3.2]$$

Tiempo de desulfuración máximo (t_{BDS}^{max})

Se trata del tiempo necesario para alcanzar la máxima conversión de DBT a HBP según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.

Velocidad inicial de eliminación de DBT (R_{DBT}^0)

Muestra la capacidad de eliminación inicial del sustrato azufrado de partida (DBT), según la ecuación [3.3].

$$R_{DBT}^0 = -\left. \frac{dC_{DBT}}{dt} \right|_{t=0} \quad [3.3]$$

Productividad máxima (P_{BDS}^{max})

Parámetro que muestra la máxima conversión de DBT a HBP referida al tiempo necesario para alcanzarla, es decir, relaciona el grado y el tiempo de desulfuración máximos, según la expresión [3.4].

$$P_{BDS}^{max} = \frac{X_{HBP}^{max}}{t_{BDS}^{max}} \quad [3.4]$$

En la Tabla 3.8 se muestran los valores de los diferentes parámetros utilizados para caracterizar el proceso de desulfuración.

En el experimento BDS-2, al triplicar la concentración de biomasa respecto al experimento BDS-1, se obtienen unos parámetros de grado de desulfuración máxima y

velocidad inicial de eliminación de DBT tres veces superiores, comprobándose así el efecto aditivo que supone el aumento en la concentración de biomasa. En ninguno de los dos experimentos se consigue una conversión completa a HBP.

En el experimento BDS-4, se consigue la conversión completa a HBP en 180 minutos, mientras que la velocidad inicial de eliminación de DBT es tres veces mayor que la correspondiente al experimento BDS-3.

En el experimento BDS-5 la conversión completa a HBP se obtiene en 90 minutos y la velocidad inicial de eliminación de DBT confirma el efecto aditivo de cada edad celular. El valor de productividad máxima es el mayor de todos los experimentos realizados, de manera que se justifica el empleo de la mezcla celular como biocatalizador óptimo.

TABLA 3.8. Parámetros obtenidos para los experimentos de biodesulfuración en resting cells para los experimentos BDS-1 a BDS-5

Experimento	C _{X5h} (g/L)	C _{X23h} (g/L)	X _{BDS} ^{máx}	t _{BDS} ^{X_{BDS}^{máx}} (min)	R _{DBT} ⁰ (μmol/L·min)	P _{BDS} ^{máx} (min ⁻¹)
BDS-1	0,7	-	0,28	180	0,32	0,16·10 ⁻²
BDS-2	2,1	-	0,82	180	0,92	0,46·10 ⁻²
BDS-3	-	0,7	0,52	180	0,73	0,29·10 ⁻²
BDS-4	-	2,1	1,00	180	2,08	0,56·10 ⁻²
BDS-5	0,7	1,4	1,00	90	1,75	1,11·10 ⁻²

En el experimento BDS-4, correspondiente al proceso en *fed-batch*, se observa que, al ir realizando las adiciones de DBT, la cuarta reacción, correspondiente a la transformación de HBPS a HBP, se va ralentizando hasta casi detenerse, lo que se traduce en una disminución de la cantidad de HBP producido en cada ciclo de adición de DBT. Este efecto se muestra en la Figura 3.3, en la que se compara la producción de HBP en cada ciclo de adición de DBT, parámetro determinado por la ecuación [3.5].

$$P_{\text{HBP}} = \left. \frac{\Delta C_{\text{HBP}}}{\Delta t} \right|_{\text{ciclo}} \quad [3.5]$$

La Tabla 3.9 muestra los valores de los parámetros empleados para caracterizar el proceso de biodesulfuración en el experimento BDS-4; para su cálculo se ha considerado individualmente cada ciclo de adición de DBT. Puede observarse que el rendimiento máximo, la velocidad inicial de eliminación de DBT y la productividad disminuyen en cada adición de DBT.

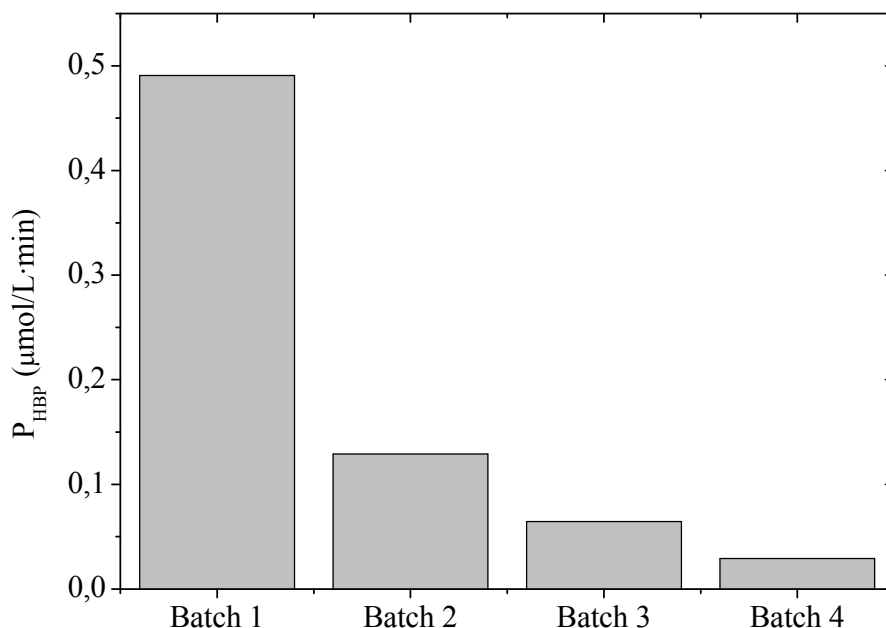


FIGURA 3.3. *Producción específica de HBP en cada ciclo de adición de DBT en experimento de desulfuración en resting cells en fed-batch*

TABLA 3.9. *Parámetros obtenidos para los experimentos de biodesulfuración en resting cells para el experimento BDS-4*

Adición	$X_{BDS}^{máx}$	R_{DBT}^0 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)	$P_{BDS}^{máx}$ (min^{-1})
1	0,88	1,56	$1,96\cdot 10^{-2}$
2	0,28	1,37	$0,52\cdot 10^{-2}$
3	0,26	1,35	$0,26\cdot 10^{-2}$
4	0,12	1,03	$0,12\cdot 10^{-2}$

3.2. FORMULACIÓN de un MODELO CINÉTICO EMPÍRICO

En este apartado se desarrolla un modelo cinético para describir la evolución con el tiempo de la concentración de los compuestos implicados en la ruta 4S de degradación de DBT (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP). Como biocatalizadores se emplean células de *Pseudomonas putida* KTH2 de distinta edad celular (5 y 23 h) y la mezcla óptima de ambas edades, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

Un modelo cinético consiste en la definición de ecuaciones que relacionan velocidades y concentraciones de productos y reactivos que, integradas en un balance de materia, permiten la predicción de la conversión de los sustratos y el rendimiento de cada producto en unas condiciones de operación dadas (Nielsen y Villadsen, 1992).

El desarrollo de un modelo cinético consta de las siguientes etapas (García-Ochoa y Romero, 1993):

1. **Estudio estequiométrico del sistema de reacciones**, para obtener los compuestos clave del mismo y el número de reacciones independientes.
2. **Formulación del modelo cinético**, que consiste en la suposición de uno o varios esquemas de reacción y suposición de ecuaciones cinéticas para cada reacción.
3. **Determinación de valores de los parámetros del modelo**, mediante el ajuste a datos experimentales. En este estudio, se empleará el *método de las velocidades de reacción* para calcular los valores preliminares de dichos parámetros y el *método de las velocidades de producción* para obtener los valores definitivos (García-Ochoa y col., 1992)
4. **Discriminación de los modelos propuestos**, mediante la aplicación de criterios estadísticos y físicos a los parámetros obtenidos en el punto anterior.

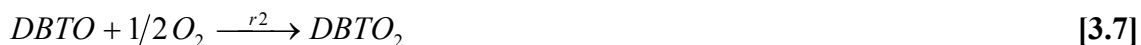
En este apartado se propone la aplicación de un modelo cinético previamente desarrollado para *Pseudomonas putida* CECT5279 (Calzada y col., 2012) al proceso de biodesulfuración llevado a cabo por *Pseudomonas putida* KTH2. Para ello, se han determinado los parámetros cinéticos correspondientes a las dos edades celulares estudiadas y posteriormente, considerando un comportamiento aditivo, se ha simulado el proceso empleando la mezcla celular tanto en *batch* como en *fed-batch*.

Estudio estequiométrico

Los compuestos que intervienen en la ruta 4S son: DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS, HBP, O₂, H₂O, SO₃²⁻, NADH, NAD⁺, FMN y FMNH₂ (Gray y col., 1996). Mediante la aplicación del algoritmo de Gauss sobre la matriz reacciones-especies de un sistema (Schubert y Hofman, 1976), se puede conocer el número y un grupo posible de compuestos clave que intervienen en él. Para la ruta 4S resultan ser cuatro, escogiéndose DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP (Martín, 2005).

Esquema de reacción

El esquema de reacción de la ruta 4S, mostrado en la Figura 1.12, consiste en cuatro reacciones en serie y una en paralelo. En estudios previos del grupo de investigación (Alcón y col., 2005), se demostró que la concentración inicial de equivalentes reducidos (NADH y FMNH₂) no limita la velocidad global del proceso de biodesulfuración. Por ello, el esquema de reacción se simplificó a las siguientes expresiones (Hernández, 2006):

**Ecuaciones cinéticas**

En un estudio previo del grupo de investigación (Alcón y col., 2008) se plantearon ecuaciones cinéticas que describen la velocidad de las cuatro reacciones del esquema anterior. Para las tres primeras reacciones se obtuvieron cinéticas tipo Michaelis-Menten, mientras que la última reacción presenta una cinética de inhibición competitiva por HBP.

En un estudio posterior (Calzada y col., 2012), se observó que a tiempos de reacción superiores a 90 minutos, las ecuaciones cinéticas planteadas no representaban bien el sistema, proponiéndose la incorporación de una desactivación enzimática de primer orden en las cuatro reacciones, obteniendo las siguientes ecuaciones:

$$r_1 = \frac{k_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT}}{K_1 + C_{DBT}} \cdot C_X \quad [3.10]$$

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [3.11]$$

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2}}{K_3 + C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [3.12]$$

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{K_4 \left(1 + \frac{C_{HBP}}{K_I} \right) + C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.13]$$

Las ecuaciones [3.10] a [3.13] son de tipo hiperbólico por ello, para evitar los problemas de convergencia que presentan este tipo de ecuaciones, se dividió el numerador y el denominador por el parámetro de afinidad por el sustrato, K_i , de cada ecuación, obteniendo el siguiente sistema de ecuaciones:

$$r_1 = \frac{k'_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT}}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \cdot C_X \quad [3.14]$$

$$r_2 = \frac{k'_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO}}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [3.15]$$

$$r_3 = \frac{k'_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [3.16]$$

$$r_4 = \frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K'_I \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.17]$$

Formulación del modelo cinético

Aplicando el *método de las velocidades de producción* (explicado en el apartado 2.4 de las presente Memoria), mediante la expresión [3.18], se pueden expresar las velocidades de producción de cada compuesto clave (R_j) en función de las velocidades de reacción (r_i). Teniendo en cuenta la estequiometría de la ruta 4S se obtienen las ecuaciones [3.19] a [3.23].

$$R_j = \sum_{i=1}^{NC} v_{ij} \cdot r_j, (j = 1, \dots, NC) \quad [3.18]$$

$$R_{DBT} = \frac{dC_{DBT}}{dt} = -r_1 \quad [3.19]$$

$$R_{DBTO} = \frac{dC_{DBTO}}{dt} = r_1 - r_2 \quad [3.20]$$

$$R_{DBTO_2} = \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = r_2 - r_3 \quad [3.21]$$

$$R_{HBPS} = \frac{dC_{HBPS}}{dt} = r_3 - r_4 \quad [3.22]$$

$$R_{HBP} = \frac{dC_{HBP}}{dt} = r_4 \quad [3.23]$$

Incluyendo en las ecuaciones [3.19] a [3.23] las expresiones [3.14] a [3.17] que describen las velocidades de reacción, queda definido el modelo cinético que se va a utilizar para la descripción de la biodesulfuración de DBT empleando células de *Pseudomonas putida* KTH2 en *resting cells* como biocatalizador, expresado por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = -\frac{k_1' \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X \quad [3.24]$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = \frac{k_1' \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X - \frac{k_2' \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [3.25]$$

$$\frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = \frac{k_2' \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X - \frac{k_3' \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [3.26]$$

$$\frac{dC_{HBPS}}{dt} = \frac{k_3' \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X - \frac{k_4' \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K_1' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.27]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \frac{k_4' \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K_1' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.28]$$

Determinación de los parámetros cinéticos preliminares

Para la determinación de los parámetros cinéticos se han empleado los datos experimentales mostrados en las Tablas 3.2 y 3.3, esto es, los datos de biodesulfuración empleando células de 5 y 23 h.

Se ha aplicado el **método de las velocidades de reacción** como una primera aproximación a los valores de los parámetros cinéticos. Tal y como se explicó en el apartado 2.4, este método permite determinar los parámetros implicados en las ecuaciones cinéticas de forma separada, siempre y cuando la matriz de los coeficientes estequiométricos (\mathbf{v}) sea cuadrada, para poder transformar la ecuación [3.29] en la expresión [3.30], como es el caso.

$$\mathbf{R} = \mathbf{v} \cdot \mathbf{r} \quad [3.29]$$

$$\mathbf{r} = \mathbf{v}^{-1} \cdot \mathbf{R} \quad [3.30]$$

Teniendo en cuenta los cuatro componentes clave (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP) y el esquema de reacción formado por las ecuaciones [3.6] a [3.9], la matriz de coeficientes estequiométricos y su inversa son, respectivamente [3.31] y [3.32]

$$\mathbf{v} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad [3.31]$$

$$\mathbf{v}^{-1} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad [3.32]$$

Aplicando el método de velocidades de reacción, basado en la expresión [3.30] se obtiene la ecuación [3.33], cuyo resultado es el sistema de ecuaciones [3.34] a [3.37]:

$$\begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} R_{DBT} \\ R_{DBTO} \\ R_{DBTO_2} \\ R_{HBP} \end{bmatrix} \quad [3.33]$$

$$r_1 = -R_{DBT} = -\frac{dC_{DBT}}{dt} \quad [3.34]$$

$$r_2 = -R_{DBT} - R_{DBTO} = -\frac{dC_{DBT}}{dt} - \frac{dC_{DBTO}}{dt} \quad [3.35]$$

$$r_3 = -R_{DBT} - R_{DBTO} - R_{DBTO_2} = -\frac{dC_{DBT}}{dt} - \frac{dC_{DBTO}}{dt} - \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} \quad [3.36]$$

$$r_4 = R_{HBP} = \frac{dC_{HBP}}{dt} \quad [3.37]$$

Para el cálculo, a partir de los datos experimentales, de los valores discretos de velocidad, en primer lugar se integran las ecuaciones [3.34] a [3.37], considerando las siguientes condiciones de contorno: $t = 0 \therefore C_{DBTO}^0 = C_{DBTO_2}^0 = C_{HBP}^0 = 0$, obteniendo las expresiones [3.38] a [3.41]:

$$\int_0^t r_1 dt = - \int_{C_{DBT}^0}^{C_{DBT}^t} dC_{DBT} = C_{DBT}^0 - C_{DBT}^t \quad [3.38]$$

$$\int_0^t r_2 dt = - \int_{C_{DBT}^0}^{C_{DBT}^t} dC_{DBT} - \int_{C_{DBTO}^0}^{C_{DBTO}^t} dC_{DBTO} = C_{DBT}^0 - C_{DBT}^t - C_{DBTO}^t \quad [3.39]$$

$$\int_0^t r_3 dt = - \int_{C_{DBT}^0}^{C_{DBT}^t} dC_{DBT} - \int_{C_{DBTO}^0}^{C_{DBTO}^t} dC_{DBTO} - \int_{C_{DBTO_2}^0}^{C_{DBTO_2}^t} dC_{DBTO_2} = C_{DBT}^0 - C_{DBT}^t - C_{DBTO}^t - C_{DBTO_2}^t \quad [3.40]$$

$$\int_0^t r_4 dt = \int_{C_{HBP}^0}^{C_{HBP}^t} dC_{HBP} = C_{HBP}^t \quad [3.41]$$

Una vez obtenidos los valores de r_i a partir de los datos experimentales se resuelven las ecuaciones [3.14] a [3.17] individualmente. De esta manera el problema de múltiple respuesta dado por las ecuaciones [3.24] a [3.28] se simplifica a un problema de simple respuesta. Se pueden utilizar de manera separada los datos obtenidos en los experimentos BDS-1 y BDS-2 para células de 5 y 23 h de edad de crecimiento, obteniéndose así un conjunto de parámetros cinéticos diferentes para cada edad. Los parámetros cinéticos calculados son las constantes cinéticas individuales (k_i) y los términos de desactivación enzimática (s_i). Los parámetros de afinidad e inhibición (K'_i) se han fijado con los valores obtenidos previamente (Alcón y col., 2008): $K'_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$; $K'_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$; $K'_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$; $K'_4 = 0,092 \mu\text{M}^{-1}$ y $K'_l = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$.

En las Tablas 3.10 y 3.11 se presentan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar las ecuaciones [3.14] a [3.17] a los datos experimentales recogidos en las Tablas 3.2 y 3.4, correspondientes a la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S en un proceso de biodesulfuración en *resting cells* empleando células de 5 h y 23 h de edad, respectivamente, y con una concentración de biomasa de 0,7 g/L. Los valores del parámetro estadísticos *F* de Fisher obtenidos son, en todos los casos, mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95 %, cumpliéndose así los criterios estadísticos de ajuste.

TABLA 3.10. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en las cuatro reacciones de la ruta 4S empleando células de 5 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F_F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	1,28·10 ⁻¹	1,88·10 ⁻³	34710,55	2,82	41,06
$s_{1 5h}$ (min ⁻¹)	6,93·10 ⁻³	4,37·10 ⁻⁴			
$k'_{2 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	2,21·10 ⁻¹	1,65·10 ⁻²	1582,60	2,82	8,55
$s_{2 5h}$ (min ⁻¹)	3,73·10 ⁻³	1,56·10 ⁻³			
$k'_{3 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	1,35·10 ⁻¹	8,52·10 ⁻³	3379,68	2,82	1,66
$s_{3 5h}$ (min ⁻¹)	1,43·10 ⁻²	9,98·10 ⁻⁴			
$k'_{4 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	4,20·10 ⁻¹	8,10·10 ⁻²	586,56	2,82	1,55
$s_{4 5h}$ (min ⁻¹)	3,69·10 ⁻²	3,79·10 ⁻³			

TABLA 3.11. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en las cuatro reacciones de la ruta 4S empleando células de 23 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F_F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 23h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	2,35·10 ⁻¹	7,28·10 ⁻³	8103,26	2,82	2,46
$s_{1 23h}$ (min ⁻¹)	2,03·10 ⁻²	1,43·10 ⁻³			
$k'_{2 23h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	6,89·10 ⁻¹	4,99·10 ⁻²	1831,04	2,82	9,34
$s_{2 23h}$ (min ⁻¹)	2,67·10 ⁻²	2,53·10 ⁻³			
$k'_{3 23h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	2,54·10 ⁻¹	2,52·10 ⁻²	944,99	2,82	13,35
$s_{3 23h}$ (min ⁻¹)	1,74·10 ⁻²	2,31·10 ⁻³			
$k'_{4 23h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	5,12·10 ⁻¹	2,48·10 ⁻²	3729,73	2,82	1,05
$s_{4 23h}$ (min ⁻¹)	3,67·10 ⁻²	1,46·10 ⁻³			

Determinación de los valores óptimos de los parámetros cinéticos

La ruta 4S consta de cuatro reacciones relacionadas entre sí, tal y como se observa en el esquema planteado por las ecuaciones [3.6] a [3.9], se trata, por lo tanto, de un sistema de múltiple respuesta. Por este motivo, el estudio previo realizado reacción a reacción sirve como una aproximación, y los valores de los parámetros cinéticos obtenidos anteriormente van a utilizarse como valores de partida en esta segunda etapa.

En este apartado se calculan los valores óptimos de los parámetros que forman parte del modelo cinético propuesto en las expresiones [3.24] a [3.28], obtenidas tras la aplicación del *método de velocidades de producción*. Se utilizan de forma separada los datos experimentales obtenidos para células de 5 y 23 h de edad, obteniendo un conjunto de parámetros cinéticos diferentes para cada edad.

Para ayudar a la convergencia de este método, se emplean como valores iniciales los obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción, recogidos en las Tablas 3.10 y 3.11. De la misma manera, los parámetros de afinidad e inhibición (K'_i) se han fijado con los valores obtenidos en estudios anteriores (Alcón y col., 2008): $K'_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$; $K'_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$; $K'_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$; $K'_4 = 0,092 \mu\text{M}^{-1}$ y $K'_I = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$.

Parámetros cinéticos óptimos para células de 5 horas de edad:

En la Tabla 3.12 se presentan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar simultáneamente las ecuaciones [3.24] a [3.28] a los datos experimentales recogidos en la Tabla 3.2; en ella puede observarse que, desde el punto de vista estadístico, se obtienen unos buenos resultados.

En la Figura 3.4 se representa la evolución de los datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S, y la predicción obtenida al aplicar el modelo cinético propuesto empleando los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 3.12. En esta figura se aprecia que las predicciones del modelo se ajustan correctamente a los datos experimentales correspondientes a la concentración de los compuestos de la ruta 4S sin observarse desviaciones significativas.

Para cuantificar la desviación que presentan los valores predichos por el modelo cinético respecto a los obtenidos experimentalmente, en la Figura 3.5 se representa cada uno de los valores de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP generados por el modelo frente a los correspondientes valores experimentales; asimismo, se

muestra la bisectriz, que representa las predicciones sin error, y las líneas de error de 10%. Se observa que los puntos de la figura se distribuyen alrededor de la bisectriz, obteniéndose unas desviaciones con un error muy bajo, en torno al 5 %.

TABLA 3.12. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción empleando células de 5 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F_F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 5h}$ ($L \cdot \text{min}^{-1} \cdot g_x^{-1}$)	$1,13 \cdot 10^{-1}$	$2,94 \cdot 10^{-3}$			
$s_{1 5h}$ (min^{-1})	$2,89 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{2 5h}$ ($L \cdot \text{min}^{-1} \cdot g_x^{-1}$)	$2,14 \cdot 10^{-1}$	$1,25 \cdot 10^{-2}$			
$s_{2 5h}$ (min^{-1})	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$1,48 \cdot 10^{-4}$	3897,23	1,53	6,17
$k'_{3 5h}$ ($L \cdot \text{min}^{-1} \cdot g_x^{-1}$)	$9,74 \cdot 10^{-2}$	$5,95 \cdot 10^{-3}$			
$s_{3 5h}$ (min^{-1})	$8,69 \cdot 10^{-3}$	$7,73 \cdot 10^{-4}$			
$k'_{4 5h}$ ($L \cdot \text{min}^{-1} \cdot g_x^{-1}$)	$5,57 \cdot 10^{-1}$	$1,30 \cdot 10^{-1}$			
$s_{4 5h}$ (min^{-1})	$3,96 \cdot 10^{-2}$	$3,58 \cdot 10^{-3}$			

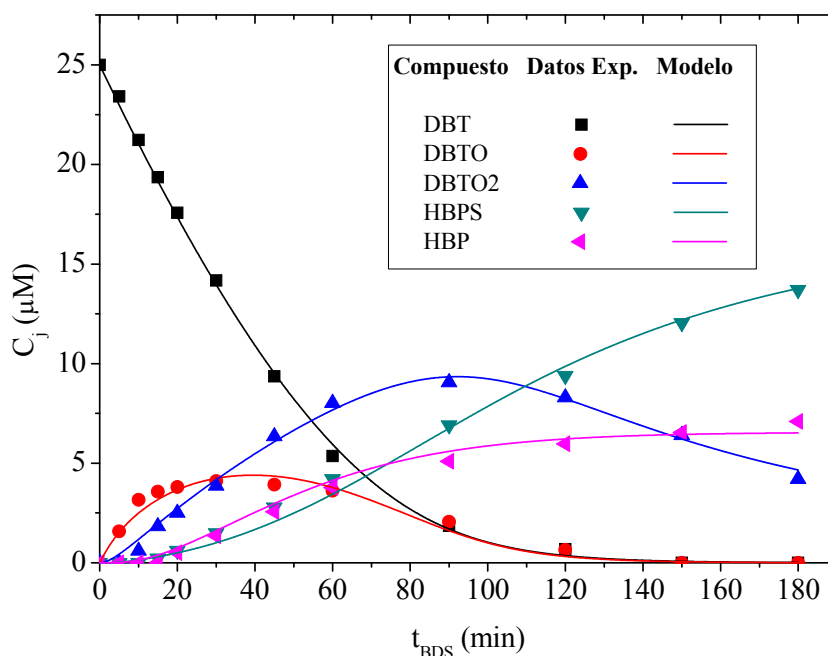


FIGURA 3.4. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los calculados por el modelo cinético para células de 5 h

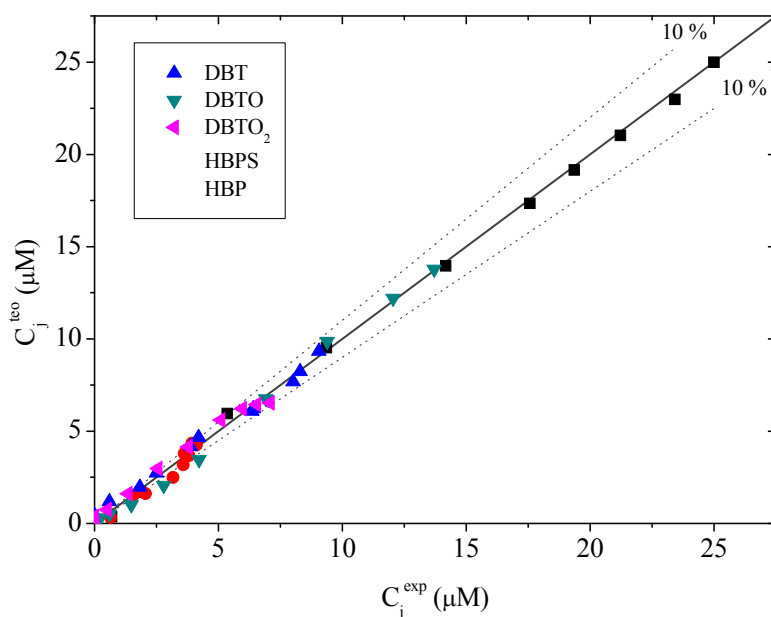


FIGURA 3.5. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 5 h de edad

Parámetros cinéticos óptimos para células de 23 horas de edad:

En la Tabla 3.13 se presentan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar simultáneamente las ecuaciones [3.24] a [3.28] a los datos experimentales recogidos en la Tabla 3.4. Nuevamente se obtienen unos resultados correctos atendiendo a los criterios estadísticos.

La predicción del modelo cinético, representada en la Figura 3.6 frente a la evolución de los datos experimentales de concentración de la ruta 4S, muestra un buen ajuste a lo largo de todo el experimento.

El error correspondiente a la predicción del modelo se representa en la Figura 3.7, en la que se representan los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo. Se observa que, salvo en la zona de bajas concentraciones, la predicción del modelo cinético tiene un error inferior al 10 %.

TABLA 3.13. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción empleando células de 23 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
k' _{1 23h} (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	1,68·10 ⁻¹	5,55·10 ⁻³			
s _{1 23h} (min ⁻¹)	7,96·10 ⁻³	1,71·10 ⁻³			
k' _{2 23h} (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	4,95·10 ⁻¹	3,81·10 ⁻²			
s _{2 23h} (min ⁻¹)	1,57·10 ⁻²	2,35·10 ⁻³	2228,54	1,53	10,38
k' _{3 23h} (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	1,86·10 ⁻¹	1,36·10 ⁻²			
s _{3 23h} (min ⁻¹)	1,00·10 ⁻²	1,43·10 ⁻³			
k' _{4 23h} (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	3,25·10 ⁻¹	3,76·10 ⁻²			
s _{4 23h} (min ⁻¹)	2,60·10 ⁻²	1,74·10 ⁻³			

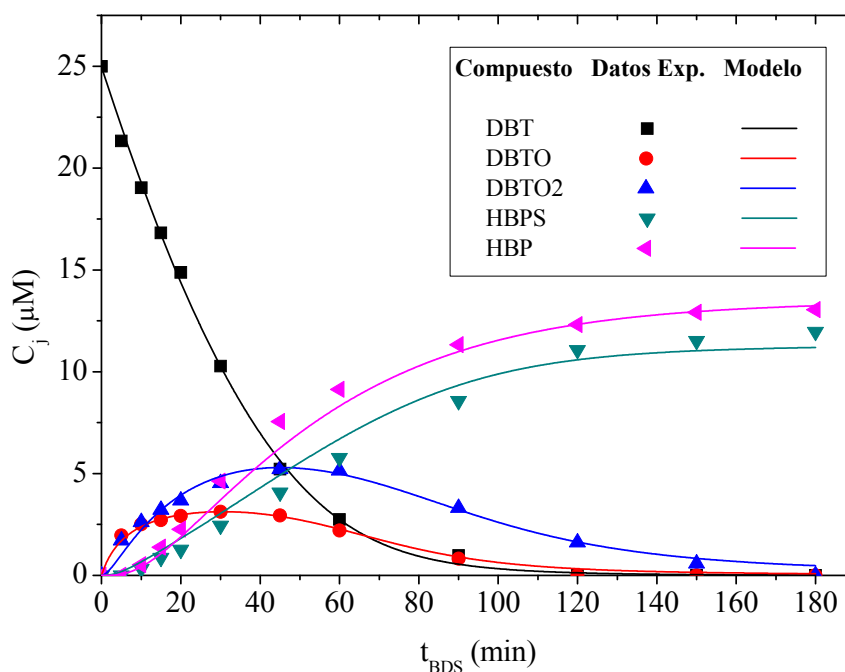


FIGURA 3.6. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los calculados por el modelo empleando células de 23 h

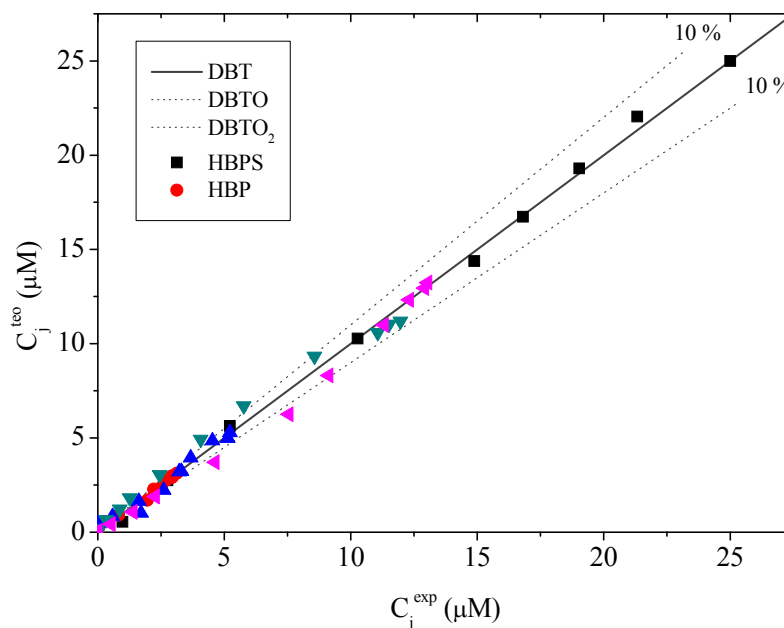


FIGURA 3.7. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 23 h de edad

Simulación del comportamiento de mezclas de distinta edad celular

A continuación se realiza la simulación del proceso de desulfuración de DBT en *resting cells* llevado a cabo mediante la mezcla de células de 5 y 23 h de edad. Como se explicó anteriormente, esta mezcla celular se emplea para aprovechar los máximos de actividad enzimática observados a distintas edades de crecimiento.

La simulación de mezclas celulares se ha realizado aplicando el modelo cinético determinado anteriormente, asumiendo un comportamiento aditivo al mezclar células de distintas edades. De esta manera, al desulfurar simultáneamente empleando células de 5 y 23 h de edad, se propone que la velocidad de producción de cada compuesto de la ruta 4S es el resultado de la suma de actividades que aporta cada edad celular por separado. Con estas consideraciones, al particularizar las ecuaciones [3.24] a [3.28] para cada edad celular, y considerando un comportamiento aditivo se obtienen las expresiones [3.42] a [3.46], que son las empleadas para la simulación de mezclas celulares aplicando el presente modelo cinético.

Los parámetros cinéticos empleados en la simulación son los recogidos en las Tablas 3.12 y 3.13, correspondientes al ajuste realizado con los datos experimentales mostrados en las Tablas 3.2 y 3.4 (Experimentos BDS-1 y BDS-3).

Se han simulado dos experimentos en los que el biocatalizador está formado por mezcla de células de 5 y 23 h. La primera simulación corresponde a un proceso en *batch*, comparándose con los resultados del experimento BDS-3. La segunda simulación se realiza sobre un proceso en *fed-batch*, comparándose con los resultados del experimento BDS-4, en el que se realizan sucesivas adiciones de DBT, de manera que cada adición corresponde a una concentración de DBT en el medio de 25 μM ; el DBT se añade al medio cuando los tres primeros compuestos de la ruta 4S (DBT, DBTO y DBTO₂) se han eliminado completamente. El propósito de este experimento es estudiar el comportamiento del sistema durante más tiempo y determinar si existe una pérdida de actividad, tal y como se observó en los experimentos en los que se emplean células de una única edad.

$$\frac{dC_{\text{DBT}}}{dt} = - \left[\frac{k'_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{\text{DBT}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{DBT}}} \right]_{5\text{h}} - \left[\frac{k'_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{\text{DBT}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{DBT}}} \right]_{23\text{h}} \quad [3.42]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{DBTO}}}{dt} = & \left[\frac{k'_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{\text{DBT}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{DBT}}} \right]_{5\text{h}} + \left[\frac{k'_1 \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{\text{DBT}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{DBT}}} \right]_{23\text{h}} \\ & - \left[\frac{k'_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{\text{DBTO}}} \right]_{5\text{h}} - \left[\frac{k'_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{\text{DBTO}}} \right]_{23\text{h}} \end{aligned} \quad [3.43]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{DBTO}_2}}{dt} = & \left[\frac{k'_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{\text{DBTO}}} \right]_{5\text{h}} + \left[\frac{k'_2 \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{\text{DBTO}}} \right]_{23\text{h}} \\ & - \left[\frac{k'_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{\text{DBTO}_2}} \right]_{5\text{h}} - \left[\frac{k'_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{\text{DBTO}_2}} \right]_{23\text{h}} \end{aligned} \quad [3.44]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{HBPS}}}{dt} = & \left[\frac{k'_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{\text{DBTO}_2}} \right]_{5\text{h}} + \left[\frac{k'_3 \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{\text{DBTO}_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{\text{DBTO}_2}} \right]_{23\text{h}} \\ & - \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{\text{HBPS}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{HBP}} + K'_4 \cdot C_{\text{HBPS}}} \right]_{5\text{h}} - \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{\text{HBPS}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{HBP}} + K'_4 \cdot C_{\text{HBPS}}} \right]_{23\text{h}} \end{aligned} \quad [3.45]$$

$$\frac{dC_{\text{HBP}}}{dt} = \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{\text{HBPS}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{HBP}} + K'_4 \cdot C_{\text{HBPS}}} \right]_{5\text{h}} + \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{\text{HBPS}} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{\text{HBP}} + K'_4 \cdot C_{\text{HBPS}}} \right]_{23\text{h}} \quad [3.46]$$

Mezcla celular. Operación en batch

En la Figura 3.8 se representa la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S y los valores obtenidos al simular el proceso de biodesulfuración empleando la mezcla celular óptima como biocatalizador, obteniéndose una correcta simulación del proceso. El error obtenido en la simulación se muestra en la Figura 3.9, en la que se observa que las mayores desviaciones se producen en la zona de bajas concentraciones de los compuestos de la ruta 4S.

Mezcla celular. Operación en fed-batch

En la Figura 3.10 se representa la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S y los valores generados por la simulación del proceso en *fed-batch*. En este caso se observa que la simulación se desvía de los datos experimentales a partir del tercer *batch*, esto es, a partir de los 100 minutos de proceso. La incorporación del término de desactivación en las ecuaciones cinéticas en forma de exponencial decreciente con el tiempo hace que, con el transcurso de la reacción, este término vaya tomando valores cada vez más pequeños, haciendo que la velocidad de producción de cada uno de los compuestos disminuya progresivamente hasta casi detenerse. Sin embargo, la evolución de los datos experimentales es distinta ya que la última reacción se ve mucho más afectada en el transcurso del proceso que las demás.

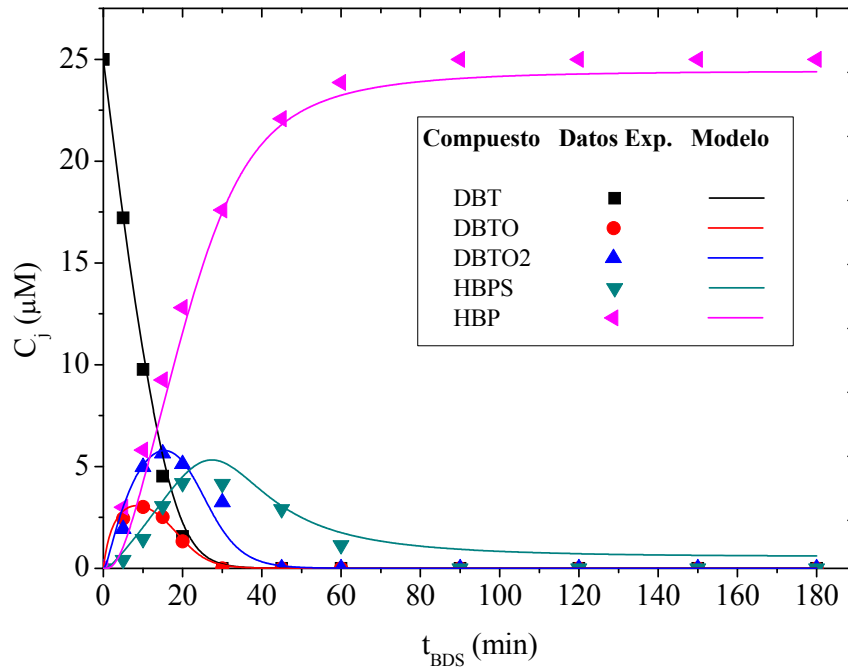


FIGURA 3.8. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23 h

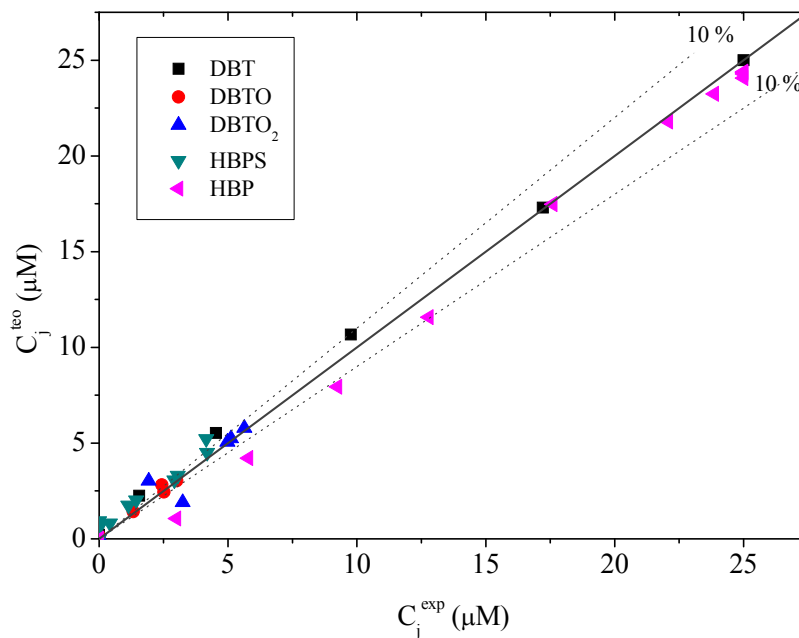


FIGURA 3.9. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los simulados por el modelo cinético empleando como biocatalizador la mezcla de células de 5 y 23 h

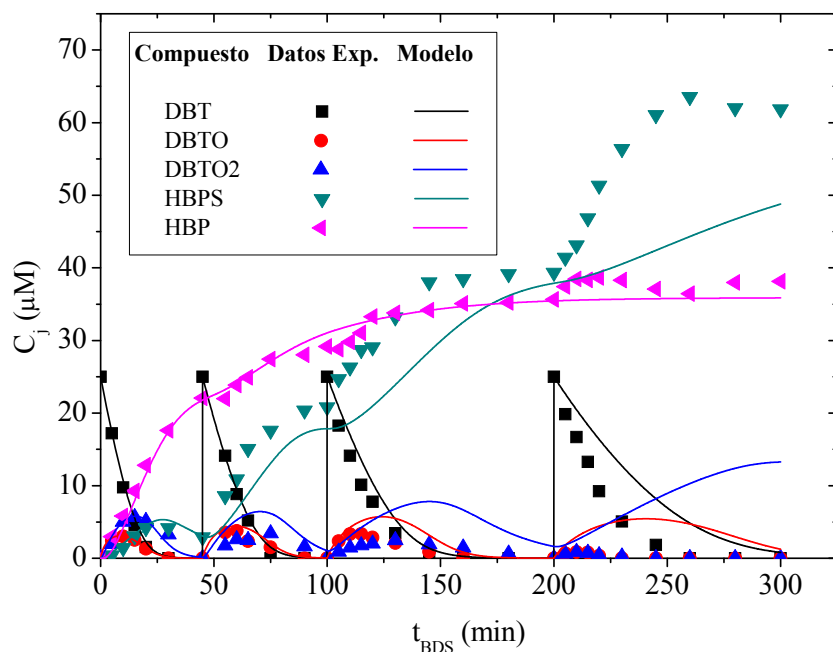


FIGURA 3.10. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23 h operando en *fed-batch*

3.3. MODELO CINÉTICO INCLUYENDO la CONCENTRACIÓN de EQUIVALENTES REDUCIDOS

A la vista de los resultados de las simulaciones realizadas en el Apartado 3.2 con el modelo empírico propuesto, se puede concluir que la introducción del término de desactivación enzimática, empleando una cinética de primer orden, no es adecuada, ya que predice una ralentización de las reacciones que parece significativamente mayor cuando el proceso se realiza tiempos de reacción elevados en condiciones de *fed-batch*. En la Figura 3.10 se observa que, mientras que la cuarta reacción de la ruta 4S (la conversión de HBPS en HBP) prácticamente se detiene con el tiempo, las tres primeras reacciones no tienen el mismo comportamiento. Por otra parte, en las tres primeras reacciones de la ruta 4S interviene un compuesto que no lo hace en la cuarta reacción, NADH, tal y como se observa en la Figura 1.12 de la presente Memoria. Debido a esta observación, en este apartado se propone el estudio de la evolución de la concentración de NADH durante el proceso de biodesulfuración y su incorporación en el modelo cinético para solucionar los problemas observados en el apartado 3.2.

3.3.1. Evolución de la concentración de NADH. Resultados experimentales

En este apartado se presentan los resultados experimentales obtenidos del análisis de la evolución de la concentración de NADH durante el proceso de biodesulfuración empleando biocatalizadores de 5 y de 23 h de edad celular. El análisis de NADH se realiza mediante un método espectrofluorométrico, detallado en el apartado 2.3.5 de la presente Memoria. La planificación experimental se muestra en la Tabla 3.14. Las condiciones experimentales son las comentadas en el apartado 2.2.2 referente a los experimentos de desulfuración en matraz *Erlenmeyer*, con el añadido de que en estos experimentos se toman muestras a distintos tiempos para el análisis de NADH. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3.15, en ella se observa una disminución con el tiempo en la concentración de NADH para células de ambas edades con unos valores muy similares. Para la simplificación del esquema de reacción descrita en el Apartado 3.2.1 únicamente se tuvo en cuenta la concentración inicial de NADH y no su evolución durante el proceso de desulfuración.

TABLA 3.14. *Planificación experimental para el estudio de la concentración de NADH durante el proceso de BDS en resting cells*

Experimento	C _{X5 h} (g/L)	C _{X23 h} (g/L)	C ⁰ _{DBT} (μM)	t (min)	Operación
NADH-1	0,7	-	25	300	Batch
NADH-2	-	0,7	25	300	Batch

TABLA 3.15. *Resultados experimentales del análisis de NADH en procesos de biodesulfuración de DBT empleando células de Pseudomonas putida KTH2 en resting cells*

t (min)	Experimento NADH-1 C _{NADH} (μmol _{NADH} /g _X)	Experimento NADH-2 C _{NADH} (μmol _{NADH} /g _X)
0	1,160	1,100
45	1,011	0,842
100	0,830	0,612
150	0,693	0,529
200	0,623	0,474
240	0,577	0,418
300	0,535	0,403

3.3.2. Determinación del modelo cinético

Teniendo en cuenta la tendencia decreciente que se observa en la concentración de NADH durante la biodesulfuración, se propone una modificación en las ecuaciones cinéticas planteadas en el apartado 3.2.1 (Ecuaciones [3.14] a [3.17]). El término de desactivación enzimática ($\exp(-s_i \cdot t)$), de las tres primeras reacciones, se sustituye en este caso por los valores de concentración de NADH (que, como se comentó anteriormente, interviene directamente en las tres reacciones), obteniéndose las siguientes ecuaciones:

$$r_1 = \frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \cdot C_X \quad [3.47]$$

$$r_2 = \frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [3.48]$$

$$r_3 = \frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [3.49]$$

$$r_4 = \frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.50]$$

Determinación de los parámetros cinéticos preliminares

Al igual que en el apartado anterior, se aplica el método de las velocidades de reacción para determinar los valores preliminares de los parámetros empleando las ecuaciones [3.47] a [3.50]. Los datos experimentales empleados son los mostrados en las Tablas 3.2 y 3.3, para la evolución de la concentración de compuestos de la ruta 4S, y en la Tabla 3.15, para la evolución de la concentración de NADH durante el proceso de biodesulfuración. Los resultados se muestran en las Tablas 3.16 y 3.17. Como puede apreciarse, los resultados obtenidos cumplen con los criterios estadísticos de ajuste.

TABLA 3.16. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción empleando células de 5 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
k ₁ ' _{5h} $\left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}}\right)$	9,70·10 ⁻²	1,02·10 ⁻³	9010,12	2,82	3,98
k ₂ ' _{5h} $\left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}}\right)$	1,86·10 ⁻¹	3,11·10 ⁻³	3564,14	2,82	8,36
k ₃ ' _{5h} $\left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}}\right)$	5,32·10 ⁻²	2,43·10 ⁻³	476,91	2,82	25,29
k ₄ ' _{5h} $\left(\frac{L}{\text{g}_X \text{ min}}\right)$	4,20·10 ⁻¹	8,10·10 ⁻²	586,56	2,82	1,55
s ₄ ' _{5h} (min ⁻¹)	3,69·10 ⁻²	3,79·10 ⁻³			

TABLA 3.17. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción empleando células de 23 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
k ₁ ' _{23h} $\left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}}\right)$	1,51·10 ⁻¹	4,22·10 ⁻³	1285,95	2,82	33,78
k ₂ ' _{23h} $\left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}}\right)$	3,04·10 ⁻¹	1,53·10 ⁻²	396,69	2,82	92,55
k ₃ ' _{23h} $\left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}}\right)$	1,30·10 ⁻¹	5,71·10 ⁻³	519,09	2,82	52,64
k ₄ ' _{23h} $\left(\frac{L}{\text{g}_X \text{ min}}\right)$	5,12·10 ⁻¹	2,48·10 ⁻²	3729,73	2,82	1,05
s ₄ ' _{23h} (min ⁻¹)	3,67·10 ⁻²	1,46·10 ⁻³			

Determinación de los valores óptimos de los parámetros cinéticos

Aplicando el método de las velocidades de producción, tal y como se explica en el apartado 3.3.7, considerando en este caso las ecuaciones cinéticas [3.47] a [3.50], se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = -\frac{k_1' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X \quad [3.51]$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = \frac{k_1' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X - \frac{k_2' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [3.52]$$

$$\frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = \frac{k_2' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X - \frac{k_3' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [3.53]$$

$$\frac{dC_{HBPS}}{dt} = \frac{k_3' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X - \frac{k_4' \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K_I' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.54]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \frac{k_4' \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K_I' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [3.55]$$

Ajustando de forma simultánea las ecuaciones [3.51] a [3.55] a los datos experimentales se obtienen los parámetros cinéticos óptimos para el modelo propuesto, recogidos en las Tablas 3.18 y 3.19, que corresponden al proceso de biodesulfuración empleando células de 5 y 23 h de edad celular, respectivamente. Nuevamente, los valores obtenidos cumplen con los criterios estadísticos.

En la Figura 3.11 se representa la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S y la predicción generada por el modelo cinético para células de 5 h de edad. Se observa que la predicción del modelo se ajusta bastante bien a los datos experimentales. La desviación entre los valores experimentales y los predichos por el modelo se representa en la Figura 3.12, en la que se observa que el error de predicción del modelo es muy bajo.

Lo mismo ocurre en el caso del proceso de biodesulfuración empleando células de 23 h de edad. La Figura 3.13 muestra los datos experimentales de biodesulfuración y los generados por el modelo cinético para células de 23 h, en este caso tampoco se observan desviaciones significativas, siendo el error de predicción del modelo muy bajo, como puede observarse en la Figura 3.14.

TABLA 3.18. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción empleando células de 5 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$9,59 \cdot 10^{-2}$	$1,64 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{2 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$1,89 \cdot 10^{-1}$	$6,26 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{3 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$5,39 \cdot 10^{-2}$	$1,15 \cdot 10^{-3}$	21435,45	1,53	10,28
$k'_{4 5h} \left(\frac{L}{\text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$3,97 \cdot 10^{-1}$	$7,38 \cdot 10^{-2}$			
$s_{4 5h} \left(\text{min}^{-1} \right)$	$3,17 \cdot 10^{-2}$	$6,05 \cdot 10^{-4}$			

TABLA 3.19. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción empleando células de 23 h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 23h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$1,45 \cdot 10^{-1}$	$1,89 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{2 23h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$3,47 \cdot 10^{-1}$	$1,15 \cdot 10^{-2}$			
$k'_{3 23h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$1,47 \cdot 10^{-1}$	$3,87 \cdot 10^{-3}$	9065,22	1,53	23,94
$k'_{4 23h} \left(\frac{L}{\text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$2,72 \cdot 10^{-1}$	$6,03 \cdot 10^{-2}$			
$s_{4 23h} \left(\text{min}^{-1} \right)$	$2,25 \cdot 10^{-2}$	$4,93 \cdot 10^{-4}$			

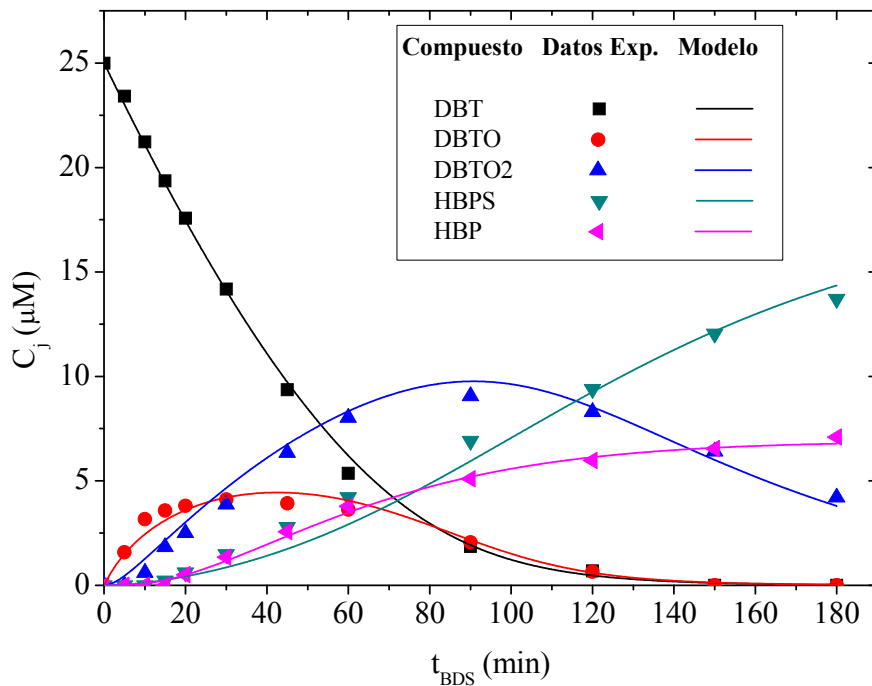


FIGURA 3.11. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S y los calculados por el modelo cinético empleando células de 5 h de edad

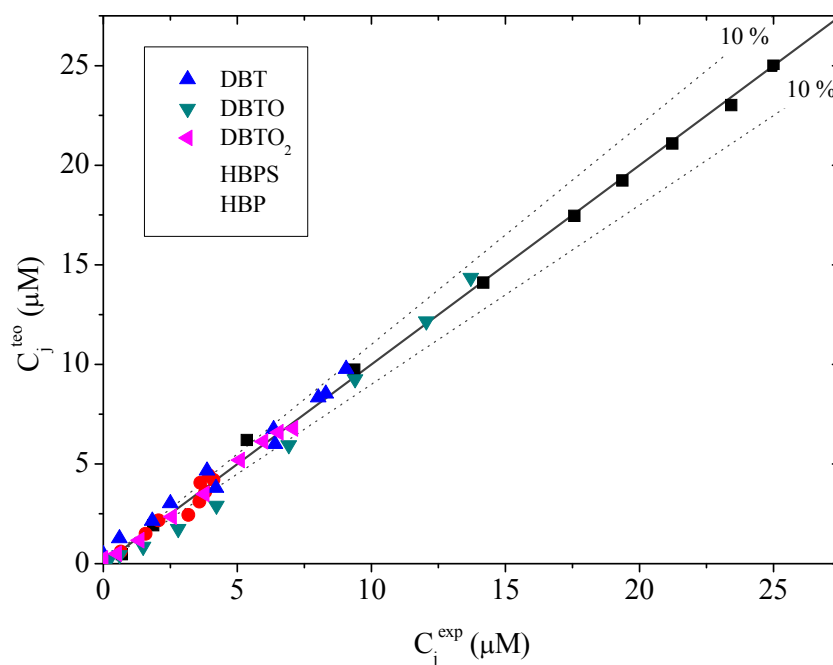


FIGURA 3.12. Valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 5 h

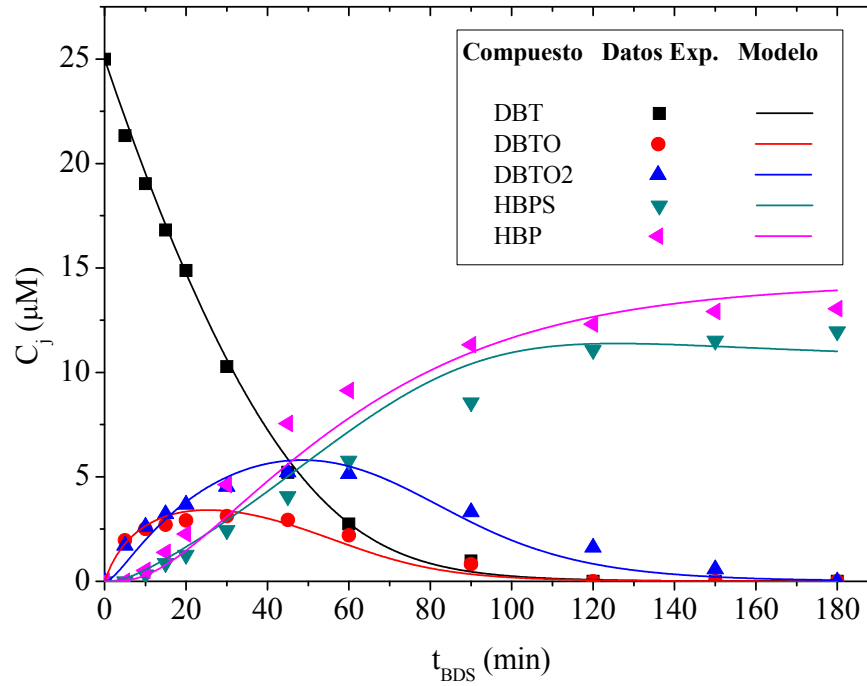


FIGURA 3.13. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S y los calculados por el modelo cinético empleando células de 23 h de edad

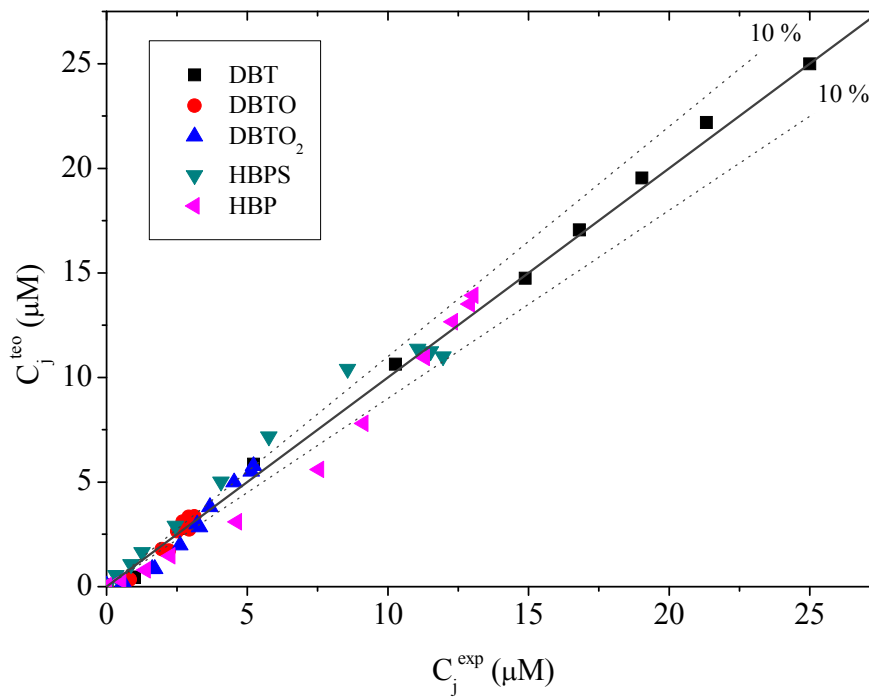


FIGURA 3.14. Valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 23 h de edad

Simulación de mezclas celulares de distinta edad de crecimiento

Siguiendo las líneas marcadas en el apartado 3.2, la simulación de mezclas de células con distintas edades se realizó asumiendo un comportamiento cinético aditivo para cada edad, de manera que, considerando las ecuaciones de velocidad propuestas para este modelo se obtienen las ecuaciones [3.56] a [3.60], con las que se llevó a cabo la simulación del proceso, tanto para la operación en *batch*, como en *fed-batch*. Los valores de los parámetros cinéticos son los mostrados en las Tablas 3.18 y 3.19.

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = - \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{23h} \quad [3.56]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{DBTO}}{dt} = & \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{23h} \\ & - \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{23h} \end{aligned} \quad [3.57]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = & \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{23h} \\ & - \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{23h} \end{aligned} \quad [3.58]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{HBPS}}{dt} = & \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{23h} \\ & - \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{23h} \end{aligned} \quad [3.59]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_4 \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{23h} \quad [3.60]$$

En la Figura 3.15 se representa la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S y de la simulación para estos compuestos realizando el proceso de biodesulfuración en *batch*. Se observan desviaciones en la zona de baja concentración, fundamentalmente para la concentración de HBP, mientras que la

evolución de los demás compuestos se simula con un error muy bajo, tal y como se muestra en la Figura 3.16.

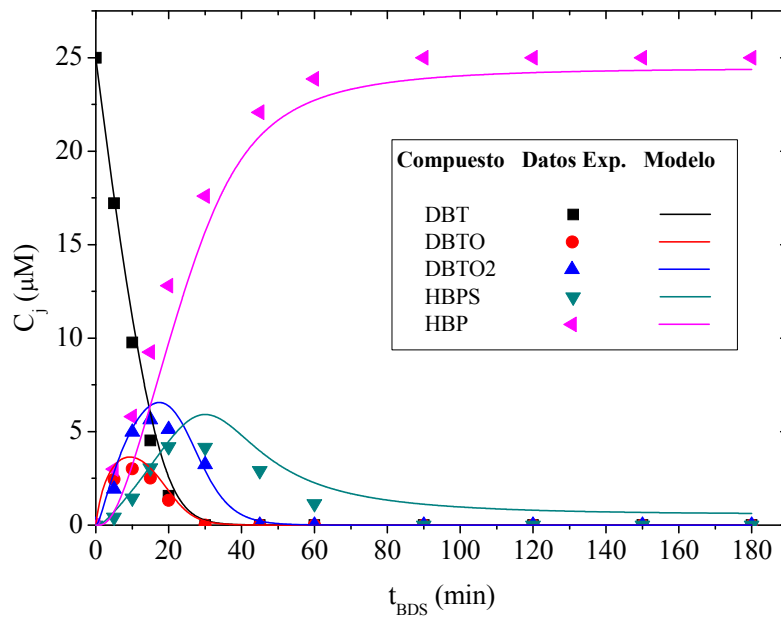


FIGURA 3.15. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23 h

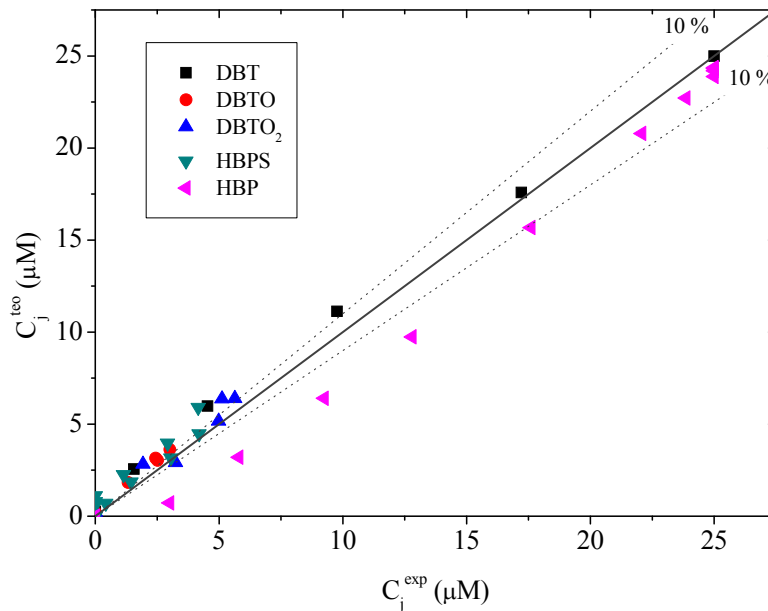


FIGURA 3.16. Valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23 h de edad

La Figura 3.17 representa la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S y los datos simulados empleando como biocatalizador la mezcla celular operando ahora en *fed-batch*. En este caso, se observa que el modelo es capaz de simular correctamente el proceso. Las mayores desviaciones se producen en la concentración de los compuestos intermedios DBTO₂ y HBPS. La evolución de la concentración de DBT y HBP es correcta.

La reformulación del modelo cinético, planteando nuevas ecuaciones de velocidad en las que se sustituye un término empírico de desactivación enzimática por una magnitud cuantificable como es la concentración de NADH, consigue, de esta manera, solucionar el problema detectado en el apartado 3.3.8, en el no se pudo simular correctamente el proceso en *fed-batch* empleando la mezcla celular óptima.

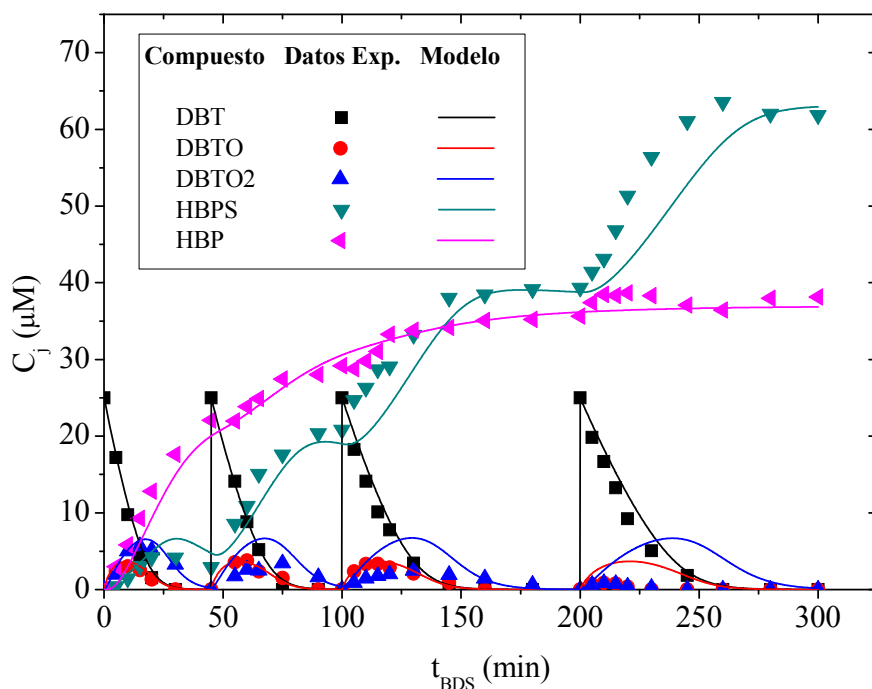


FIGURA 3.17. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23 h operando en *fed-batch*

3.4. BIBLIOGRAFÍA

- Alcon, A.; Martín, A.B.; Santos, V.E.; Yustos, P. y García-Ochoa, F. (2005). Biodesulfurization of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem. Eng. J.* 26, 168-175.
- Alcon, A.; Martín, A.B.; Santos, V.E.; Gomez, E. y García-Ochoa, F. (2008). Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT 5279. *Biochem. Eng. J.* 39, 486-495.
- Calzada, J.; Zamarro, M.T.; Alcon, A.; Santos, V.E.; García, J.L. y García-Ochoa, F. (2007). Intracellular activity of the enzymes involved in 4S route biodesulphurization of DBT by *Pseudomonas putida* CECT 5279 as function of cell age. *J. Biotech.* 131S, S74-S97.
- Calzada, J. (2010). *Desulfuración de dibenzotiofeno con Pseudomonas putida CECT 5279: Formas de operación*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2011). Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochem.* 46, 1323-1328.
- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2012). Extended kinetic model for DBT desulfurization using *Pseudomonas putida* CECT 5279 in resting cells. *Biochem. Eng. J.* 66, 52-60.
- García-Ochoa, F.; Romero, A. y Santos, V.E. (1992). Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *Int. Chem. Eng.* 32, 538-551.
- García-Ochoa, F. y Romero, A. (1993). Kinetic modeling of reaction networks. *Trends Chem. Eng.* 1, 285-305.
- Gray, K.A.; Pogrebinsky, O.S.; Mrachko, G.T.; Xi, L.; Monticello, D.J. y Squires, C.H. (1996). Molecular mechanism of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat. Biotechnol.* 14, 1705-1709.

- Hernández, C. (2005). *Desulfuración de dibenzotiofeno con Rhodococcus erythropolis IGTS8*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Martin, A.B. (2005). *Desulfuración de dibenzotiofeno con Pseudomonas putida CECT 5279*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Nielsen, J. y Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chem. Eng. Sci.* 47, 4225-4270.
- Schubert, E. y Hofmann, H. (1976). Reaction Engineering, 1. Stoichiometry of complex reactions. *Int. Chem. Eng.* 16, 132.

4. EMPLEO DE COSUSTRATOS EN BIODESULFURACIÓN: MODELO CINÉTICO

CAPÍTULO 4.- EMPLEO DE COSUSTRATOS EN BIODESULFURACIÓN: MODELO CINÉTICO

Indice

4.1.	<i>ESTUDIO de DISTINTOS COSUSTRATOS</i>	170
4.1.1.	<i>Estudio preliminar</i>	170
4.1.2.	<i>Efecto de la adición de cosustratos en el proceso de biodesulfuración</i>	175
4.2.	<i>ESTUDIO de la ADICIÓN de ÁCIDO ACÉTICO</i>	190
4.2.1.	<i>Efecto sobre cada reacción de la ruta 4S</i>	191
4.2.2.	<i>Variación de las concentraciones de NADH y ATP</i>	197
4.3.	<i>MODELO CINÉTICO INCLUYENDO LA EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NADH Y ATP</i>	204
4.3.1.	<i>Ajuste a los resultados experimentales de BDS sin emplear cosustratos</i>	208
4.3.2.	<i>Ajuste a los resultados experimentales de BDS empleando ácido acético como cosustrato</i>	212
4.4.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	217

CAPÍTULO 4

EMPLEO DE COSUSTRATOS EN BIODESULFURACIÓN: MODELO CINÉTICO

En el capítulo anterior se ha desarrollado un modelo cinético que describe el proceso de biodesulfuración al emplear como biocatalizadores células de *Pseudomonas putida* KTH2 de 5 y 23 horas de edad de crecimiento. Este modelo se ha utilizado para simular de forma satisfactoria el comportamiento de un sistema formado por mezcla de células de ambas edades, tanto en operación en *batch*, como en *fed-batch*. Para el desarrollo del modelo cinético se ha sustituido, en las ecuaciones de velocidad de las tres primeras reacciones, un parámetro empírico de desactivación enzimática por una magnitud medible, como es la concentración de NADH, compuesto involucrado en las tres primeras reacciones de la ruta 4S de desulfuración, y cuyo análisis muestra que su concentración disminuye a lo largo del proceso de BDS.

Por otra parte, se ha observado que, a lo largo del proceso de desulfuración, las células pierden actividad. Este efecto se pone de manifiesto al emplear como biocatalizador células de 5 y 23 horas de manera individual, de forma que todas las reacciones se ralentizan con el tiempo, algunas incluso llegando a detenerse. Al emplear la mezcla celular operando en *fed-batch*, se ha observado que es la cuarta reacción la que más se ve afectada en el transcurso del proceso.

Los cofactores NADH y NAD(P)H son componentes esenciales para las células, puesto que actúan como transportadores de electrones en las reacciones de oxidación y reducción (Wichmann y Vasic-Racki, 2005), además de ser, en el caso de NADH, el iniciador de la ruta 4S de biodesulfuración. La síntesis y regeneración de dichos cofactores forma parte del metabolismo celular. Aunque las células tienen reservas de

estos compuestos, dichas reservas pueden agotarse perjudicando las reacciones en las que se ven envueltos (Zhao y van der Donk, 2003).

Uno de los métodos empleados para la regeneración de cofactores en reacciones bioquímicas es el mecanismo de enzima acoplada (Wichmann y Vasic-Racki, 2005). Se trata del empleo de un sistema formado por un sustrato reducido, cuya oxidación, catalizada por una enzima deshidrogenasa, permite la regeneración de NADH a partir de NAD^+ . La aplicación de este sistema en la regeneración de NADH en la ruta 4S de biodesulfuración se representa en la Figura 4.1. En reacciones en las que el biocatalizador es un conjunto de células enteras, una posible estrategia consiste en añadir al medio de reacción el sustrato reducido, aprovechando así el metabolismo celular para la regeneración de los cofactores (Faber, 2004). Entre las enzimas deshidrogenasas que producen NADH a partir de NAD^+ se encuentran varias de las involucradas en el ciclo de Krebs, como se observa en la Figura 4.2; por lo tanto, los compuestos presentes en dicho ciclo pueden considerarse como posibles cosustratos para su empleo en la regeneración de cofactores mediante el mecanismo de enzima acoplada (Sanchez y col., 2008; Wang y col., 2007).

La regeneración de NADH significa también una mayor disponibilidad de otros cofactores, como ATP, principal fuente de energía de las reacciones metabólicas (Zhou y col., 2009). En el proceso de desulfuración en *resting cells* se impide la duplicación celular eliminando los nutrientes esenciales para que ésta ocurra. Sin embargo, se trata de un proceso aerobio en el que se suministra oxígeno tanto para el mantenimiento celular, como para las reacciones de la ruta 4S de desulfuración. En un proceso aerobio, la formación de ATP se produce principalmente por medio de la fosforilación oxidativa (Figura 4.3), en la que los electrones derivados del NADH y FADH_2 se combinan con oxígeno, y la energía liberada de estas reacciones se utiliza para dirigir la síntesis de ATP a partir de ADP (Cooper, 2004). Por lo tanto, existe una relación directa entre la disponibilidad de NADH y la formación de ATP.

En algunos estudios se emplean diversos compuestos para aumentar la disponibilidad de NADH en el proceso de biodesulfuración, utilizando para ello etanol (Amin y col., 2011 Aggarwal y col., 2011). Sin embargo, no existe en la literatura ningún estudio sobre cómo la adición de estos cosustratos influye en la disponibilidad de metabolitos tales como NADH y ATP.

En este capítulo se estudia el empleo de cosustratos para aumentar el rendimiento del proceso de biodesulfuración, se estudia su mecanismo de acción, y se propone una modificación del modelo cinético previamente desarrollado que explique el efecto producido por la adición de dichos cosustratos.

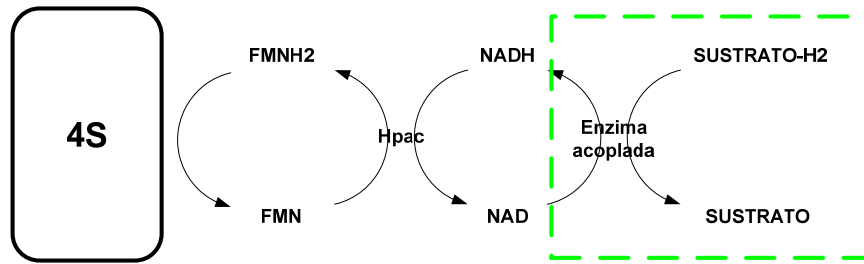


FIGURA 4.1. Regeneración de NADH mediante el mecanismo de enzima acoplada y su aplicación a la ruta 4S de biodesulfuración

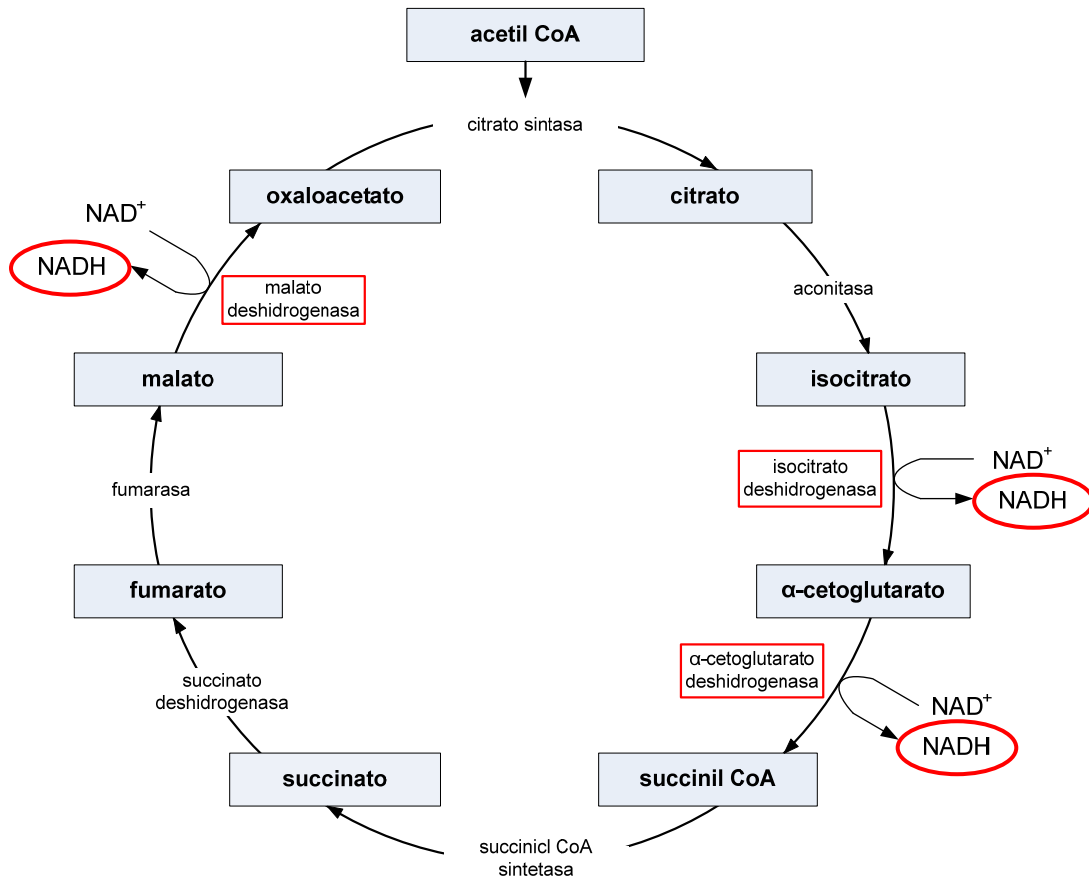


FIGURA 4.2. Formación de NADH en el ciclo de Krebs

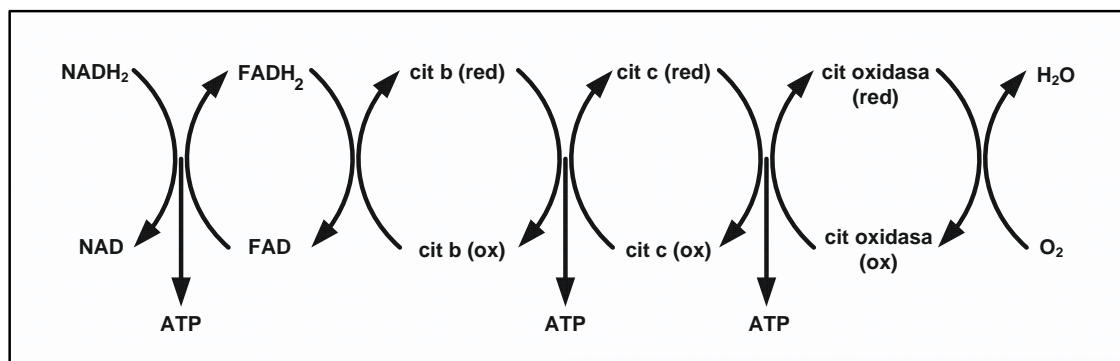


FIGURA 4.3. *Formación de ATP a partir de NADH por medio del mecanismo de la fosforilación oxidativa*

4.1. ESTUDIO de DISTINTOS COSUSTRATOS

En este apartado se estudian diferentes cosustratos para su empleo en el proceso de biodesulfuración. Los cosustratos empleados se han elegido atendiendo a dos características; por una parte están presentes en el ciclo de Krebs y, por otra parte, son compuestos con un precio aceptable para su empleo en procesos bioquímicos a nivel industrial. Teniendo en cuenta estas condiciones, se han elegido para este estudio los siguientes ácidos orgánicos: ácido acético, ácido cítrico y ácido succínico.

Para la determinación del cosustrato óptimo, dentro de los previamente seleccionados, se han realizado dos bloques experimentales; en primer lugar, se ha llevado a cabo un estudio preliminar para determinar la concentración a añadir de cada uno de ellos empleando como biocatalizador células de distintas edades de crecimiento; en segundo lugar, se ha realizado un estudio a lo largo del proceso de biodesulfuración, empleando células de distintas edades de crecimiento y la mezcla celular óptima, con el objetivo de seleccionar el cosustrato óptimo.

4.1.1. Estudio preliminar

La planificación experimental de este apartado se muestra en las Tablas 4.1 y 4.2. Los experimentos se han realizado en matraz *Erlenmeyer* siguiendo el protocolo experimental detallado en el apartado 2.2.2, añadiendo la concentración de cosustrato mostrada en las Tablas 4.1 y 4.2 al medio de desulfuración. En todos los casos, la concentración inicial de DBT es de 25 μM . En cada experimento se tomó una única

muestra, a los 180 minutos de proceso y se analizó el producto final, HBP, para determinar la conversión, X_{BDS} , definida como la relación entre la concentración de HBP producido en 180 minutos y la concentración inicial de DBT añadido al medio, tal y como se muestra en la ecuación [4.1]. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 4.3.

$$X_{BDS} = \frac{C_{HBP}^{180}}{C_{DBT}^0} \quad [4.1]$$

Para la interpretación de los resultados experimentales se ha definido un parámetro (Δ_{BDS}) que representa la variación de la capacidad desulfurante (X_{BDS} , definida en la ecuación [4.1]) tomando como controles los experimentos CO-01 y CO-20, en los que no se añade ningún cosustratos al medio. Este parámetro viene definido por la ecuación [4.2].

$$\Delta_{BDS} = \left(\frac{X_{BDS}|_{\text{Cosustrato}} - X_{BDS}|_{\text{Control}}}{X_{BDS}|_{\text{Control}}} \right) \times 100 \quad [4.2]$$

TABLA 4.1. Planificación experimental para el estudio de la adición de cosustratos en el proceso de biodesulfuración empleando células de 5 h de edad

Experimento	Cosustrato	Concentración (g/L)
CO-01	Ninguno	Control
CO-02	Ácido acético	2,5
CO-03	Ácido acético	5
CO-04	Ácido acético	7,5
CO-05	Ácido acético	15
CO-06	Ácido acético	20
CO-07	Ácido acético	30
CO-08	Ácido cítrico	2,5
CO-09	Ácido cítrico	5
CO-10	Ácido cítrico	7,5
CO-11	Ácido cítrico	15
CO-12	Ácido cítrico	20
CO-13	Ácido cítrico	30

TABLA 4.1 (continuación). *Planificación experimental para el estudio de la adición de cosustratos en el proceso de biodesulfuración empleando células de 5 h de edad*

Experimento	Cosustrato	Concentración (g/L)
CO-14	Ácido succínico	2,5
CO-15	Ácido succínico	5
CO-16	Ácido succínico	7,5
CO-17	Ácido succínico	15
CO-18	Ácido succínico	20
CO-19	Ácido succínico	30

TABLA 4.2. *Planificación experimental para el estudio de la adición de cosustratos en el proceso de biodesulfuración empleando células de 23 h de edad*

Experimento	Cosustrato	Concentración (g/L)
CO-20	Ninguno	Control
CO-21	Ácido acético	2,5
CO-22	Ácido acético	5
CO-23	Ácido acético	7,5
CO-24	Ácido acético	15
CO-25	Ácido acético	20
CO-26	Ácido acético	30
CO-27	Ácido cítrico	2,5
CO-28	Ácido cítrico	5
CO-29	Ácido cítrico	7,5
CO-30	Ácido cítrico	15
CO-31	Ácido cítrico	20
CO-32	Ácido cítrico	30
CO-33	Ácido succínico	2,5
CO-34	Ácido succínico	5
CO-35	Ácido succínico	7,5
CO-36	Ácido succínico	15
CO-37	Ácido succínico	20
CO-38	Ácido succínico	30

Tabla 4.3. Resultados experimentales. Desulfuración empleando células de 5 y 23 h de edad en estado de resting cells con distintas concentraciones de cosustratos

Experimento	$C_{HBP}^{180} _{5h}$ (μM)	X_{BDS}	Experimento	$C_{HBP}^{180} _{23h}$ (μM)	X_{BDS}
CO-01	7,26	0,29	CO-20	11,92	0,48
CO-02	11,75	0,47	CO-21	12,95	0,52
CO-03	13,94	0,56	CO-22	13,58	0,54
CO-04	14,88	0,60	CO-23	15,67	0,63
CO-05	16,35	0,65	CO-24	17,95	0,72
CO-06	9,29	0,37	CO-25	11,26	0,45
CO-07	3,20	0,13	CO-26	1,75	0,07
CO-08	3,97	0,16	CO-27	15,41	0,62
CO-09	5,78	0,23	CO-28	18,63	0,75
CO-10	6,84	0,27	CO-29	19,28	0,77
CO-11	8,02	0,32	CO-30	19,50	0,78
CO-12	5,35	0,21	CO-31	18,49	0,74
CO-13	1,10	0,04	CO-32	9,92	0,40
CO-14	10,74	0,43	CO-33	12,93	0,52
CO-15	13,09	0,52	CO-34	12,83	0,51
CO-16	15,46	0,62	CO-35	13,08	0,52
CO-17	17,80	0,71	CO-36	14,08	0,56
CO-18	10,45	0,42	CO-37	10,92	0,44
CO-19	3,38	0,14	CO-38	2,70	0,11

En las Figuras 4.4 y 4.5 se muestran los porcentajes de variación de la desulfuración al usar cosustratos en el medio para células de 5 y 23 horas de edad, respectivamente.

En la Figura 4.4, correspondiente a la adición de cosustratos empleando células de 5 horas de edad como biocatalizador, se observa que tanto el ácido acético como el ácido succínico mejoran el rendimiento de la desulfuración al añadirlos en el intervalo de concentraciones de 2,5 a 15 g/L, obteniéndose una mejora máxima del 125 % al añadir 15 g/L de ácido acético y del 145 % con 15 g/L de ácido succínico; con una adición de 20 g/L también se produce mejora, aunque menor, y con 30 g/L disminuye la

capacidad desulfurante de las células. La adición de ácido cítrico únicamente mejora el proceso en un 10 % cuando se añade en una concentración de 15 g/L.

Respecto al efecto de la adición de cosustratos sobre las células de 23 horas de edad, representado en la Figura 4.5, se observa que la adición de los tres cosustratos mejora el rendimiento de la desulfuración hasta que su concentración llega a los 15 g/L, concentración a partir de la cual el proceso se ve afectado de manera negativa. Los valores óptimos, obtenidos al añadir los cosustratos en una concentración de 15 g/L son: 50, 64 y 18 % para los ácidos acético, cítrico y succínico, respectivamente.

De este estudio se concluye que hay una concentración óptima de cosustrato que hace que la mejora en el proceso de desulfuración sea máxima, siendo su valor de 15 g/L. Los resultados obtenidos no son concluyentes para elegir uno de los cosustratos empleados como óptimo, ya que, mientras que las células de 5 horas se ven más beneficiadas por los ácidos acético y succínico, las células de 23 horas de edad lo hacen con los ácidos acético y cítrico. Parece, no obstante, que al combinar el efecto producido sobre cada una de las edades celulares, la adición de ácido acético con una concentración de 15 g/L es la que proporciona unos mejores resultados.

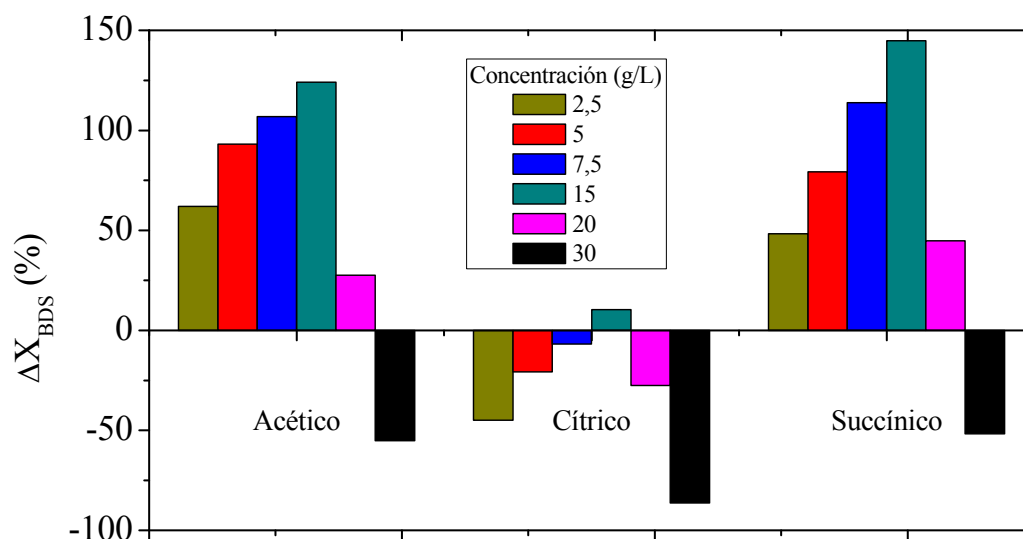


FIGURA 4.4. *Porcentaje de mejora de la desulfuración al añadir cosustratos en experimentos en resting cells con células de 5 horas de edad*

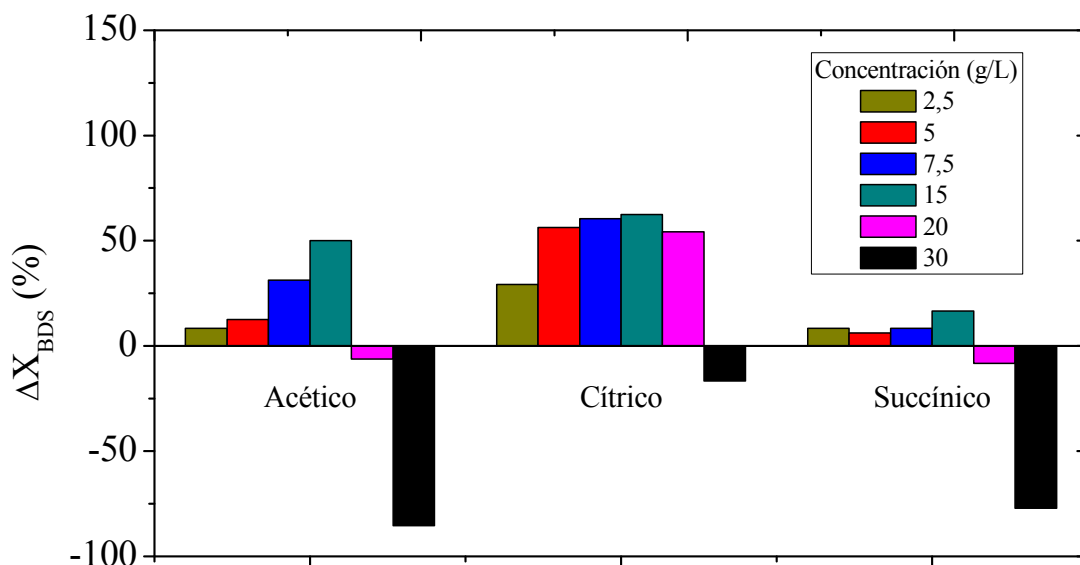


FIGURA 4.5. *Porcentaje de mejora de la desulfuración al añadir cosustratos en experimentos en resting cells con células de 23 horas de edad*

4.1.2. Efecto de la adición de cosustratos en el proceso de biodesulfuración

En el apartado anterior se ha observado que la adición de los tres cosustratos estudiados produce una mejora en el rendimiento de la desulfuración, al emplear como biocatalizador células de 5 y 23 horas de edad de crecimiento, que alcanza su valor máximo cuando éstos se añaden en una concentración de 15 g/L.

En este apartado se estudia el efecto que tiene la adición de los tres cosustratos, en una concentración de 15 g/L, a lo largo del proceso de desulfuración, en diversas condiciones, con el objetivo de seleccionar el que proporcione una mejora más significativa.

En la Tabla 4.4 se muestra la planificación realizada para abordar la experimentación de este apartado. Todos los experimentos se han llevado a cabo en matraces *Erlenmeyer*, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.2.2, añadiendo al medio de desulfuración 15 g/L del cosustrato correspondiente. En cada experimento se toman varias muestras a lo largo del proceso para analizar los compuestos clave involucrados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP), el compuesto HBPS se ha determinado por la estequiometría de la reacción, aplicando la ecuación [3.1] mostrada en el capítulo anterior.

Para cada uno de los cosustratos empleados, se han realizado cuatro experimentos de desulfuración en *resting cells*, todos ellos partiendo de una concentración inicial de DBT de 25 μM ; dos de ellos se llevan a cabo empleando como biocatalizadores células de 5 y 23 horas, también se realiza la desulfuración empleando la mezcla celular óptima y, por último, también con la mezcla óptima como biocatalizador, se ha llevado a cabo el proceso en *fed-batch*, en el que se realizan cuatro adiciones de DBT a una concentración de 25 μM cada una.

Los resultados experimentales se muestran en las Tablas 4.5 a 4.16. Para poder estudiar la influencia de la adición de los cosustratos, se toman como referencia los experimentos SIN-01, 02, 03 y 04, en los que no se añade ningún cosustrato al medio, y que corresponden a los experimentos BDS-1, 2, 3 y 4, cuyos resultados experimentales se muestran en las Tablas 3.2 a 3.5, del capítulo 3.

TABLA 4.4. Planificación experimental para el estudio de la adición de cosustratos durante el proceso de desulfuración en distintas condiciones

Experimento	Edad celular (h)	C _x (g/L)	Cosustrato	t _{BDS} (min)	Operación
SIN-01	5	0,7	-	180	<i>Batch</i>
SIN-02	23	0,7	-	180	<i>Batch</i>
SIN-03	5 + 23	2,1	-	180	<i>Batch</i>
SIN-04	5 + 23	2,1	-	300	<i>Fed-batch</i>
AC-01	5	0,7	Acético	180	<i>Batch</i>
AC-02	23	0,7	Acético	180	<i>Batch</i>
AC-03	5 + 23	2,1	Acético	180	<i>Batch</i>
AC-04	5 + 23	2,1	Acético	300	<i>Fed-batch</i>
CIT-01	5	0,7	Cítrico	180	<i>Batch</i>
CIT-02	23	0,7	Cítrico	180	<i>Batch</i>
CIT-03	5 + 23	2,1	Cítrico	180	<i>Batch</i>
CIT-04	5 + 23	2,1	Cítrico	300	<i>Fed-batch</i>
SUC-01	5	0,7	Succínico	180	<i>Batch</i>
SUC-02	23	0,7	Succínico	180	<i>Batch</i>
SUC-03	5 + 23	2,1	Succínico	180	<i>Batch</i>
SUC-04	5 + 23	2,1	Succínico	300	<i>Fed-batch</i>

TABLA 4.5. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento AC-01

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	23,14	0,96	0,90	0,00	0,00
15	18,52	2,77	2,51	0,62	0,58
30	13,43	4,09	3,64	1,86	1,98
45	9,42	4,31	4,22	3,27	3,78
60	6,51	3,96	4,63	4,16	5,74
90	2,60	2,57	4,55	5,92	9,36
120	0,97	0,69	3,09	7,22	13,03
180	0,00	0,00	1,06	8,13	15,81

TABLA 4.6. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento AC-02

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	20,77	0,34	0,25	2,30	1,34
10	16,65	0,88	0,56	4,14	2,77
15	13,45	1,04	0,73	5,22	4,56
20	10,32	1,07	0,79	6,27	6,55
30	7,64	0,95	0,83	7,33	8,25
45	3,36	0,76	0,64	8,29	11,95
60	1,14	0,48	0,31	7,99	15,08
90	0,00	0,21	0,12	5,85	18,82
120	0,00	0,10	0,00	4,79	20,11
150	0,00	0,00	0,00	4,19	20,81
180	0,00	0,00	0,00	3,42	21,58

TABLA 4.7. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento AC-03

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	14,63	0,34	0,28	5,28	4,47
10	8,64	0,21	0,22	7,62	8,31
15	3,69	0,00	0,00	8,62	12,69
20	1,05	0,00	0,00	6,52	17,43
30	0,00	0,00	0,00	3,66	21,34
45	0,00	0,00	0,00	1,88	23,12
60	0,00	0,00	0,00	0,94	24,06
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 4.8. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento CIT-01

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	21,85	3,15	0,00	0,00	0,00
10	18,18	4,53	0,86	0,00	1,43
15	15,48	5,81	1,18	0,35	2,18
20	12,83	6,78	1,76	0,85	2,78
30	11,56	6,19	2,06	1,57	3,63
45	8,36	7,31	3,11	2,10	4,13
60	5,87	7,79	3,32	2,21	5,81
90	5,62	6,52	4,86	2,13	5,87
120	4,85	6,01	6,10	1,78	6,26
150	4,16	6,11	6,26	1,04	7,43
180	3,73	5,76	6,98	0,42	8,11

TABLA 4.9. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento CIT-02

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	18,98	2,01	1,92	0,16	1,92
10	15,34	2,87	2,04	0,87	3,88
15	13,13	3,49	2,34	1,16	4,88
20	10,11	2,96	2,91	3,04	5,98
30	7,85	2,27	3,06	3,80	8,02
45	5,38	0,56	2,30	5,63	11,13
60	2,08	0,00	1,88	6,55	14,49
90	0,00	0,00	0,00	6,75	18,25
120	0,00	0,00	0,00	5,34	19,66
150	0,00	0,00	0,00	4,36	20,64
180	0,00	0,00	0,00	4,23	20,77

TABLA 4.10. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento CIT-03

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	14,33	0,31	0,50	6,85	3,00
10	9,35	0,00	0,62	7,81	7,22
15	6,35	0,00	0,54	8,82	9,29
20	3,42	0,00	0,22	7,99	13,37
30	0,00	0,00	0,00	7,51	17,49
45	0,00	0,00	0,00	3,55	21,45
60	0,00	0,00	0,00	1,24	23,76
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 4.11. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento SUC-01

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	18,35	0,14	2,13	1,93	2,45
10	13,32	0,76	3,95	3,11	3,86
15	8,80	0,93	5,05	4,33	5,90
20	4,85	1,34	6,12	5,12	7,57
30	0,89	0,32	6,13	6,67	10,99
45	0,00	0,00	5,43	6,74	12,83
60	0,00	0,00	3,41	7,01	14,58
90	0,00	0,00	0,00	7,97	17,03
120	0,00	0,00	0,00	7,54	17,46
150	0,00	0,00	0,00	6,89	18,11
180	0,00	0,00	0,00	6,60	18,40

TABLA 4.12. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento SUC-02

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	17,83	1,34	2,53	1,54	1,76
10	12,54	1,23	2,67	5,28	3,28
15	8,54	0,64	1,01	9,00	5,82
20	6,03	0,38	0,72	10,62	7,25
30	3,44	0,00	0,00	12,61	8,95
45	1,23	0,00	0,00	13,52	10,25
60	0,00	0,00	0,00	14,13	10,87
90	0,00	0,00	0,00	13,35	11,65
120	0,00	0,00	0,00	12,20	12,80
150	0,00	0,00	0,00	11,38	13,62
180	0,00	0,00	0,00	10,87	14,13

TABLA 4.13. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.**Experimento SUC-03**

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	13,14	0,85	0,20	2,45	8,37
10	9,14	0,91	0,26	3,26	11,43
15	6,76	0,73	0,24	3,31	13,96
20	4,21	0,54	0,10	3,40	16,75
30	2,32	0,37	0,00	3,55	18,76
45	0,86	0,00	0,00	2,25	21,89
60	0,00	0,00	0,00	1,28	23,72
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 4.14. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento AC-04

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	14,63	0,34	0,28	5,28	4,47
10	8,64	0,21	0,22	7,62	8,31
15	3,69	0,00	0,00	8,62	12,69
20	1,05	0,00	0,00	6,52	17,43
30	0,00	0,00	0,00	3,66	21,34
45	25,00	0,00	0,00	1,88	23,12
50	16,02	1,41	0,65	6,39	25,53
60	6,63	1,61	0,58	14,61	26,57
65	3,37	0,55	0,33	16,03	29,72
75	1,22	0,00	0,11	16,86	31,81
90	0,00	0,00	0,00	14,58	35,42
100	25,00	0,00	0,00	9,08	40,92
105	18,43	1,56	1,12	11,75	42,14
110	10,58	1,46	1,25	17,89	43,82
115	6,82	0,97	0,69	21,75	44,77
120	4,00	0,00	0,00	25,26	45,74
130	2,15	0,00	0,00	26,12	46,73
145	0,00	0,00	0,00	23,12	51,88
160	0,00	0,00	0,00	20,00	55,00
180	0,00	0,00	0,00	18,39	56,61
200	25,00	0,00	0,00	16,05	58,95
205	20,49	0,89	0,55	18,45	59,62
210	16,00	1,62	0,95	19,46	61,97
220	11,25	1,04	0,99	24,06	62,66
230	5,81	0,62	0,78	28,31	64,48
245	1,94	0,00	0,00	31,82	66,24
260	0,00	0,00	0,00	32,22	67,78
280	0,00	0,00	0,00	30,32	69,68
300	0,00	0,00	0,00	29,48	70,52

TABLA 4.15. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento CIT-04

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	14,33	0,31	0,50	6,85	3,00
10	9,35	0,00	0,62	7,81	7,22
15	6,35	0,00	0,54	8,82	9,29
20	3,42	0,00	0,22	7,99	13,37
30	0,00	0,00	0,00	7,51	17,49
45	25,00	0,00	0,00	3,55	21,45
50	16,85	0,67	1,65	7,43	23,41
60	11,28	1,61	2,22	10,73	24,17
65	7,24	1,41	2,65	12,09	26,61
75	2,11	0,97	2,84	13,87	30,21
90	0,00	0,00	0,00	15,26	34,74
100	25,00	0,00	0,00	11,39	38,61
105	17,98	0,98	1,15	15,21	39,68
110	11,73	1,38	2,14	19,87	39,88
115	6,04	1,61	2,28	24,20	40,87
120	5,06	1,24	2,46	24,38	41,86
130	2,17	0,89	2,40	27,49	42,05
145	1,25	0,40	1,50	25,47	46,38
160	0,00	0,00	0,66	23,52	50,82
180	0,00	0,00	0,00	22,96	52,04
200	25,00	0,00	0,00	21,18	53,82
205	20,87	0,00	0,00	24,25	54,88
210	15,31	0,86	0,77	27,09	55,97
220	4,53	1,49	2,31	33,16	58,51
230	3,31	1,31	2,39	34,99	58,01
245	1,43	0,82	1,12	38,27	58,36
260	0,00	0,00	0,86	40,39	58,75
280	0,00	0,00	0,18	40,71	59,11
300	0,00	0,00	0,00	40,58	59,42

TABLA 4.16. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S.

Experimento SUC-04

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	15,14	0,85	0,20	1,44	7,37
10	9,14	0,91	0,26	3,26	11,43
15	7,76	0,73	0,24	2,31	13,96
20	4,21	0,54	0,10	3,40	16,75
30	3,10	0,37	0,22	2,55	18,76
45	25,00	0,00	0,00	3,11	21,89
50	17,51	0,87	2,14	7,63	21,85
60	10,72	1,46	2,76	11,32	23,74
65	6,54	1,25	2,11	13,99	26,11
75	3,17	0,47	1,24	16,71	28,41
90	0,00	0,00	0,00	17,48	32,52
100	25,00	0,00	0,00	14,05	35,95
105	19,42	1,11	1,79	15,87	36,81
110	14,21	1,24	2,46	18,80	38,29
115	9,65	1,08	2,14	21,95	40,18
120	7,34	0,84	1,87	23,36	41,59
130	3,76	0,46	1,24	25,67	43,87
145	1,33	0,17	0,55	28,80	44,15
160	0,00	0,00	0,00	28,71	46,29
180	0,00	0,00	0,00	28,44	46,56
200	25,00	0,00	0,00	26,75	48,25
205	20,73	0,74	1,47	26,13	50,93
210	15,63	2,16	1,66	28,70	51,85
220	5,77	1,72	1,84	35,80	54,87
230	2,25	1,39	1,62	39,30	55,44
245	1,22	0,87	0,99	41,77	55,15
260	0,00	0,41	0,71	40,86	58,02
280	0,00	0,00	0,09	40,93	58,98
300	0,00	0,00	0,00	40,85	59,15

En la Tabla 4.17 se muestran los valores de los parámetros X_{BDS}^{\max} y R_{DBT}^0 (definidos en las ecuaciones [3.2] y [3.3]) correspondientes a los experimentos en los que se utilizan células de 5 y 23 horas de edad. En ella se observa que, en todos los casos, ambos parámetros aumentan al añadir cosustratos al medio de desulfuración. Para las células de 5 horas de edad, los mayores grados de desulfuración se obtienen al utilizar ácido acético y succínico, mientras que este último proporciona una mayor velocidad inicial de desaparición de DBT. En los experimentos en los que se emplean células de 23 horas de edad, el ácido acético proporciona el mayor grado de desulfuración, mientras que con ácido succínico se obtiene nuevamente una mayor velocidad inicial de eliminación de DBT. Estos efectos se observan en las Figuras 4.6 y 4.7, en las que se representa la evolución de HBP producido en los experimentos con células de 5 y 23 horas de edad, respectivamente.

La Tabla 4.18 presenta los parámetros empleados para caracterizar los experimentos realizados la mezcla óptima de células de distinta edad en *batch*. En estas condiciones, al obtener en todos los casos una desulfuración completa, para poner de manifiesto la acción del cosustrato se emplea el grado de desulfuración a los 30 minutos de experimentación, consiguiéndose con ácido acético una mayor conversión a ese tiempo. El tiempo al que se alcanza la conversión completa es, en todos los casos, 90 minutos. Al emplear cosustratos aumentan los valores de la velocidad inicial de eliminación de DBT, obteniéndose los mayores valores con el ácido succínico. Sin embargo, a pesar de la mejora que representa el empleo de cosustratos, la discriminación entre ellos, al emplear la mezcla celular, no queda bien establecida, como se observa en la Figura 4.8, que representa la evolución de HBP en los experimentos de mezcla celular en *batch*.

En la Tabla 4.19 se muestran los parámetros correspondientes a los experimentos de mezcla celular en *fed-batch*. Los parámetros se han calculado para cada adición de DBT. Se observa que el empleo de cosustratos mejora el grado de desulfuración en todos los casos. La velocidad inicial de eliminación de DBT aumenta al emplear ácido acético, mientras que, al usar ácido cítrico y succínico, mejora al principio para ir disminuyendo al final del proceso. En la Figura 4.9 se observa que la producción de HBP aumenta a partir del segundo *batch* al emplear cosustratos, siendo el ácido acético el que proporciona unos valores más altos. En la Figura 4.10 se muestra la

evolución de HBP en los experimentos en *fed-batch* y en ella se observa que es el ácido acético el cosustrato con el que se obtiene una concentración más alta.

Por otra parte, el análisis de la concentración de los tres cosustratos (ácido acético, cítrico y succínico) durante el proceso de desulfuración, siguiendo el método detallado en el apartado 2.3.4, muestra que no existe variación apreciable en la concentración de los mismos a lo largo del proceso.

TABLA 4.17. Parámetros para los experimentos de biodesulfuración en resting cells empleando como biocatalizadores células de 5 y 23 horas de edad añadiendo cosustratos

Edad celular (h)	Experimento	X_{BDS}^{max}	R_{DBT}^0 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)
5	SIN-1	0,28	0,32
	AC-1	0,63	0,37
	CIT-1	0,32	0,63
	SUC-1	0,74	1,33
23	SIN-2	0,52	0,73
	AC-2	0,86	0,85
	CIT-2	0,83	1,20
	SUC-2	0,57	1,43

TABLA 4.18. Parámetros para los experimentos de biodesulfuración en resting cells empleando como biocatalizador la mezcla celular óptima operando en batch añadiendo cosustratos

Experimento	X_{BDS}^{max}	$X_{BDS}^{30\text{min}}$	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$ (min)	R_{DBT}^0 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)
SIN-3	1,00	0,70	90	1,56
AC-3	1,00	0,85	90	2,07
CIT-3	1,00	0,70	90	2,13
SUC-3	1,00	0,75	90	2,37

TABLA 4.19. Parámetros para los experimentos de biodesulfuración en resting cells empleando como biocatalizador la mezcla celular óptima operando en fed-batch añadiendo cosustratos

Experimento	Ciclo	$X_{BDS}^{máx}$	R_{DBT}^0 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)
SIN-4	1	0,88	1,56
	2	0,28	1,37
	3	0,26	1,35
	4	0,12	1,03
AC-4	1	0,92	2,07
	2	0,71	1,80
	3	0,72	1,31
	4	0,46	0,90
CIT-4	1	0,86	2,13
	2	0,69	1,63
	3	0,61	1,40
	4	0,21	0,83
SUC-4	1	0,88	1,97
	2	0,56	1,50
	3	0,49	1,12
	4	0,44	0,85

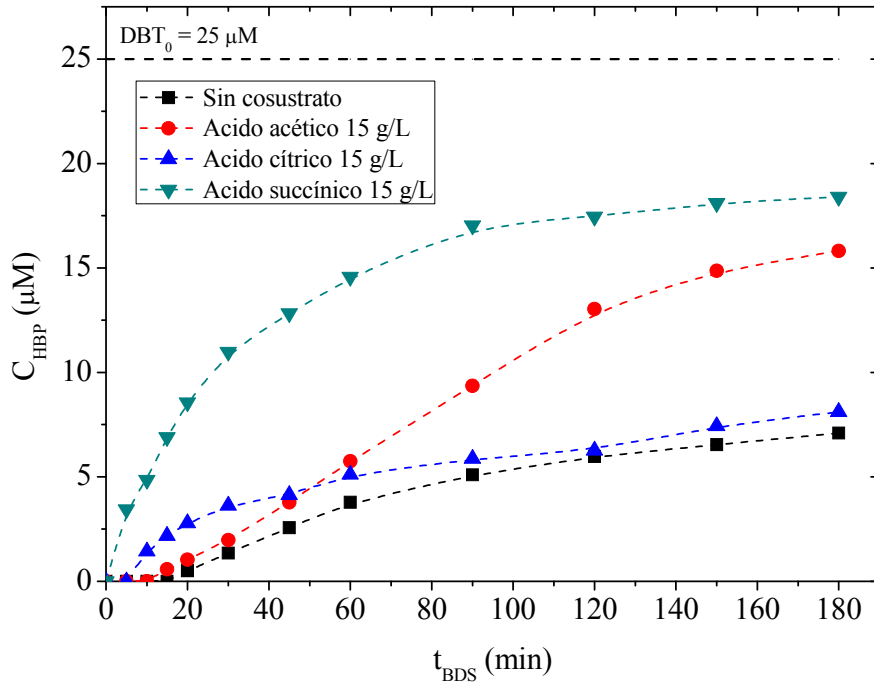


FIGURA 4.6. Comparación de la producción de HBP empleando diversos cosustratos. BDS en resting cells con células de 5 horas de edad

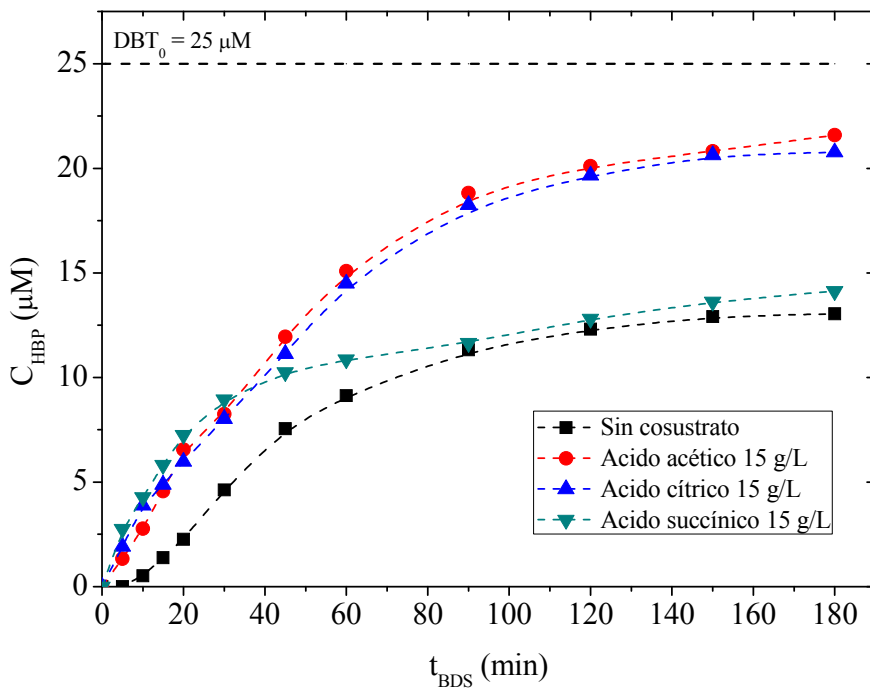


FIGURA 4.7. Comparación de la producción de HBP empleando diversos cosustratos. BDS en resting cells con células de 23 horas de edad

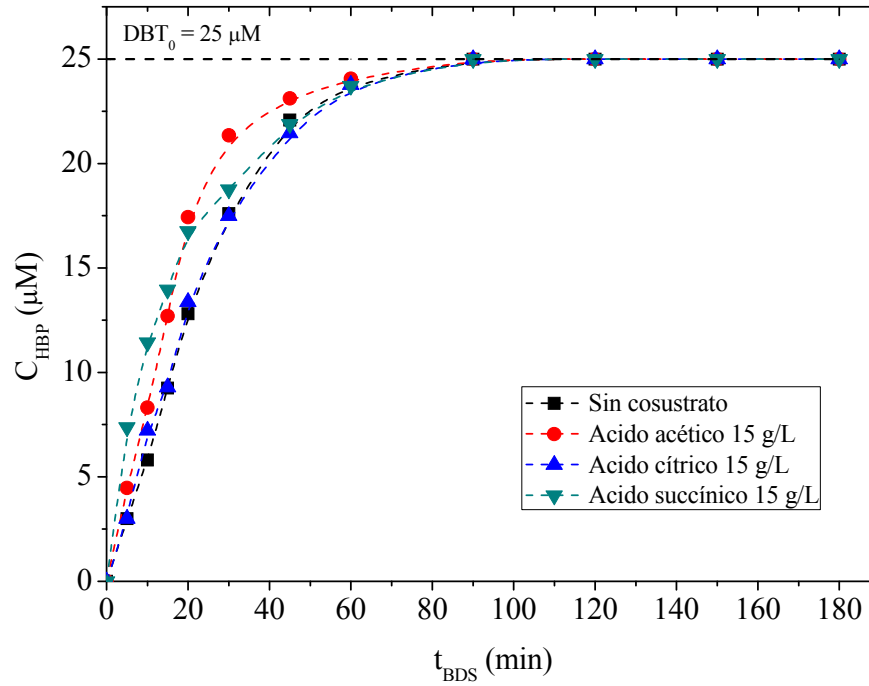


FIGURA 4.8. Comparación de la producción de HBP empleando diversos cosustratos. BDS en resting cells usando mezcla celular operando en batch

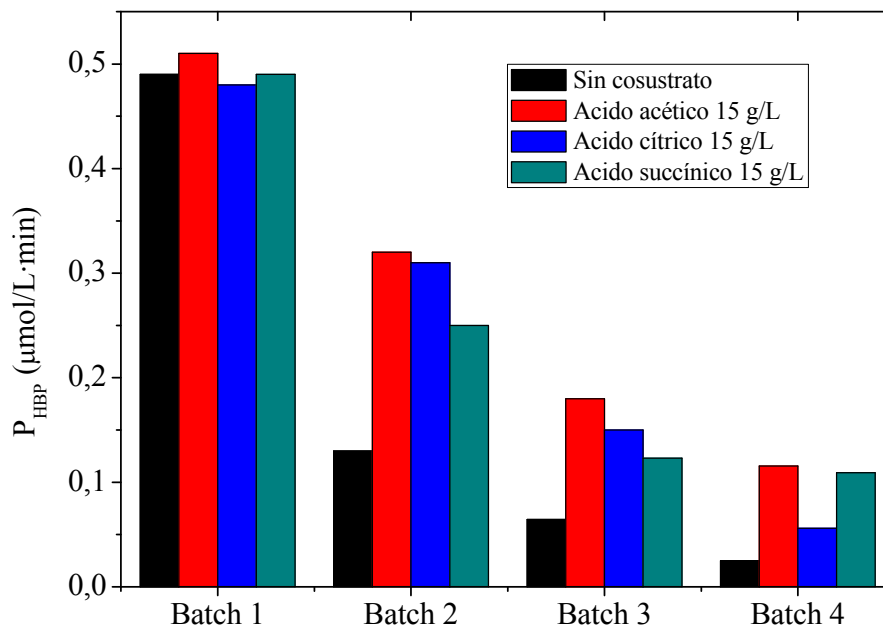


FIGURA 4.9. Comparación de la productividad a HBP en cada batch empleando cosustratos. BDS en resting cells usando mezcla celular operando en fed-batch

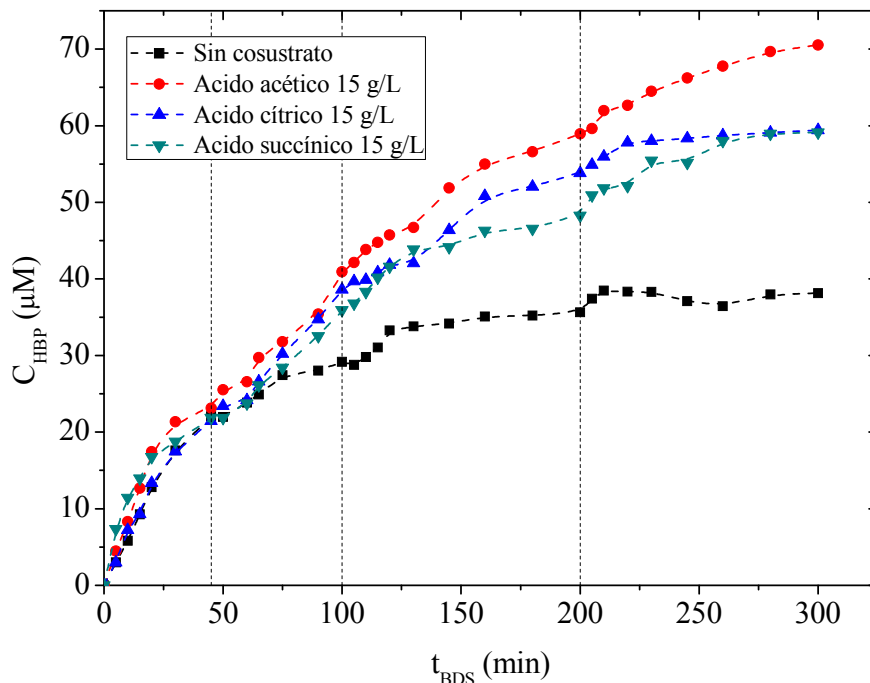


FIGURA 4.10. Comparación de la producción de HBP empleando diversos cosustratos. BDS en resting cells usando mezcla celular en operación fed-batch. Las líneas discontinuas representan cada adición de DBT

4.2. ESTUDIO de la ADICIÓN de ÁCIDO ACÉTICO

Una vez determinado en el apartado anterior que, de los tres cosustratos estudiados, la adición de ácido acético con una concentración de 15 g/L proporciona los mejores resultados, en este apartado se estudia el efecto que dicha adición tiene sobre varios factores involucrados en el proceso de desulfuración. Los aspectos a estudiar son, por una parte, el efecto del cosustrato sobre las velocidades de la ruta 4S de manera individual y, por otra parte, el efecto sobre las concentraciones intracelulares de NADH y ATP durante el proceso. La influencia de la concentración de NADH se observó en el capítulo anterior y, debido a su papel fundamental en la obtención de energía celular, la concentración de ATP puede ser también un factor clave en la evolución del proceso de desulfuración. Como se ha comentado anteriormente, la adición de cosustratos al medio puede traducirse en una regeneración de NADH y una mayor producción de ATP. Estos aspectos se estudian a continuación.

4.2.1. Efecto sobre cada reacción de la ruta 4S

En este apartado se estudia el efecto de la adición de ácido acético al medio de desulfuración en cada una de las reacciones de la ruta 4S, con el objetivo de determinar si dicho efecto se produce por igual en todas las reacciones o si alguna de ellas se ve afectada de una manera más significativa.

Para estudiar cada reacción de forma aislada, se han realizado ensayos de desulfuración variando el sustrato inicial en función de la reacción a estudiar. De esta manera, para el estudio de r_1 , r_2 , r_3 y r_4 , se han empleado como sustratos iniciales DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS, respectivamente. Los experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer* empleando la mezcla celular óptima como biocatalizador, con una concentración total de biomasa de 2,1 g/L, siguiendo los procedimientos experimentales detallados en el apartado 2.2. La concentración inicial del sustrato empleado es, en todos los casos, de 25 μM. La planificación experimental para la realización de este estudio se muestra en la Tabla 4.20. En la Tabla 4.21 se presentan los resultados de los experimentos mostrados en la Tabla 4.20. Para cada experimento se ha analizado la evolución de la concentración del sustrato inicial empleado siguiendo el método de análisis detallado en el apartado 2.3.2.

TABLA 4.20. Planificación experimental para el estudio del efecto del cosustrato en las velocidades de reacción individualmente

Experimento	Sustrato inicial	Reacción estudiada	Cosustrato
4S-01	DBT	r_1	-
4S-02	DBT	r_1	Acético 15 g/L
4S-03	DBTO	r_2	-
4S-04	DBTO	r_2	Acético 15 g/L
4S-05	DBTO ₂	r_3	-
4S-06	DBTO ₂	r_3	Acético 15 g/L
4S-07	HBPS	r_4	-
4S-08	HBPS	r_4	Acético 15 g/L

La representación gráfica de los resultados experimentales se muestra en la Figura 4.11. En ella se observa que las dos primeras reacciones de la ruta 4S (oxidación de DBT a DBTO y oxidación de DBTO a DBTO₂) se ven muy poco afectadas por la adición de ácido acético. La tercera reacción (oxidación de DBTO₂ a HBPS) transcurre ligeramente más rápido en presencia de ácido acético. La cuarta reacción (transformación de HBPS en HBP) es la que más se ve afectada; en ausencia de cosustrato, la mezcla celular solo es capaz de transformar aproximadamente el 60 % del HBPS inicial (25 μM) en HBP, deteniéndose la reacción; mientras que al añadir ácido acético al medio se consigue la conversión completa en 120 minutos. Estas observaciones ponen de manifiesto que, si bien las velocidades de todas las reacciones de la ruta 4S aumentan en mayor o menor medida, la adición de ácido acético afecta principalmente a la cuarta reacción, que en el siguiente apartado se estudia en más profundidad.

TABLA 4.21. Resultados experimentales. Evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S implicados en el estudio del efecto de la adición de ácido acético sobre las velocidades de reacción

t (min)	4S-01	4S-02	4S-03	4S-04	4S-05	4S-06	4S-07	4S-08
	C _{DBT} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{DBTO} (μM)	C _{DBTO} (μM)	C _{DBTO₂} (μM)	C _{DBTO₂} (μM)	C _{HBPS} (μM)	C _{HBPS} (μM)
0	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
5	17,21	14,63	10,23	7,11	19,79	17,78	-	-
10	9,77	8,64	2,53	0,00	16,69	13,39	-	-
15	4,53	3,69	0,00	0,00	13,46	7,76	16,98	12,95
20	1,56	1,05	0,00	0,00	-	-	-	-
30	0,00	0,00	0,00	0,00	6,30	0,00	14,65	7,31
45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	0,00	11,82	5,31
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,88	3,40
75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,58	2,24
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,49	1,07
120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,52	0,00

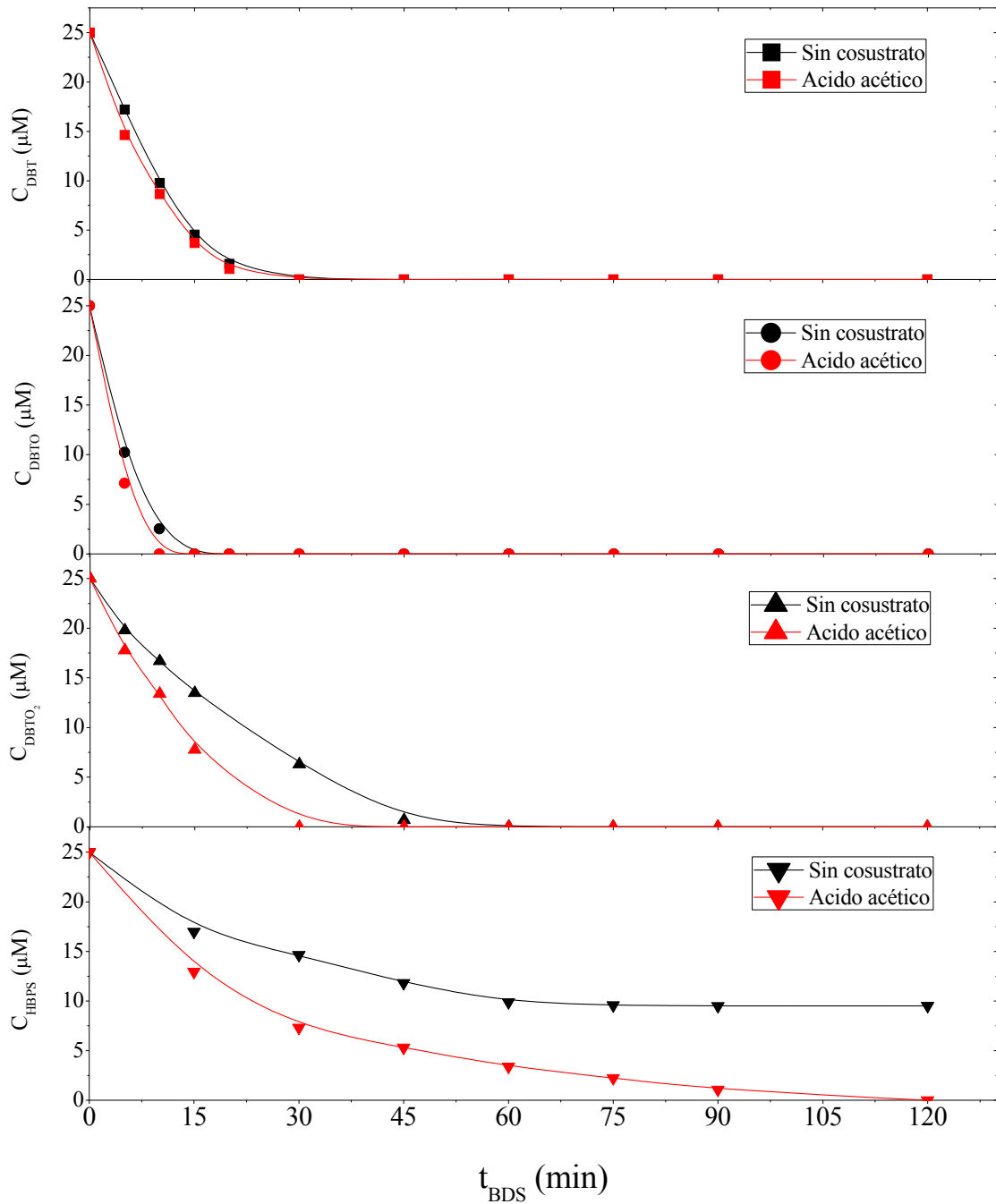


FIGURA 4.11. Efecto de la adición de ácido acético en la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS) empleados como sustratos iniciales

En el siguiente bloque experimental, se estudia la influencia de la adición de ácido acético en la cuarta reacción de la ruta 4S; para ello, se han realizado varios experimentos de desulfuración, con y sin ácido acético, en los que el sustrato inicial empleado ha sido HBPS en distintas concentraciones.

Los experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer* empleando la mezcla celular óptima como biocatalizador, con una concentración de biomasa de 2,1 g/L, siguiendo los procedimientos experimentales detallados en el apartado 2.2. La concentración inicial de HBPS varía en el intervalo de 10 a 100 μM . La planificación experimental para la realización de este estudio se muestra en la Tabla 4.22.

En la Tabla 4.23 se presentan los resultados de los experimentos mostrados en la Tabla 4.22. Para cada experimento se ha analizado la evolución de la concentración del compuesto final (HBP) siguiendo el método detallado en el apartado 2.3.2. En la Tabla 4.23 se observa que, en los experimentos en los que no se añade ningún cosustrato (H-01 a H-05), en ningún caso llega a obtenerse una conversión completa a HBP y, además, se observa que a partir de una concentración inicial de HBPS de 50 μM , la concentración de HBP alcanzada es siempre la misma, aproximadamente 24 μM . En los experimentos en los que se añade ácido acético (H-06 a H-10) se consigue la conversión completa a HBP cuando la concentración inicial de HBPS es de 10 y 25 μM ; sin embargo, para los experimentos con una concentración inicial de HBPS mayor de 25 μM , no se obtiene todo el HBP estequiométricamente posible.

En las Figuras 4.12 y 4.13 se representa la evolución de la conversión del proceso (X_{BDS} , definida en la ecuación [4.1]) con el tiempo en los experimentos sin cosustrato (Figura 4.12) y con ácido acético (Figura 4.13). En ellas se observa que la conversión final del proceso disminuye al aumentar la concentración inicial de HBPS, siendo esta mayor, en todos los casos, al emplear ácido acético.

TABLA 4.22. Planificación experimental para el estudio del efecto de la concentración inicial de HBPS y la adición de ácido acético en la cuarta reacción de la ruta 4S

Experimento	C_{HBPS}^0 (μM)	Cosustrato
H-01	10	Ninguno
H-02	25	
H-03	50	
H-04	75	
H-05	100	
H-06	10	Acido acético 15 g/L
H-07	25	
H-08	50	
H-09	75	
H-10	100	

TABLA 4.23. Evolución de la concentración de HBP en los experimentos realizados para estudiar la cuarta reacción de la ruta 4S

t (min)	H-01	H-02	H-03	H-04	H-05	H-06	H-07	H-08	H-09	H-10
	C_{HBP} (μM)									
	Sin cosustrato					Acido acético 15 g/L				
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	5,05	7,94	9,68	10,29	10,47	7,14	11,47	15,77	19,45	20,45
30	6,14	9,89	15,12	16,43	16,56	8,68	16,88	29,55	31,43	31,43
45	6,70	12,72	18,81	20,40	19,14	8,99	19,53	31,47	37,85	36,86
60	7,67	14,46	21,03	22,00	20,64	9,89	22,18	34,83	40,04	43,46
75	7,98	15,10	22,49	22,67	22,97	10,00	22,49	36,96	43,12	47,75
90	8,04	15,41	25,09	23,35	24,28	10,00	23,61	38,59	45,62	49,75
120	8,27	16,18	24,35	24,54	25,07	10,00	25,00	40,88	49,38	52,13
150	8,66	16,50	24,21	24,50	24,89	10,00	25,00	41,76	51,86	53,85

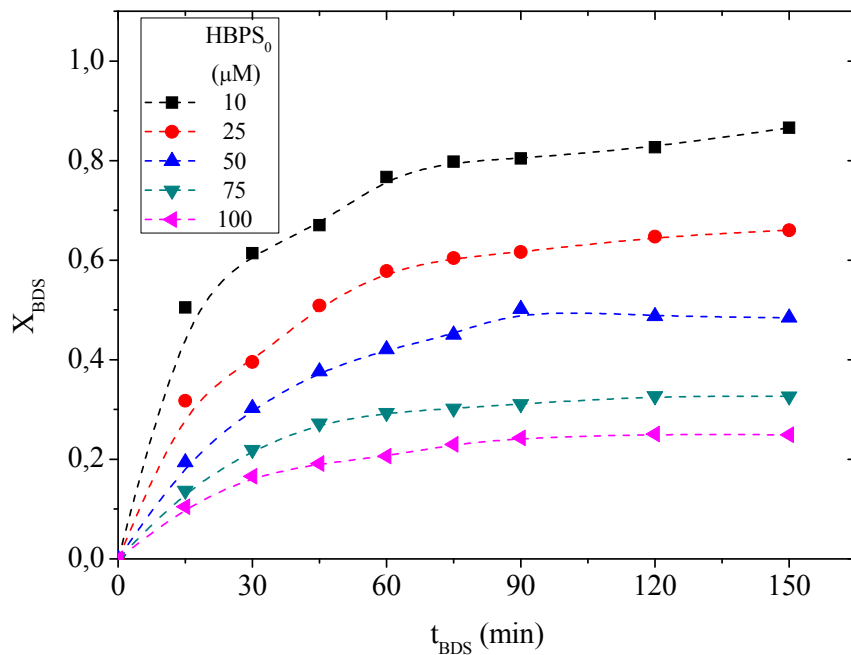


FIGURA 4.12. Evolución de la conversión a HBP (X_{BDS}) en experimentos de BDS sin la adición de cosustratos empleando distintas concentraciones de HBPS como sustrato inicial

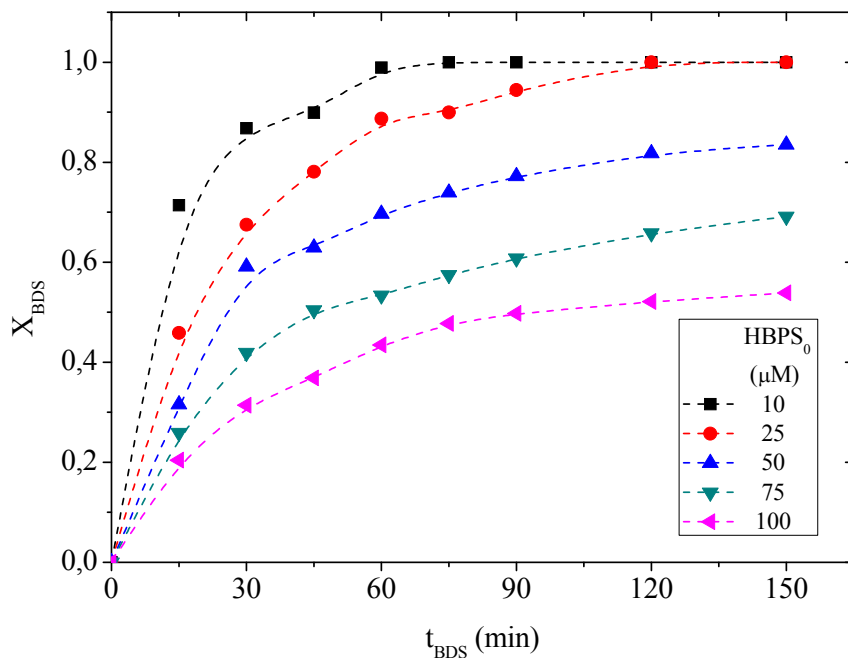


FIGURA 4.13. Evolución de la conversión a HBP (X_{BDS}) en experimentos de BDS añadiendo 15 g/L de ácido acético, empleando distintas concentraciones de HBPS como sustrato inicial

4.2.2. Variación de las concentraciones de NADH y ATP

En este apartado se estudia el efecto de la adición de ácido acético en la evolución de NADH y ATP durante el proceso de desulfuración, con el objetivo de confirmar si, tal y como se ha apuntado, dicha adición produce un aumento en la concentración de ambos compuestos que pueda explicar el aumento en la capacidad desulfurante de las células.

La medida de la evolución de NADH y ATP se realiza en experimentos de desulfuración empleando biocatalizadores de 5 y 23 horas de edad celular, y con la mezcla óptima, con una concentración de biomasa de 0,7 g/L y 2,1 g/L de células de 5 y 23 horas de edad, respectivamente; en el caso de la mezcla celular, se realizó el proceso de BDS en *batch* y en *fed-batch*. Los experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer*, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 2.2.2, tomándose muestras a distintos tiempos para el análisis de NADH y ATP. El análisis de NADH se ha realizado mediante el método espectrofluorométrico descrito en el apartado 2.3.6 y, el análisis de ATP mediante un kit comercial, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.4. La planificación experimental se muestra en la Tabla 4.24.

En las Tablas 4.25 y 4.26 se muestran los resultados correspondientes a la evolución de NADH y ATP, respectivamente, de los experimentos descritos en la Tabla 4.24. En la Figura 4.14 se representan los resultados experimentales de evolución de la concentración de NADH y ATP, comparando los experimentos realizados sin la adición de ningún cosustrato al medio con los experimentos realizados empleando ácido acético como cosustrato.

En los experimentos realizados con células de 5 y 23 horas y en el experimento realizado empleando la mezcla óptima operando en *batch* (Figura 4.14, gráficas A, B y C), se observa un comportamiento similar, tanto para la evolución de NADH, como para la evolución de ATP. Al inicio de la reacción la concentración de ambos metabolitos es mayor cuando se emplea ácido acético como cosustrato (aproximadamente un 30 % mayor). Con el transcurso de la reacción, la concentración disminuye, obteniéndose, al final del proceso, unas concentraciones de NADH y ATP similares, independientemente del biocatalizador empleado (células de 5 horas, 23 horas o mezcla celular) y de la composición del medio (sin cosustrato o con ácido acético).

El comportamiento de los experimentos realizados en *fed-batch* es distinto (Figura 4.14, gráficas D). En este caso, la concentración inicial tanto de NADH como

de ATP sigue siendo aproximadamente un 30 % mayor al emplear ácido acético, sin embargo, la evolución de la concentración de ambos compuestos durante la reacción es distinta de los casos anteriores, ya que, al final del proceso, la diferencia de concentración sigue siendo similar a la inicial.

Los resultados confirman la hipótesis de que la adición de ácido acético produce un aumento en los niveles de concentración tanto de NADH, como de ATP. También se observa que, al realizar la BDS en *fed-batch*, empleando la mezcla celular como biocatalizador, las concentraciones de ambos metabolitos son mayores que al realizar el proceso en *batch*.

TABLA 4.24. Planificación experimental para el estudio de la influencia de la adición de ácido acético sobre la concentración de NADH y ATP

Experimento	C _{X5 h} (g/L)	C _{X23 h} (g/L)	Cosustrato	Operación
NADH-1*	0,7	-	-	<i>Batch</i>
NADH-2*	-	0,7	-	<i>Batch</i>
NADH-3	0,7	1,4	-	<i>Batch</i>
NADH-4	0,7	1,4	-	<i>Fed-batch</i>
NADH-5	0,7	-	Acético 15 g/L	<i>Batch</i>
NADH-6	-	0,7	Acético 15 g/L	<i>Batch</i>
NAHD-7	0,7	1,4	Acético 15 g/L	<i>Batch</i>
NADH-8	0,7	1,4	Acético 15 g/L	<i>Fed-batch</i>
ATP-1	0,7	-	-	<i>Batch</i>
ATP-2	-	0,7	-	<i>Batch</i>
ATP-3	0,7	1,4	-	<i>Batch</i>
ATP-4	0,7	1,4	-	<i>Fed-batch</i>
ATP-5	0,7	-	Acético 15 g/L	<i>Batch</i>
ATP-6	-	0,7	Acético 15 g/L	<i>Batch</i>
ATP-7	0,7	1,4	Acético 15 g/L	<i>Batch</i>
ATP-8	0,7	1,4	Acético 15 g/L	<i>Fed-batch</i>

* corresponden a los experimentos NADH-1 y NADH-2 del capítulo 3.

TABLA 4.25. Evolución de la concentración de NADH

t (min)	NADH-1	NADH-2	NADH-3	NADH-4	NADH-5	NADH-6	NADH-7	NADH-8
	C_{NADH} (μmol_{NADH}/gx)							
0	1,16	1,10	1,27	1,27	1,53	1,49	1,87	1,87
45	1,01	0,84	1,09	1,09	1,42	1,02	1,62	1,62
100	0,83	0,61	0,82	0,94	1,21	0,71	1,30	1,47
150	0,69	0,53	0,65	0,85	1,00	0,53	1,14	1,41
200	0,62	0,47	0,65	0,79	0,87	0,47	0,88	1,29
240	0,58	0,42	-	-	0,78	0,51	-	-
300	0,53	0,40	0,63	0,61	0,74	0,46	0,68	1,21

TABLA 4.26. Evolución de la concentración de ATP

t (min)	ATP-1	ATP-2	ATP-3	ATP-4	ATP-5	ATP-6	ATP-7	ATP-8
	C_{ATP} (nmol_{ATP}/gx)							
0	38,19	37,12	39,53	39,53	50,35	48,11	52,11	52,11
45	19,15	22,04	23,44	23,44	33,02	31,24	35,06	35,06
100	8,42	11,42	13,11	16,25	19,13	19,24	24,16	31,09
150	5,26	7,10	6,34	10,12	11,52	9,11	16,22	27,54
200	4,50	9,11	6,77	10,32	8,43	6,43	11,13	24,42
240	4,43	6,43	-	-	7,46	6,33	-	-
300	4,37	6,24	5,91	9,47	8,59	6,24	9,05	22,95

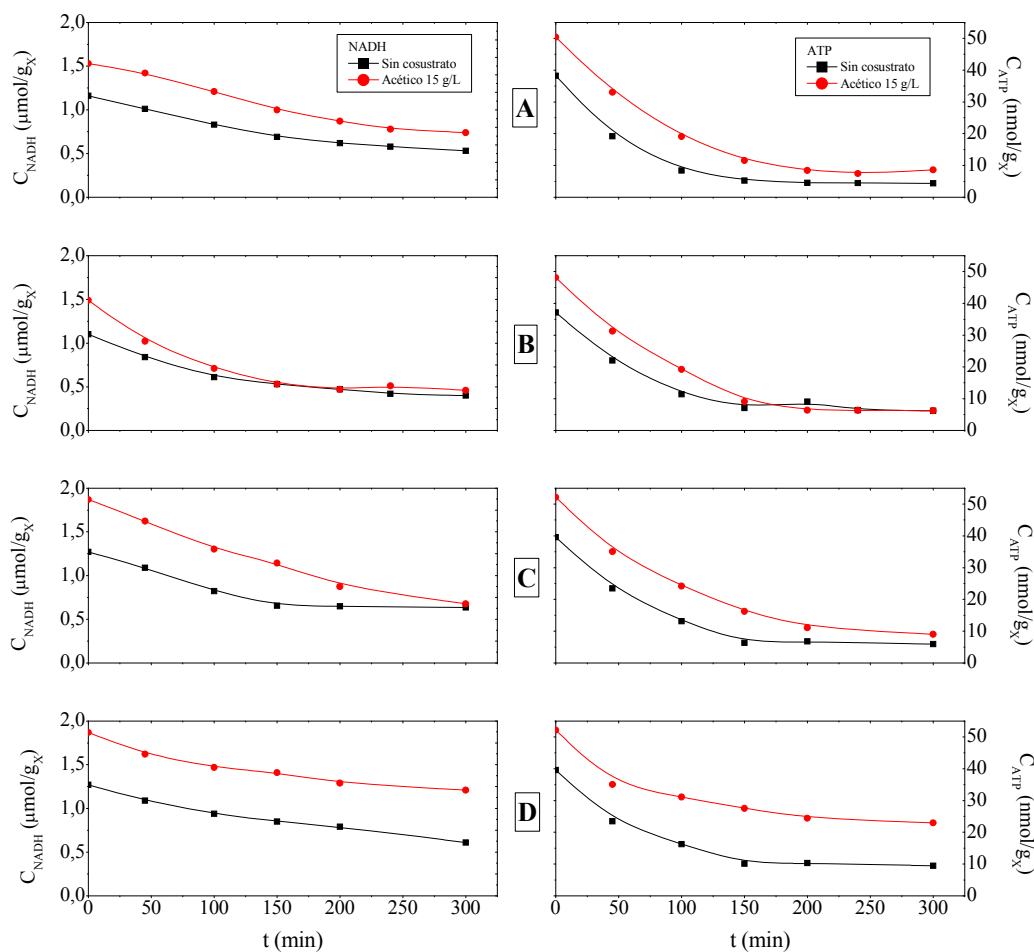


FIGURA 4.14. Efecto de la adición de ácido acético en la evolución de la concentración de NADH y ATP. BDS en resting cells empleando: A) células de 5 horas de edad; B) células de 23 horas de edad; C) mezcla celular óptima en batch; D) mezcla celular óptima en fed-batch

A continuación se estudia la adición de NADH y ATP al medio de desulfuración con el objetivo de comprobar si se reproduce el mismo comportamiento observado al añadir ácido acético al medio. Los experimentos se han realizado en matraz *Erlenmeyer*, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.2.2 empleando células de 5 y de 23 horas de edad como biocatalizadores. En todos los casos, el compuesto inicial es DBT, con una concentración inicial de $25 \mu\text{M}$. Para cada edad celular se han llevado a cabo los siguientes experimentos: en primer lugar, y como experimentos de control, se han realizado dos ensayos de desulfuración, uno sin añadir ácido acético como cosustrato y otro con una concentración de ácido acético de 15 g/L , a estos experimentos no se ha añadido NADH y ATP; en segundo lugar, se ha realizado un experimento en el que se añaden al medio de reacción las cantidades de NADH y ATP necesarias para obtener una concentración inicial de $2 \mu\text{mol/g}_X$, para NADH, y de 20 nmol/g_X para ATP, suficientes para elevar la concentración de ambos compuestos a los niveles obtenidos al

añadir ácido acético al medio; por último, se ha realizado el mismo experimento de adición de NADH y ATP pero, en este caso, homogeneizando las células para eliminar los efectos de transporte a través de la membrana celular. Para ello las células se mezclan con microesferas de vidrio (marca Sigma, ref. G4649) y se introducen en un homogeneizador de la marca Braun Biotech, modelo Mikro-Dismembrator S durante 2,5 minutos. La planificación experimental de este apartado se muestra en la Tabla 4.27.

Los resultados experimentales se muestran en las Tablas 4.28 y 4.29. En las Figuras 4.15 y 4.16 se representa la conversión (X_{BDS} , definida en la ecuación [4.1]) a lo largo del proceso de desulfuración de todos los experimentos realizados con células de 5 y 23 horas de edad, respectivamente. En dichas figuras se observa que la adición de NADH y ATP al medio no produce ninguna mejora en el desarrollo del proceso, siendo necesario que las células empleen los cofactores que ellas mismas producen, efecto que debe ser favorecido por la adición de cosustratos.

En el apartado 4.1.2 se observó que la concentración de cosustrato no varía apreciablemente durante el proceso de desulfuración. Este comportamiento puede deberse a que las concentraciones de los compuestos de la ruta 4S, así como de NADH y ATP son varios órdenes de magnitud menores que la concentración de cosustrato, por lo que su consumo para producir los efectos observados en este capítulo sería despreciable. El hecho de que sea necesario añadir 15 g/L de cosustrato para obtener los mejores resultados puede deberse a factores de naturaleza bioquímica (transporte a través de la membrana, balance energético, etc).

TABLA 4.27. Planificación experimental para el estudio del efecto de la adición de NADH y ATP en la biodesulfuración

Experimento	Edad celular (h)	Cofactor / Cosustrato añadido	Estado celular
AD-1	5	-	Enteras
AD-2		Acido acético	Enteras
AD-3		ATP + NADH	Homogeneizadas
AD-4		ATP + NADH	Enteras
AD-5	23	-	Enteras
AD-6		Acido acético	Enteras
AD-7		ATP + NADH	Homogeneizadas
AD-8		ATP + NADH	Enteras

TABLA 4.28. Evolución de la concentración de DBT y HBP en los experimentos realizados para comprobar el efecto de la adición de NADH y ATP sobre el medio de reacción empleando células de 5 horas como biocatalizador

t (min)	AD-1		AD-2		AD-3		AD-4	
	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)
0	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00
15	19,36	0,00	18,52	0,58	15,42	0,00	18,28	0,78
30	14,18	1,35	16,53	1,03	10,89	1,21	12,34	2,95
45	9,36	2,56	9,42	3,78	7,31	2,76	6,51	3,21
60	5,36	3,78	6,51	5,74	4,40	3,65	3,89	3,89
90	1,86	5,10	2,60	9,36	3,21	4,35	1,46	4,65
120	0,69	5,97	0,97	13,03	0,00	5,41	0,35	5,74
180	0,00	7,09	0,00	15,81	0,00	6,64	0,00	7,21

TABLA 4.29. Evolución de la concentración de DBT y HBP en los experimentos realizados para comprobar el efecto de la adición de NADH y ATP sobre el medio de reacción empleando células de 23 horas como biocatalizador

t (min)	AD-5		AD-6		AD-7		AD-7	
	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)	C _{DBT} (μ M)	C _{HBP} (μ M)
0	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00
15	16,81	1,39	13,45	4,56	14,32	2,49	14,96	3,11
30	10,27	4,63	7,64	8,25	6,87	6,11	8,54	4,67
45	5,22	7,55	3,36	11,95	5,86	7,23	2,00	6,77
60	2,75	9,13	1,14	15,08	0,00	8,43	0,00	7,29
90	0,98	11,32	0,00	18,82	0,00	9,62	0,00	8,62
120	0,00	12,31	0,00	20,11	0,00	11,07	0,00	9,79
180	0,00	13,04	0,00	21,58	0,00	13,41	0,00	11,04

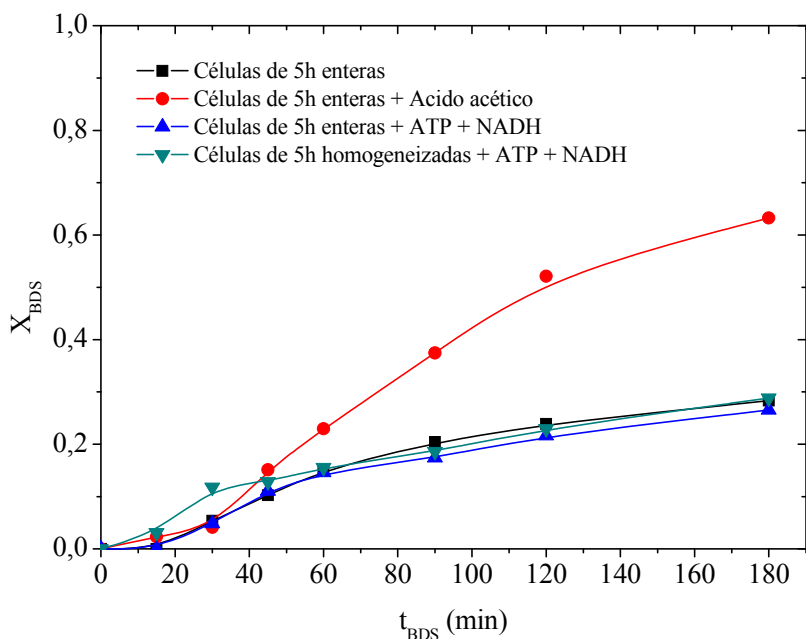


FIGURA 4.15. Evolución de la conversión del proceso en los experimentos realizados para comprobar el efecto de la adición de NADH y ATP sobre el medio de reacción empleando células de 5 horas como biocatalizador

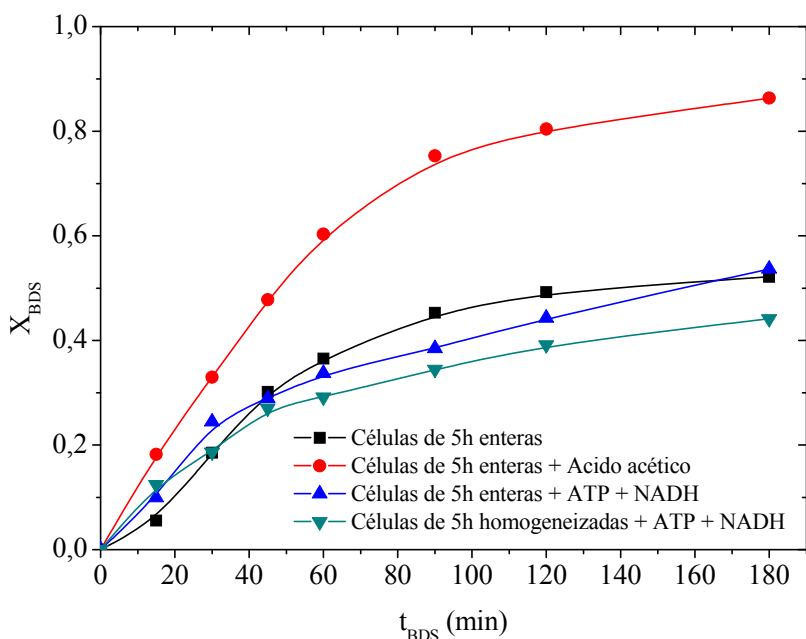


FIGURA 4.16. Evolución de la conversión del proceso en los experimentos realizados para comprobar el efecto de la adición de NADH y ATP sobre el medio de reacción empleando células de 23 horas como biocatalizador

4.3. MODELO CINÉTICO INCLUYENDO la EVOLUCIÓN de la CONCENTRACIÓN de NADH y ATP

En este apartado se desarrolla un modelo cinético para describir la evolución con el tiempo de los compuestos implicados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) en el que se incorpora la concentración de NADH y ATP. Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que, si bien todas las velocidades de reacción de la ruta 4S aumentan con el empleo de ácido acético como cosustrato, es la cuarta reacción la que se ve más afectada, presentando un aumento mucho más significativo que las demás. Asimismo, se ha comprobado que la adición de ácido acético conlleva un aumento tanto de NADH como de ATP, siendo ambos compuestos esenciales en el metabolismo celular. Debido a estas consideraciones, en este apartado se propone una modificación en las ecuaciones cinéticas planteadas en el apartado 3.3.2 (Ecuaciones [3.47] a [3.50]), en las que ya se incorporó la concentración de NADH, sustituyendo el término de desactivación enzimática de la cuarta reacción ($\exp(-s_4 t)$) por los valores de concentración de ATP, obteniéndose las ecuaciones [4.3] a [4.6].

$$r_1 = \frac{k_1' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X \quad [4.3]$$

$$r_2 = \frac{k_2' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [4.4]$$

$$r_3 = \frac{k_3' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [4.5]$$

$$r_4 = \frac{k_4'' \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS}}{1 + K_1' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [4.6]$$

Determinación de los parámetros cinéticos preliminares

En primer lugar se ha aplicado el método de velocidades de reacción, detallado en el apartado 2.4, para determinar los valores preliminares de los parámetros cinéticos empleando las ecuaciones [4.3] a [4.6]. Los datos experimentales son los correspondientes a los experimentos de desulfuración empleando células de 5 y 23 horas de edad de crecimiento suplementados con 15 g/L de ácido acético como

cosustrato (Tablas 4.5 y 4.6), y los correspondientes a la evolución de la concentración de NADH y ATP durante el proceso de desulfuración (Tablas 4.25 y 4.26).

Los valores de los parámetros cinéticos preliminares se muestran en las Tablas 4.30 y 4.31, correspondientes a los experimentos con células de 5 y 23 horas de edad de crecimiento, respectivamente. Se observa que los valores obtenidos cumplen con los criterios estadísticos de ajuste.

TABLA 4.30. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción empleando células de 5h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$6,67 \cdot 10^{-2}$	$1,11 \cdot 10^{-3}$	3638,37	3,44	9,59
$k'_{2 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$1,35 \cdot 10^{-1}$	$2,74 \cdot 10^{-3}$	2436,22	3,44	11,80
$k'_{3 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$6,91 \cdot 10^{-2}$	$4,89 \cdot 10^{-4}$	19976,56	3,44	1,06
$k'_{4 5h} \left(\frac{L^2}{\text{nmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$3,45 \cdot 10^{-3}$	$3,79 \cdot 10^{-5}$	830,3	3,44	1,03

TABLA 4.31. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción empleando células de 23h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 23h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$1,40 \cdot 10^{-1}$	$2,07 \cdot 10^{-3}$	4601,86	3,44	10,2
$k'_{2 23h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$4,64 \cdot 10^{-1}$	$3,88 \cdot 10^{-2}$	143,03	3,44	28,51
$k'_{3 23h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$4,36 \cdot 10^{-1}$	$4,05 \cdot 10^{-2}$	116,07	3,44	32,48
$k'_{4 23h} \left(\frac{L^2}{\text{nmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$4,34 \cdot 10^{-3}$	$6,13 \cdot 10^{-5}$	4999,36	3,44	4,70

Determinación de los valores óptimos de los parámetros cinéticos

Aplicando el método de velocidades de producción, detallado en el apartado 2.4, considerando en este caso las ecuaciones cinéticas [4.3] a [4.6], se obtiene el sistema formado por las ecuaciones [4.7] a [4.11].

Para la determinación de los valores óptimos de los parámetros cinéticos del modelo propuesto en el presente capítulo se ha ajustado simultáneamente el sistema de ecuaciones formado por las expresiones [4.7] a [4.11] junto con el sistema formado por las expresiones [3.51] a [3.55] del capítulo anterior, empleando como valores iniciales de iteración los parámetros cinéticos preliminares obtenidos anteriormente. Las ecuaciones cinéticas planteadas en ambos casos son las mismas para las tres primeras reacciones de la ruta 4S y únicamente difieren en la última reacción. El ajuste simultáneo de ambos modelos permite obtener un conjunto único de parámetros cinéticos correspondientes a las tres primeras reacciones de la ruta 4S.

Los valores óptimos de los parámetros cinéticos obtenidos se recogen en las Tablas 4.32 (desulfuración con células de 5 horas de edad) y 4.33 (desulfuración con células de 23 horas de edad), valores que, nuevamente, cumplen con los criterios estadísticos de ajuste.

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = - \frac{k_1' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X \quad [4.7]$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = \frac{k_1' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X - \frac{k_2' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X \quad [4.8]$$

$$\frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = \frac{k_2' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X - \frac{k_3' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X \quad [4.9]$$

$$\frac{dC_{HBPS}}{dt} = \frac{k_3' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X - \frac{k_4'' \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS}}{1 + K_1' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [4.10]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \frac{k_4'' \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS}}{1 + K_1' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X \quad [4.11]$$

TABLA 4.32. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción empleando células de 5h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$8,30 \cdot 10^{-2}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{2 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$1,65 \cdot 10^{-1}$	$6,82 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{3 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$6,13 \cdot 10^{-2}$	$1,93 \cdot 10^{-3}$	3318,29	1,40	74,74
$k'_{4 5h} \left(\frac{L}{\text{g}_X \text{ min}} \right)$	$3,23 \cdot 10^{-1}$	$5,36 \cdot 10^{-2}$			
$s_{4 5h} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$3,06 \cdot 10^{-2}$	$5,81 \cdot 10^{-4}$			
$k''_{4 5h} \left(\frac{L^2}{\text{nmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$3,06 \cdot 10^{-3}$	$1,08 \cdot 10^{-3}$			

TABLA 4.33. Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción empleando células de 23h de edad

Parámetro	Valor	Intervalo confianza	F _F		SRC
			Calc.	Tab.	
$k'_{1 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$1,39 \cdot 10^{-1}$	$4,90 \cdot 10^{-3}$			
$k'_{2 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$4,37 \cdot 10^{-1}$	$5,92 \cdot 10^{-2}$			
$k'_{3 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$2,38 \cdot 10^{-1}$	$2,80 \cdot 10^{-2}$	2869,95	1,40	67,4
$k'_{4 5h} \left(\frac{L}{\text{g}_X \text{ min}} \right)$	$2,32 \cdot 10^{-1}$	$4,32 \cdot 10^{-2}$			
$s_{4 5h} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$3,18 \cdot 10^{-2}$	$4,51 \cdot 10^{-4}$			
$k''_{4 5h} \left(\frac{L^2}{\text{nmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_X \text{ min}} \right)$	$3,77 \cdot 10^{-3}$	$1,02 \cdot 10^{-3}$			

4.3.1. Ajuste a los resultados experimentales de BDS sin emplear cosustratos

La Figura 4.17 representa la evolución de los datos experimentales de los compuestos de la ruta 4S y la predicción del modelo cinético para el experimento de desulfuración empleando células de 5 horas de edad. En ella se observa una buena predicción de la evolución de los datos experimentales. El error obtenido con la predicción del modelo es muy bajo, no superándose el 10 % en los datos más significativos, como puede observarse en la Figura 4.18, en la que se representan los datos experimentales frente a los generados por el modelo.

La evolución de los datos experimentales y los predichos por el modelo cinético para el experimento de desulfuración con células de 23 horas de edad se representa en la Figura 4.19, en la que se observa que la predicción del modelo también es muy buena respecto a los datos experimentales. Se observan pequeñas desviaciones a bajas concentraciones y para el compuesto HBPS en la zona intermedia del proceso, así como desviaciones menores del 10 % para concentraciones altas de HBP tal y como se muestra en la Figura 4.20.

Simulación del comportamiento de mezclas de distinta edad celular

De la misma manera que en apartados anteriores (3.2 y 3.3.2), la simulación del comportamiento de mezclas de células de distinta edad se ha realizado considerando que la mezcla celular se comporta de manera aditiva respecto de las células que la compone. Las ecuaciones empleadas para la simulación del proceso de desulfuración empleando mezclas de células en *batch* y en *fed-batch* al realizar el proceso en ausencia de cosustratos son las mismas utilizadas en el capítulo anterior (ecuaciones [3.56] a [3.60]), empleando los parámetros cinéticos mostrados en las Tablas 4.32 y 4.33.

En la Figura 4.21 se representa la evolución de los datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S y los correspondientes valores obtenidos al simular la desulfuración empleando la mezcla óptima operando en *batch*. En la mencionada Figura 4.21 se observa que la predicción del modelo es muy buena, únicamente a bajas concentraciones se obtienen desviaciones significativas. En la Figura 4.22 se representan los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los simulados con el modelo cinético, y en ella se observa que los mayores errores en la predicción del modelo se dan en los datos experimentales correspondientes a bajas concentraciones ($< 5 \mu\text{M}$).

En la Figura 4.23 se representa la evolución de los datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S y los simulados por el modelo empleando como biocatalizador la mezcla celular óptima operando en *fed-batch*. Se observa que el modelo es capaz de simular satisfactoriamente los datos experimentales obtenidos en el proceso. Únicamente se aprecian ligeras desviaciones en la concentración de DBTO y DBTO₂ en el cuarto *batch*.

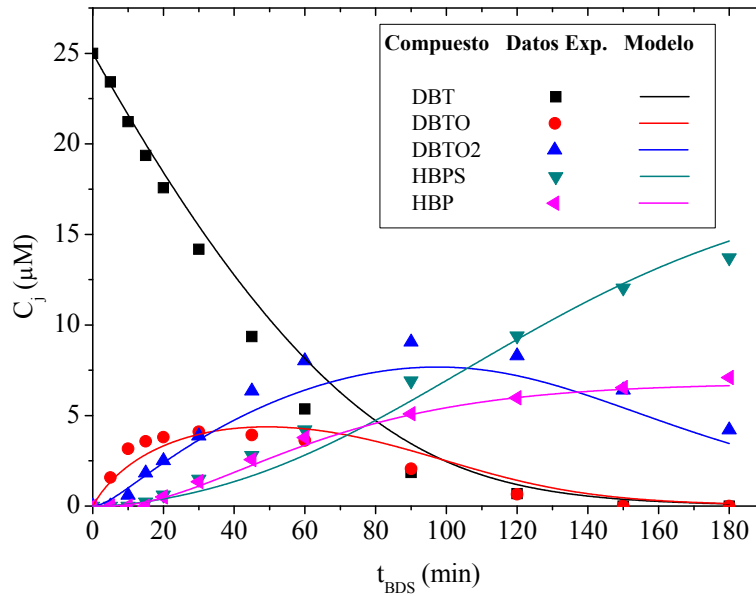


FIGURA 4.17. Evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los calculados por el modelo empleando células de 5h. BDS sin cosustratos.

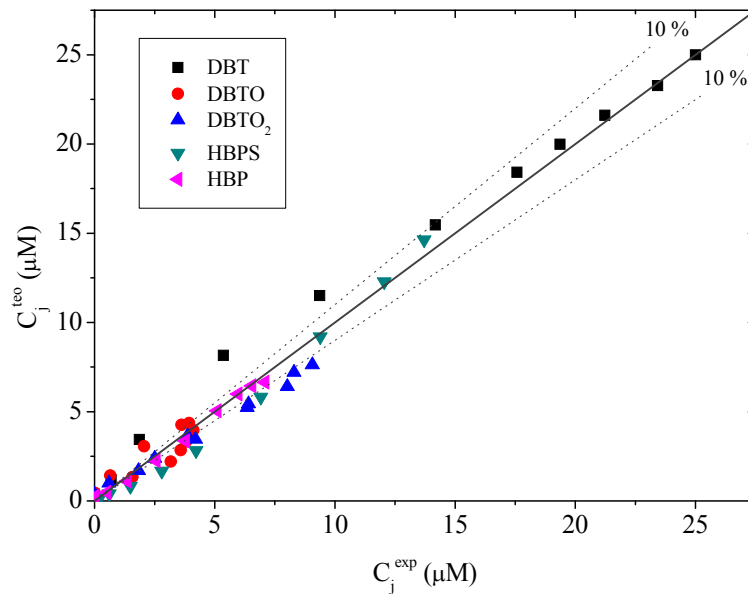


FIGURA 4.18. Valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 5h de edad. BDS sin cosustratos.

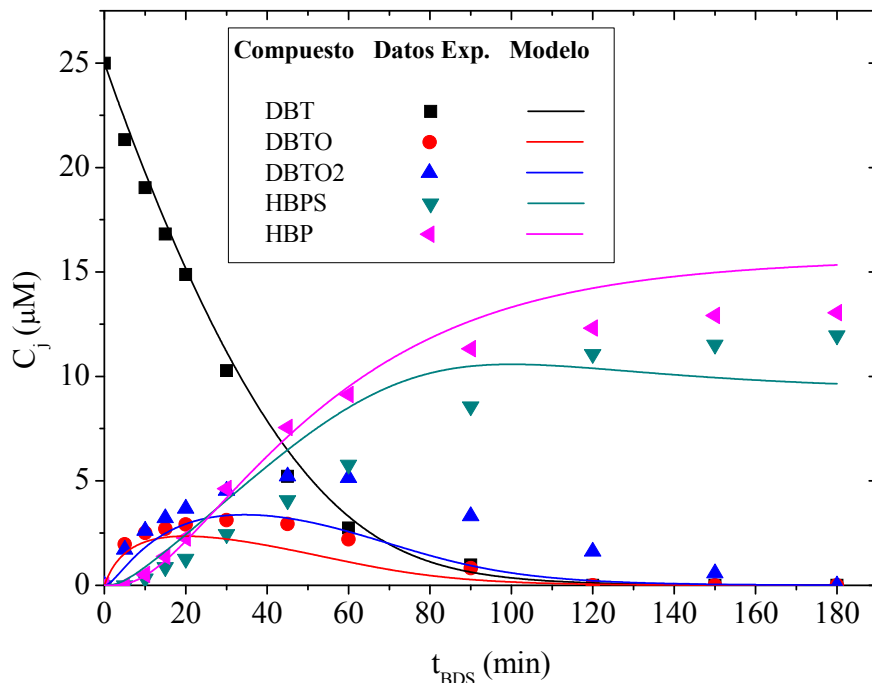


FIGURA 4.19. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los calculados por el modelo empleando células de 23h. BDS sin cosustratos.

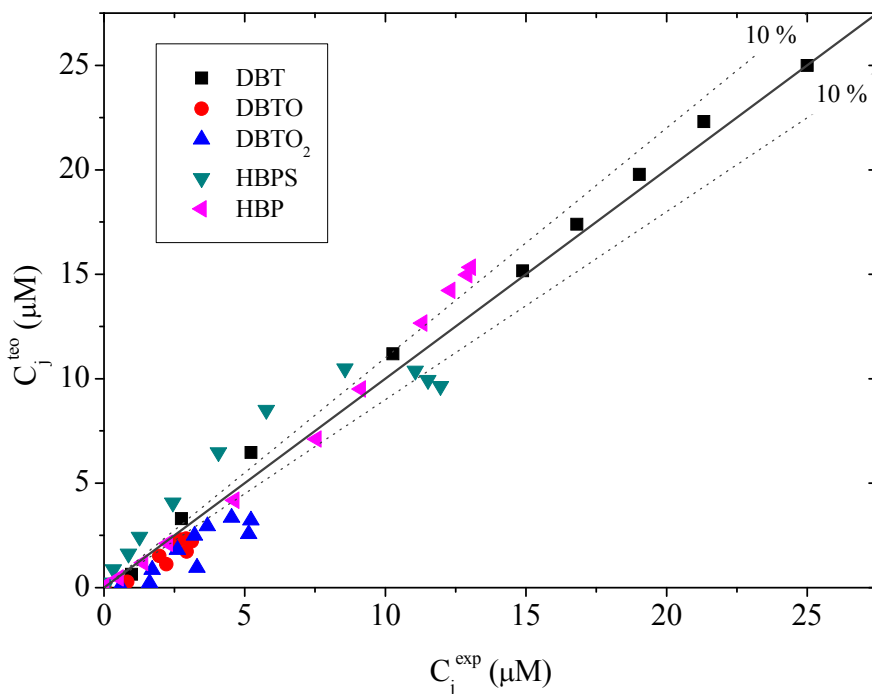


FIGURA 4.20. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 23h de edad. BDS sin cosustratos.

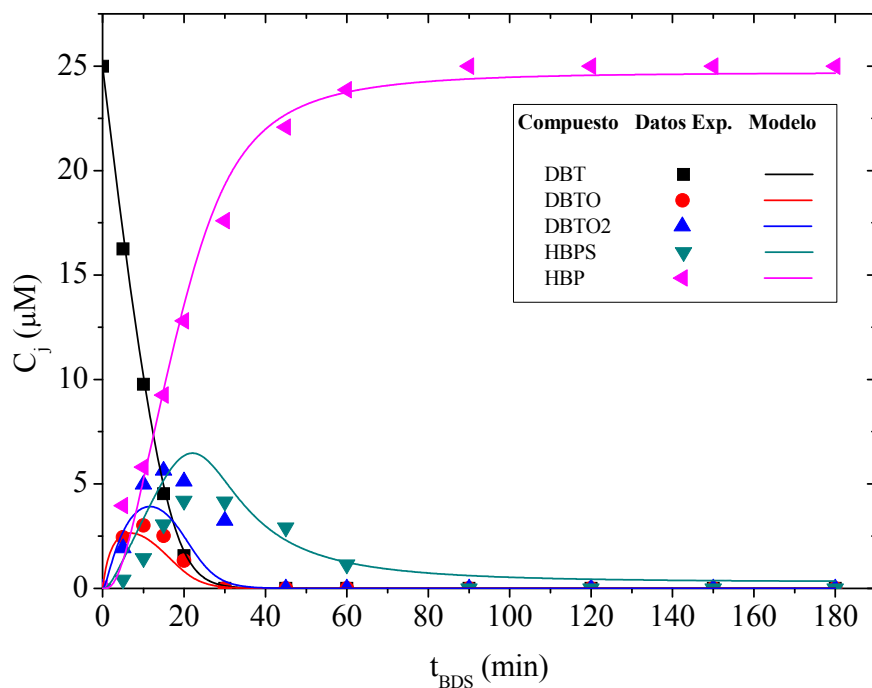


FIGURA 4.21. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23h. BDS sin cosustratos.

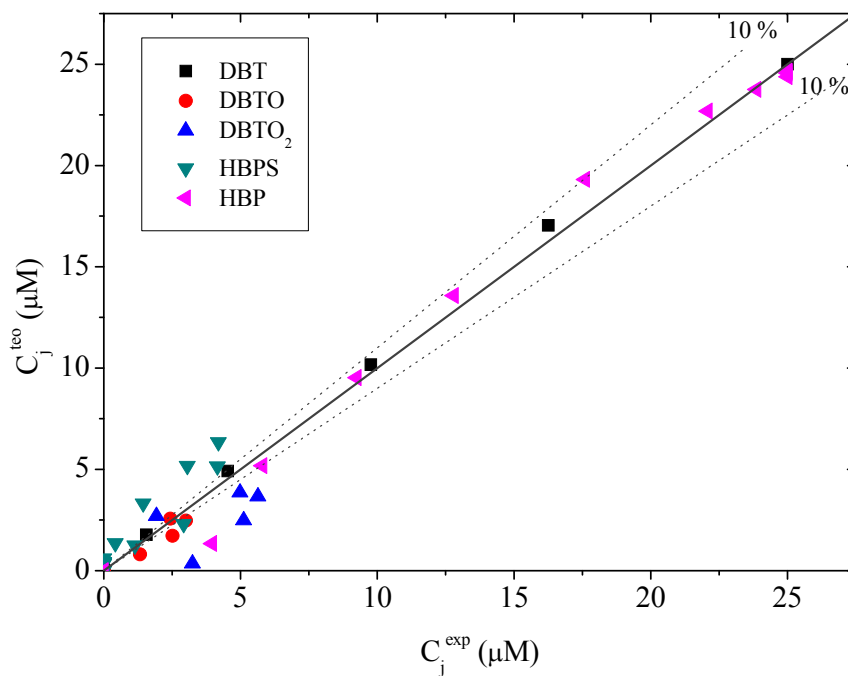


FIGURA 4.22. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23h. BDS sin cosustratos.

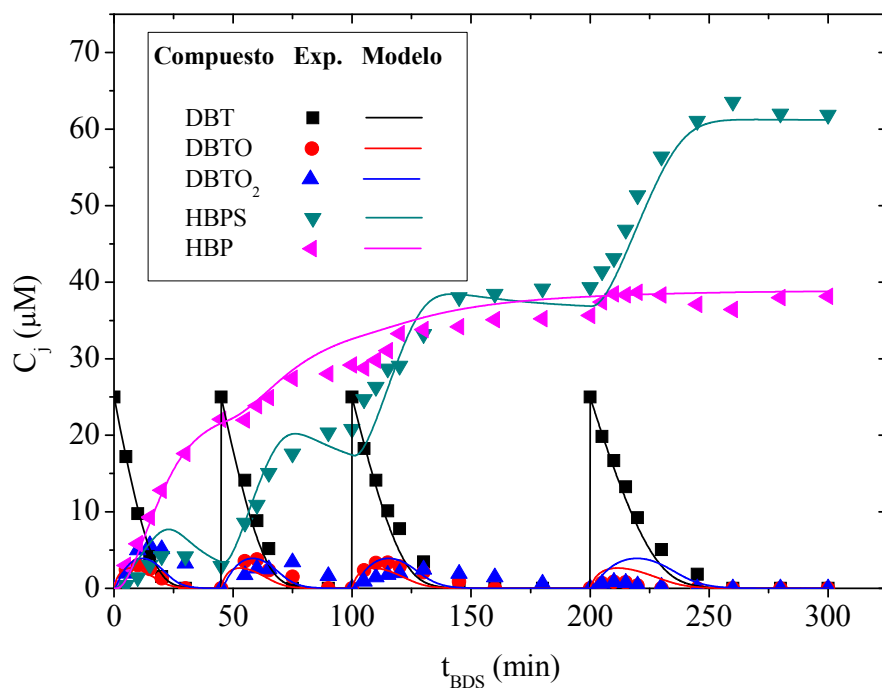


FIGURA 4.23. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23h operando en fed-batch. BDS sin cosustratos

4.3.2. Ajuste a los resultados experimentales de BDS empleando ácido acético como cosustrato

La Figura 4.24 representa la evolución de los datos experimentales de los compuestos de la ruta 4S y la predicción del modelo cinético para el experimento de desulfuración empleando células de 5 horas de edad. La predicción de la evolución de los datos experimentales es bastante buena. Los compuestos que presentan un mayor error son DBTO₂ y HBPS, mientras que la evolución del resto de compuestos tiene un error que, a concentraciones altas no supera el 10 %, tal y como se observa en la Figura 4.25.

La evolución de los datos experimentales y los predichos por el modelo cinético para el experimento de desulfuración con células de 23 horas de edad se representa en la Figura 4.26. En este caso, la predicción del modelo presenta mayores desviaciones respecto a los datos experimentales, fundamentalmente a bajas concentraciones. A concentraciones medias-altas, el error no supera el 10 % (Figura 4.26).

Simulación del comportamiento de mezclas de distinta edad celular

La simulación del comportamiento de mezclas celulares se ha realizado siguiendo el mismo procedimiento que en apartados anteriores (3.2, 3.3.2 y 4.3.1). En este caso, al usar ácido acético como cosustrato, las ecuaciones empleadas para la simulación del proceso en *batch* y en *fed-batch* se muestran a continuación. Los parámetros cinéticos son los mostrados en las Tablas 4.32 y 4.33.

En la Figura 4.28 se representa la evolución de los datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S y los correspondientes valores obtenidos al simular la desulfuración empleando la mezcla óptima operando en *batch*. En la mencionada Figura 4.28 se observa que la predicción del modelo es muy buena, únicamente a bajas concentraciones se obtienen desviaciones significativas. En la Figura 4.29 se representan los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los simulados con el modelo cinético, y en ella se observa que las desviaciones más importantes se encuentran en los compuestos DBTO y DBTO₂, cuyos valores experimentales corresponden a valores de concentración muy bajos.

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = - \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{23h} \quad [4.12]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{DBTO}}{dt} = & \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_1 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} \right]_{23h} \\ & - \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{23h} \end{aligned} \quad [4.13]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = & \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_2 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} \right]_{23h} \\ & - \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{5h} - \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{23h} \end{aligned} \quad [4.14]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{HBPS}}{dt} = & \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{5h} + \left[\frac{k'_3 \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} \right]_{23h} \\ & - \left[\frac{k''_4 \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{5h} - \left[\frac{k''_4 \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{23h} \end{aligned} \quad [4.15]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \left[\frac{k''_4 \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{5h} + \left[\frac{k''_4 \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{HBP} + K'_4 \cdot C_{HBPS}} \right]_{23h} \quad [4.16]$$

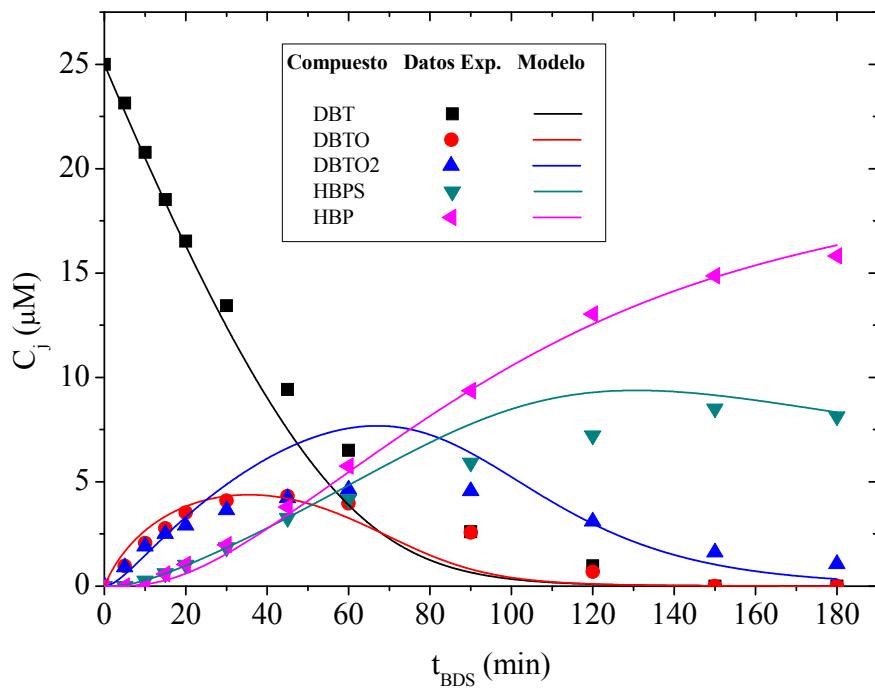


FIGURA 4.24. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los calculados por el modelo empleando células de 5h. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

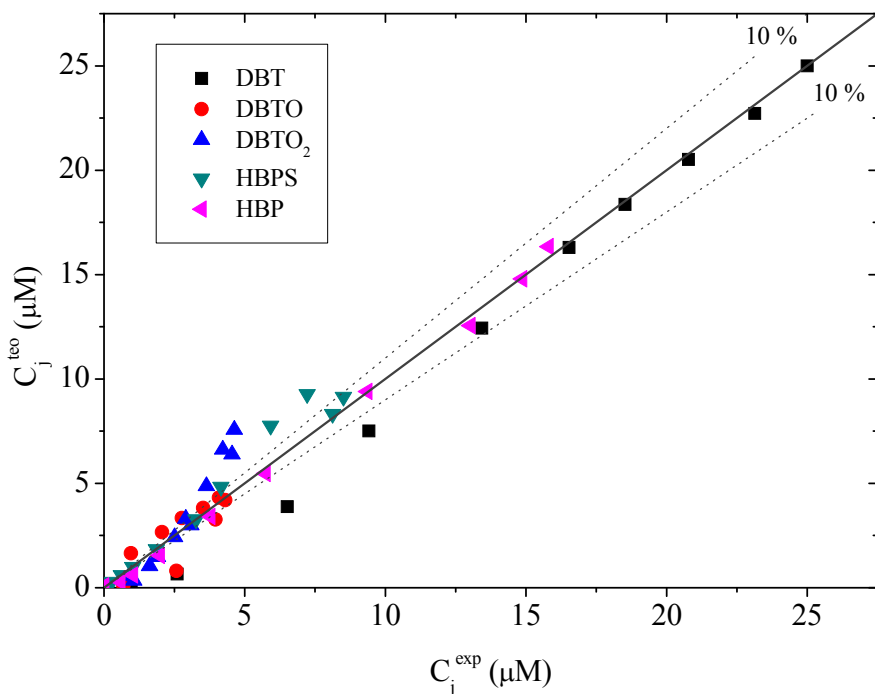


FIGURA 4.25. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 5h de edad. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

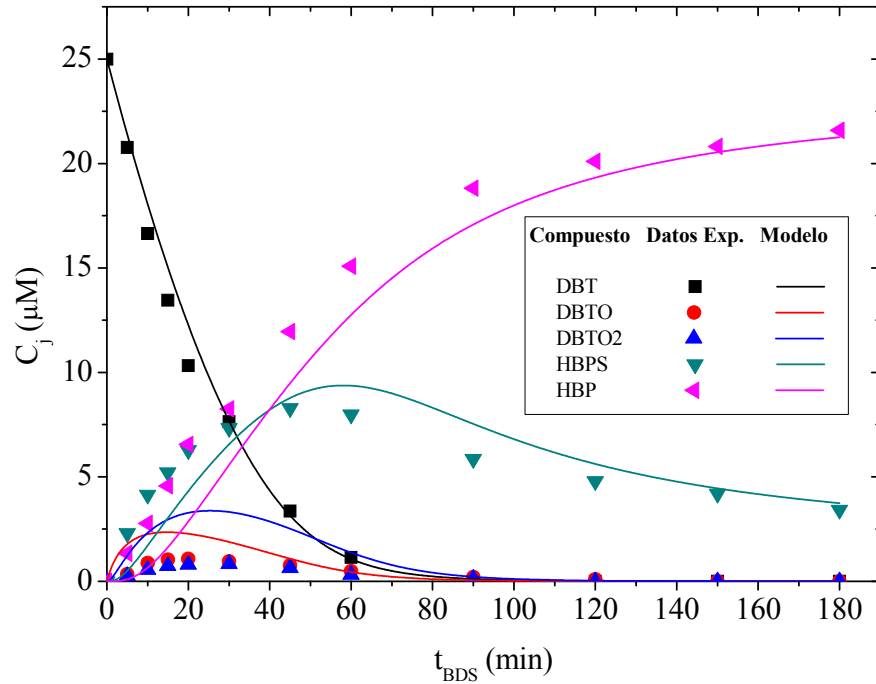


FIGURA 4.26. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los calculados por el modelo empleando células de 23h. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

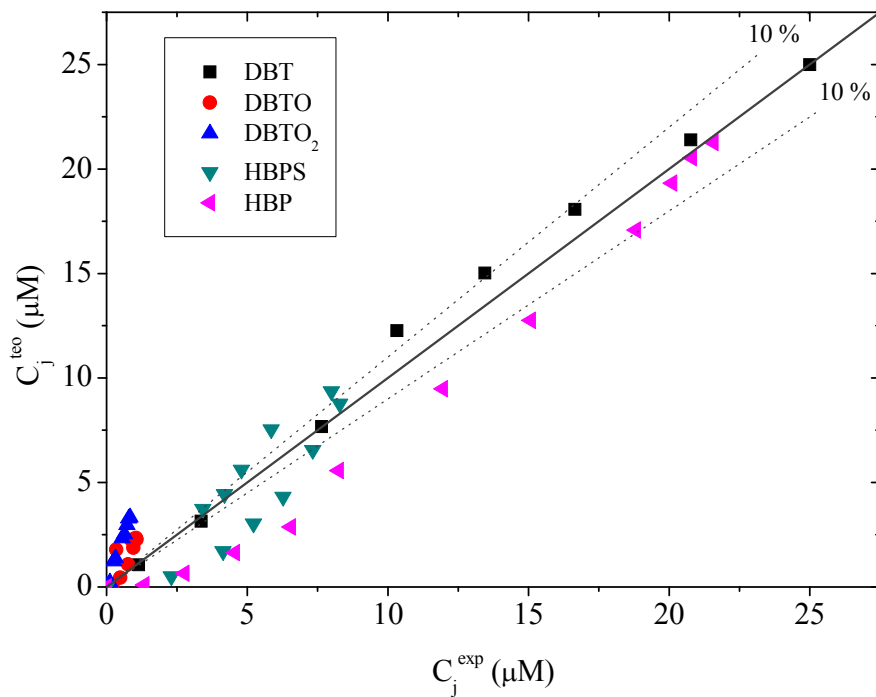


FIGURA 4.27. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para células de 23h de edad. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

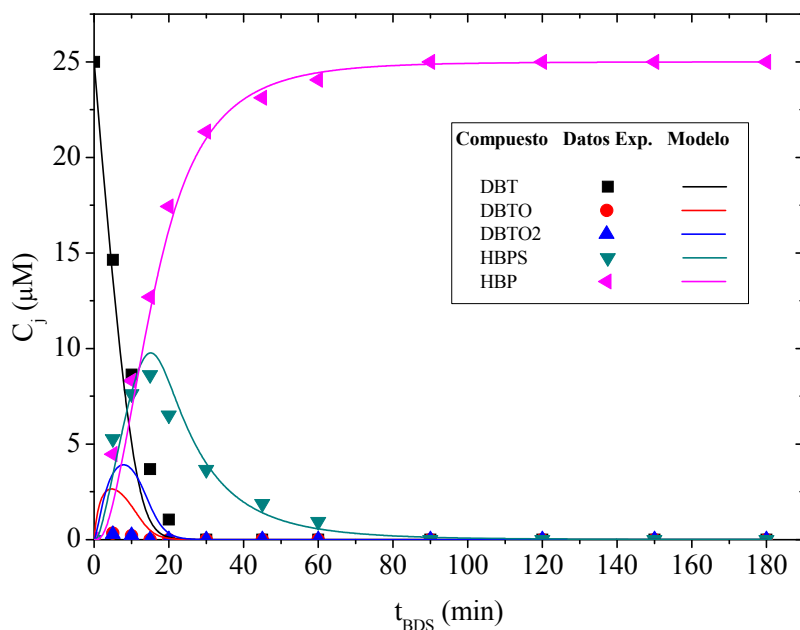


FIGURA 4.28. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23h. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

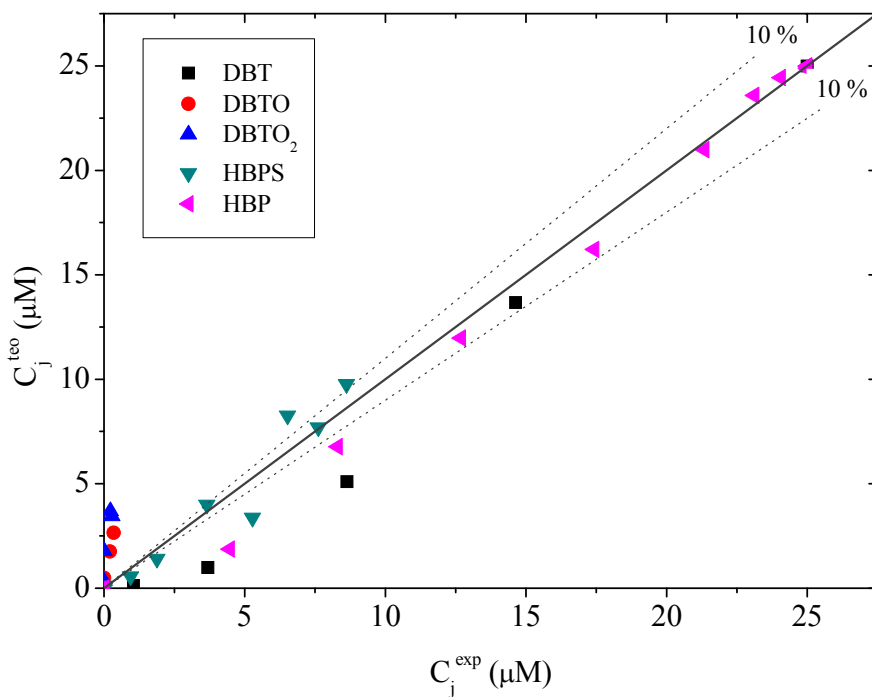


FIGURA 4.29. Representación de los valores experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S frente a los predichos por el modelo cinético para biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23h. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

En la Figura 4.30 se representa la evolución de los datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S y los simulados por el modelo empleando como biocatalizador la mezcla celular óptima operando en *fed-batch*. Se observa que el modelo es capaz de simular satisfactoriamente los datos experimentales obtenidos en el proceso. Las únicas desviaciones significativas corresponden a los compuestos intermedios DBTO y DBTO₂, que tienen unas concentraciones muy bajas, casi despreciables.

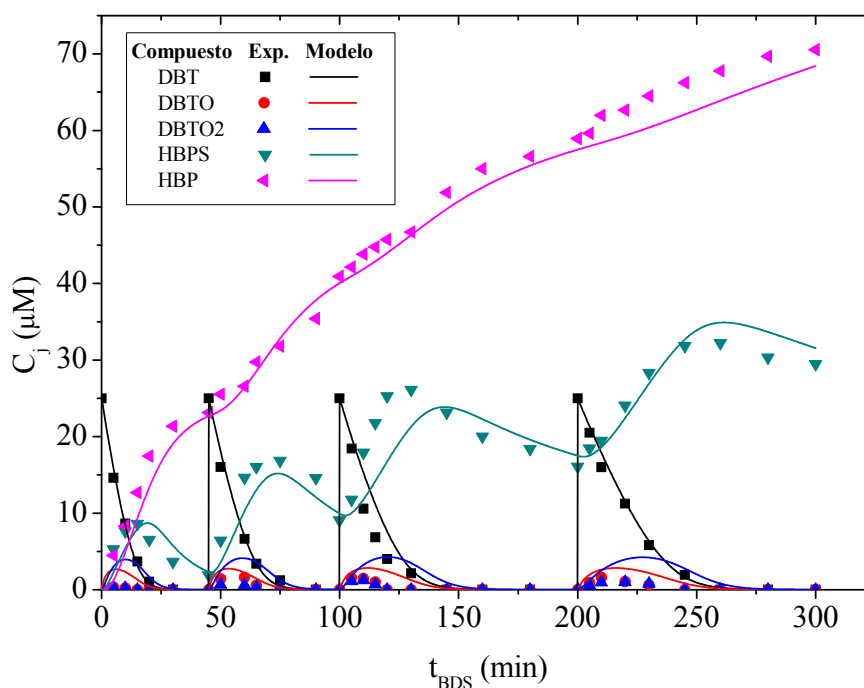


FIGURA 4.30. Comparación entre la evolución de los valores experimentales de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los simulados por el modelo empleando un biocatalizador compuesto por mezcla de células de 5 y 23h operando en *fed-batch*. BDS empleando ácido acético como cosustrato.

4.4. BIBLIOGRAFÍA

Amin, G.A. (2011). Integrated two-stage process for biodesulfurization of model oil by vertical rotating immobilized cell reactor with the bacterium *Rhodococcus erythropolis*. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 2, 1-4.

- Aggarwal, S.; Karimi, I.A. y Lee, D.Y. (2011), Flux-based análisis of sulfur metabolismo in desulfurizing Straits of *Rhodococcus erythropolis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 315, 115-121.
- Cooper, G.M. (2004). *La célula*. Editorial Marbán, Madrid (España).
- Faber, K. (2004). *Biotransformations in organic chemistry*. Editorial Springer, Berlin (Alemania)
- Sanchez, C.; Neves, A.R.; Cavalheiro, J.; dos Santos, M.M.; Garcia-Quintans, N. y Lopez, P. (2008). Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1136-1144.
- Wang, Z.; Chen, S.; Sun, M. y Yu, Z. (2007). A fundamental dual regulatory role of citrate on the biosyntheses of thuringiensin and poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus thuringiensis* YBT-032. *Biotechnol. Lett.* 29, 779-784.
- Wichmann, R. y Vasic-Racki, D. (2003). Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 92, 225-260.
- Zhao, H. y van der Donk, W.A. (2003). Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 583-589.
- Zhou, J.; Liu, L.; Zhongping, S. Guocheng, D. y Chen, J. (2009). ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 27, 94-101.

5. BIODESULFURACIÓN EN BIORREACTOR

CAPÍTULO 5.- BIODESULFURACIÓN EN **BIORREACTOR**

Indice

5.1.	<i>ESTUDIOS PRELIMINARES.....</i>	224
5.1.1.	<i>BDS en biorreactor: experimento preliminar.....</i>	224
5.1.2.	<i>Adición del surfactante Tween 80.....</i>	226
5.2.	<i>ESTUDIO de las CONDICIONES HIDRODINÁMICAS</i>	231
5.2.1.	<i>Resultados experimentales</i>	232
5.2.2.	<i>Discusión de los resultados.....</i>	238
5.3.	<i>ESTUDIO del CONSUMO de OXÍGENO.....</i>	241
5.3.1.	<i>Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia.....</i>	244
5.3.2.	<i>Resultados experimentales</i>	250
5.3.3.	<i>Discusión de los resultados.....</i>	254
5.3.4.	<i>Justificación de las condiciones fluidodinámicas en biorreactor.....</i>	261
5.4.	<i>ESTUDIO MORFOLÓGICO del CULTIVO</i>	263
5.4.1.	<i>Estudio de la formación de agregados.....</i>	264
5.4.2.	<i>Estudio microscópico del cultivo</i>	266
5.5.	<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	272

CAPÍTULO 5

BIODESULFURACIÓN EN BIORREACTOR

Los procesos químicos o bioquímicos industriales se basan en datos experimentales obtenidos a nivel de laboratorio y, posteriormente, a nivel de planta piloto. La obtención de estos datos experimentales es especialmente importante en el caso de reacciones bioquímicas, ya que se trata, por lo general, de procesos muy complejos.

El primer paso para realizar el cambio de escala de un bioproceso a nivel industrial consiste en llevar a cabo el proceso en biorreactor. Esta etapa es fundamental, puesto que es aquí donde se modifican de manera más notable tanto la geometría del reactor como los sistemas empleados para su control: de una agitación orbital se pasa a una agitación normalmente mecánica; de una termostatación ambiental al empleo de camisas calefactoras; de una aireación impulsada superficialmente a distintos sistemas de dispersión, etc. El biorreactor empleado a escala de laboratorio es el modelo a partir del cual se aplicarán las distintas metodologías de cambio de escala con el objetivo de llegar al nivel industrial.

El proceso de biodesulfuración se ha estudiado de una manera muy detallada a nivel de laboratorio, fundamentalmente empleando matraces y tubos de ensayo. Existen varios estudios realizados en distintos tipos de biorreactores (Kobayashi y col., 2001; Schilling y col., 2002; Yang y col., 2007; Lin y col., 2012), pero aún no se ha realizado un análisis completo de los factores que afectan al proceso a esta escala.

En este capítulo se realiza un estudio del proceso de desulfuración empleando un biorreactor comercial de 1 L de volumen de trabajo, detallado en el apartado 2.1.5. En primer lugar, se presentan los experimentos previos relativos a mejorar la disponibilidad de DBT en el medio empleando para ello un surfactante. A continuación, se estudia el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la capacidad desulfurante, obteniendo las condiciones de operación óptimas para realizar el proceso. Finalmente, los

resultados obtenidos servirán para realizar un estudio sobre el transporte y consumo de oxígeno, y cómo ambos fenómenos se ven afectados por las condiciones del proceso.

5.1. ESTUDIOS PRELIMINARES

En este apartado se describen los experimentos preliminares llevados a cabo para desarrollar el proceso de desulfuración en biorreactor. Estos experimentos se basan en realizar el proceso de desulfuración en las mismas condiciones en las que se lleva a cabo el crecimiento del microorganismo, descrito en el apartado 2.2.1, para determinar los aspectos que es necesario estudiar con mayor detenimiento.

5.1.1. BDS en biorreactor: experimento preliminar

En primer lugar, se realizó un experimento de biodesulfuración en biorreactor para ser comparado con los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*.

El experimento se ha llevado a cabo empleando como biocatalizador la mezcla celular óptima determinada previamente (Calzada y col., 2011) en una concentración de 2,1 g/L. La obtención de las células se ha realizado siguiendo el protocolo estandarizado descrito en el apartado 2.2.1 de la presente Memoria. El procedimiento empleado para la desulfuración en biorreactor se describe en el apartado 2.2.2. La reacción se desarrolla en un medio tamponado (HEPES a pH 8,0) al que, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo 4 de la presente Memoria, se le añaden 15 g/L de ácido acético. El sustrato azufrado empleado ha sido DBT, con una concentración inicial de 25 μM . Las condiciones de operación han sido las mismas que las empleadas en la obtención del biocatalizador (apartado 2.2.1): temperatura de 30 °C, caudal de aire 1 L/L·min, y una agitación de 200 rpm. Durante el proceso se han tomado muestras para determinar el poder desulfurante, tal y como se detalla en el apartado 2.3.2, y se han monitorizado los siguientes parámetros: temperatura, velocidad de agitación, caudal de aire, concentración de oxígeno disuelto y pH. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5.1, y la comparación con los resultados correspondientes al experimento equivalente en matraz *Erlenmeyer* (experimento AC-03, capítulo 4) se muestra en la Figura 5.1.

En la Figura 5.1 se observa que las velocidades de desaparición de DBT y de producción de HBP en el experimento realizado en biorreactor son mucho más bajas que las obtenidas en el experimento realizado en matraz *Erlenmeyer*. Aunque la concentración inicial de DBT añadida sea de 25 μM , al realizar el experimento en biorreactor, la concentración inicial analizada es de 7,35 μM , un valor muy por debajo del añadido. La concentración de HBP obtenido en biorreactor también corresponde a valores muy bajos (5,06 μM) respecto los obtenidos en matraz (25 μM). Respecto a los compuestos intermedios de la ruta 4S (DBTO, DBTO₂ y HBPS), estos no aparecen en los cromatogramas obtenidos por HPLC, por lo que o bien se acumulan dentro de la célula, o bien se transforman tan rápidamente que no son detectados con la metodología de análisis empleada.

La solubilidad de DBT en medio acuoso es del orden de 5 μM , valor que puede aumentar debido a los surfactantes producidos por las propias células (Maghsoudi y col., 2001). En el experimento realizado en matraz *Erlenmeyer* se observa un gran número de estructuras agregadas en el medio que no son visibles al realizar la biodesulfuración en biorreactor. La formación de dichas estructuras puede hacer que la biodisponibilidad de DBT aumente, explicando así las diferencias observadas en ambos experimentos. El estudio de dichos agregados se realiza más adelante.

TABLA 5.1. Evolución de la concentración de los compuestos DBT y HBP. Proceso de BDS en resting cells realizado en biorreactor

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	7,35	0,00
5	2,44	1,27
10	1,84	1,87
20	1,13	2,58
30	0,85	2,86
45	0,43	3,27
60	0,00	3,71
90	0,00	4,12
150	0,00	4,89
180	0,00	5,06

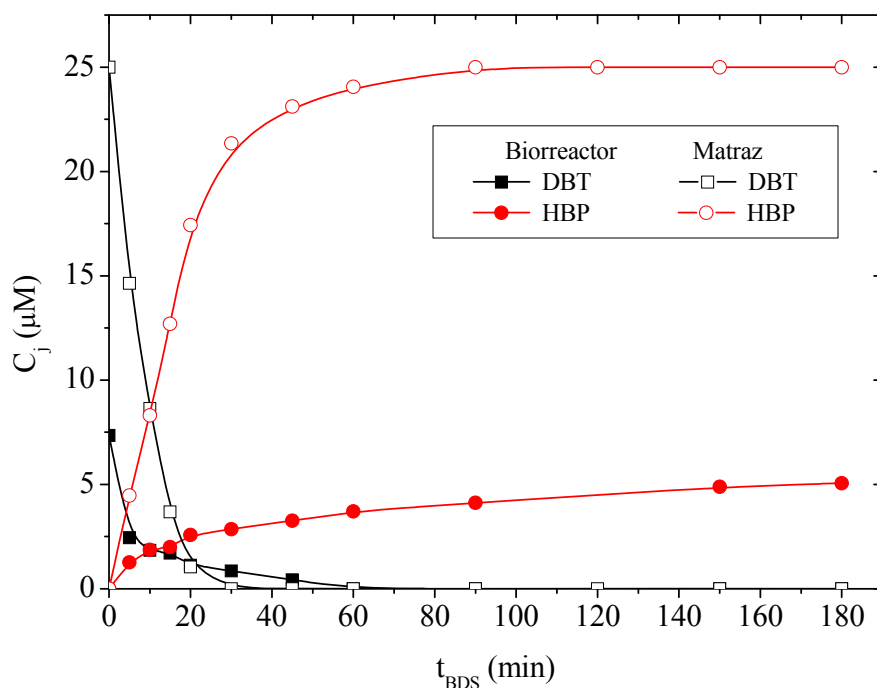


FIGURA 5.1. Comparación en la evolución de la concentración de DBT y HBP en experimentos realizados en matraz Erlenmeyer y en biorreactor

5.1.2. Adición del surfactante Tween 80

Debido a los resultados previamente obtenidos, en este apartado se propone aumentar la disponibilidad de DBT mediante la adición de un surfactante al medio, debido a su capacidad para aumentar la solubilidad de sustancias hidrofóbicas en medios acuosos (Feng y col., 2006).

En biodesulfuración, uno de los surfactantes más empleados es Tween® 80 (Polisorbato 80). Aunque en la mayor parte de los trabajos se ha añadido para aumentar la disponibilidad de DBT en sistemas bifásicos (Hou y col., 2005; Wang y col., 2006; Boltes y col., 2013), también se ha demostrado su eficacia en sistemas acuosos, en los que la adición de Tween® 80 implica una mayor disponibilidad de DBT y una reducción de la concentración de HBP alrededor de las células, disminuyendo la inhibición por producto y aumentando la concentración de HBP en el medio sobrenadante (Feng y col., 2006). El Tween® 80 es un surfactante no iónico, se trata de un líquido viscoso, de color amarillo y soluble en agua. El grupo hidrofílico está compuesto por polioxietileno, y el grupo hidrofóbico es ácido oleico (Figura 5.2).

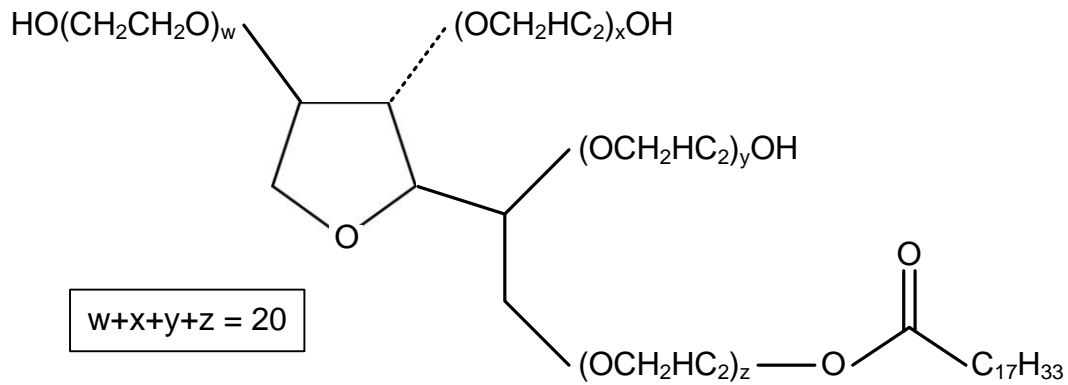


FIGURA 5.2. Estructura del surfactante Tween® 80

En este apartado se ha realizado un estudio para determinar el efecto de la adición de Tween® 80 sobre la capacidad desulfurante. Se han realizado experimentos en matraz *Erlenmeyer* empleando como biocatalizador la mezcla celular óptima. Los procedimientos empleados para la obtención del biocatalizador y para el desarrollo del proceso de desulfuración se detallan en los apartados 2.2.1 y 2.2.2, respectivamente. El sustrato azufrado empleado ha sido DBT en una concentración de 25 μM . Para determinar la concentración de los compuestos de la ruta 4S se han tomado muestras durante el proceso para su posterior análisis. La concentración de Tween® 80 varía entre 0 y 2 % en peso. La planificación experimental se detalla en la Tabla 5.2 y los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5.3.

TABLA 5.2. Planificación experimental. Estudio del efecto de la adición de Tween® 80 en la capacidad desulfurante

Experimento	Tween 80 (%)
TW-1	0
TW-2	0,5
TW-3	0,75
TW-4	1
TW-5	2

TABLA 5.3. Resultados experimentales. Estudio del efecto de la adición de Tween® 80 en la capacidad desulfurante

t (min)	TW-1		TW-2		TW-3		TW-4		TW-5	
	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00
5	14,63	4,47	14,05	6,58	15,87	4,55	16,53	6,14	15,48	2,33
15	3,69	12,69	4,37	13,45	10,82	10,23	12,60	8,53	11,21	5,03
30	0,00	21,34	1,38	18,68	6,98	14,41	9,68	11,24	9,43	7,36
45	0,00	23,12	0,00	21,41	4,87	17,05	6,06	12,77	8,02	9,01
60	0,00	24,06	0,00	23,72	4,10	18,75	4,53	13,87	7,39	10,24
90	0,00	25,00	0,00	24,58	2,10	20,00	2,59	15,66	5,51	10,45
120	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	21,67	1,48	17,62	5,59	12,57
180	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	21,29	0,00	17,73	4,02	13,78

En las Figuras 5.3 y 5.4 se representa la evolución de la concentración de los compuestos DBT y HBP, respectivamente, correspondientes a los experimentos mostrados en la Tabla 5.2.

En la Figura 5.3 se observa que al añadir una concentración de 0,5 % de Tween® 80, la concentración de DBT evoluciona de una forma similar al caso en que no se emplea surfactante. Al aumentar la concentración del surfactante, la degradación de DBT se ralentiza.

En cuanto a la evolución de la concentración de HBP, su comportamiento es similar al observado para DBT, tal y como se muestra en la Figura 5.4. Al añadir Tween® 80 en una concentración de 0,5 %, el HBP se forma a la misma velocidad que al no añadir surfactante. Conforme aumenta la concentración de Tween® 80, disminuye la producción de HBP. La conversión completa a HBP únicamente se consigue en dos casos: sin la adición de surfactante y con la adición de 0,5 % de Tween® 80.

A la vista de estos resultados se puede afirmar que la adición del surfactante Tween® 80 en una concentración de 0,5 % no afecta al desarrollo del proceso de biodesulfuración realizado en matraz *Erlenmeyer*.

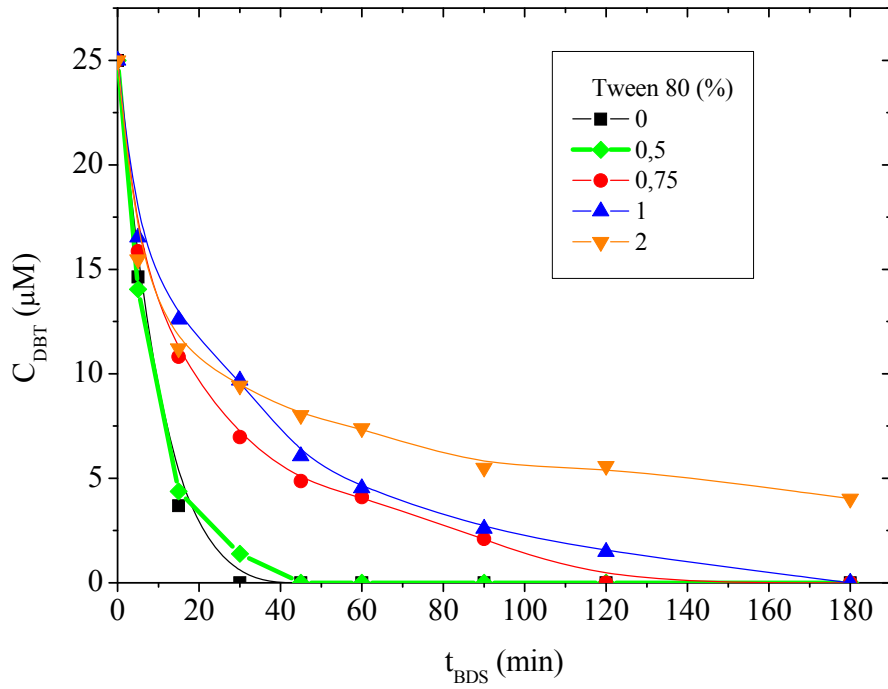


FIGURA 5.3. Estudio del efecto de la adición de Tween® 80 en la capacidad desulfurante.
Evolución de la concentración de DBT

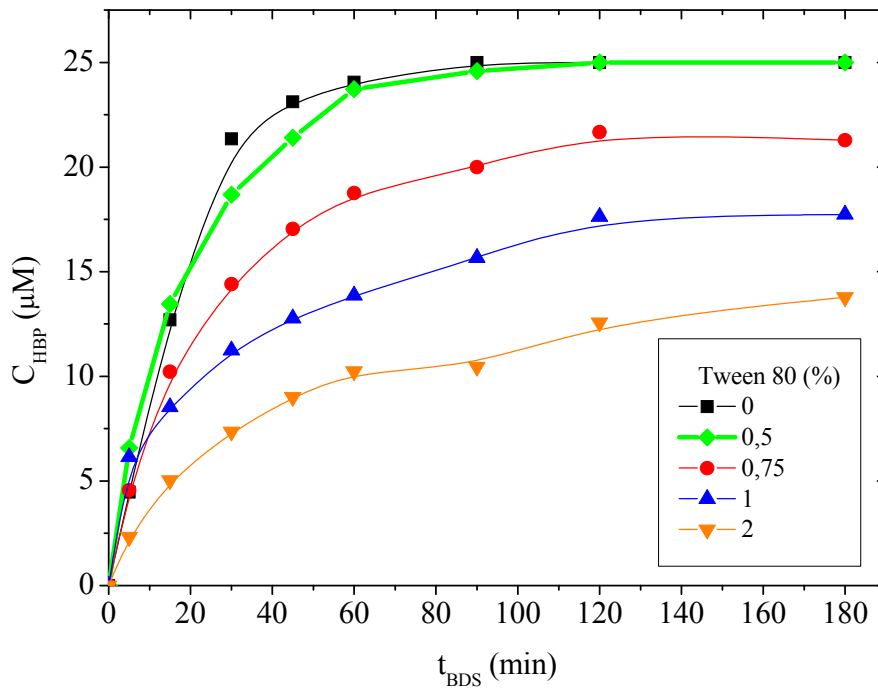


FIGURA 5.4. Estudio del efecto de la adición de Tween® 80 en la capacidad desulfurante.
Evolución de la concentración de HBP

Para comprobar que la cantidad de surfactante determinada (0,5 %) produce el efecto deseado cuando el proceso se desarrolla en biorreactor, se repitió el experimento realizado en el apartado 5.1.1 añadiendo al medio 0,5 % de Tween® 80. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5.4, y la comparación con los resultados correspondientes al experimento equivalente en matraz *Erlenmeyer* (experimento AC-03, capítulo 4) se muestra en la Figura 5.5.

En dicha figura se observa que todo el DBT añadido (25 μM) se encuentra disuelto en la fase acuosa, es decir, disponible para ser desulfurado por las células. Tanto la desaparición de DBT como la formación de HBP se desarrollan más lentamente al llevar a cabo el proceso en biorreactor que al realizarlo en matraz *Erlenmeyer*. No obstante, se puede concluir que la adición de dicho surfactante produce el efecto deseado de aumentar la disponibilidad de DBT al realizar el proceso de desulfuración en biorreactor.

Es significativo destacar nuevamente la ausencia de compuestos intermedios de la ruta 4S (DBTO, DBTO₂ y HBPS) en el medio. Sin embargo, en este caso, el balance estequiométrico es correcto ($C_{\text{DBT}} + C_{\text{HBP}} \approx 25 \mu\text{M}$) por lo que, en el caso de existir compuestos intermedios, estos no se encuentran en cantidades significativas.

Durante este experimento se mantuvieron constantes la temperatura (30 °C), la velocidad de agitación (200 rpm), el caudal de aire (1 L/L·min) y el pH (8,0), este último mediante la utilización de un medio tamponado (HEPESx2)

TABLA 5.4. Evolución de la concentración de los compuestos DBT y HBP. BDS en biorreactor añadiendo 0,5 % del surfactante Tween® 80

t (min)	C_{DBT} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00
15	19,00	5,56
30	15,37	9,95
60	9,44	14,95
90	7,12	18,72
120	5,42	19,58
150	3,68	20,44
180	3,22	21,15

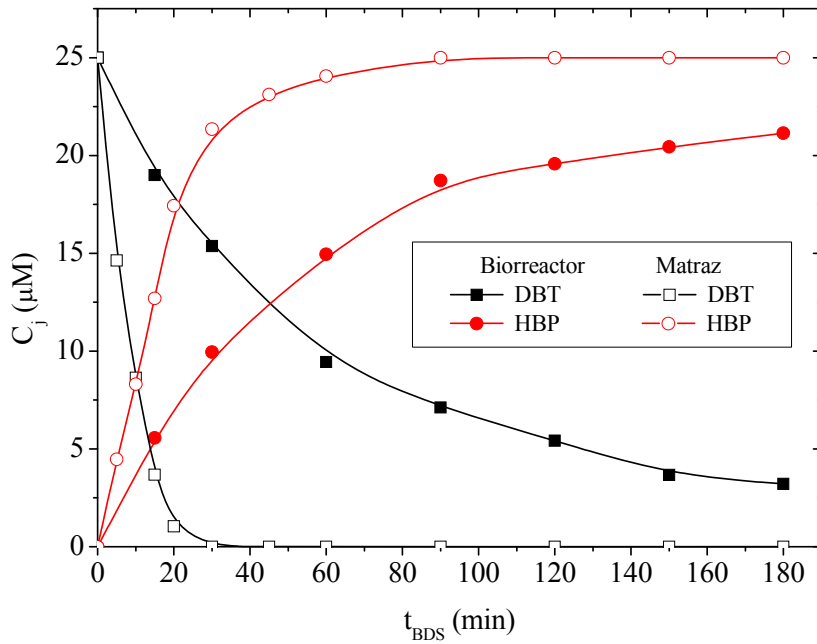


FIGURA 5.5. Comparación en la evolución de la concentración de DBT y HBP en experimentos realizados en matraz Erlenmeyer y en biorreactor

5.2. ESTUDIO de las CONDICIONES HIDRODINÁMICAS

En los procesos en que se utilizan microorganismos aerobios, la disponibilidad de oxígeno es un factor determinante. El microorganismo empleado en este trabajo, *Pseudomonas putida* KTH2, es una bacteria aerobia estricta que requiere oxígeno para crecer, mantenerse y realizar la ruta 4S de biodesulfuración (aunque parece que puede vivir en anaerobiosis). En condiciones de *resting cells* el microorganismo ve impedido su crecimiento por la supresión de los nutrientes esenciales para ello. Sin embargo, tanto el mantenimiento celular como la ruta 4S requieren oxígeno. Todas las reacciones bioquímicas en las que esté implicado el oxígeno se van a ver directamente afectadas por su disponibilidad en el medio. Los factores que más afectan a la disponibilidad de oxígeno en un biorreactor son las condiciones fluidodinámicas, establecidas por la aireación y la agitación, y la escala de operación, que afecta a las condiciones hidrodinámicas.

En este apartado se estudia la influencia de las condiciones hidrodinámicas, determinadas por la velocidad de agitación, el caudal de aireación y la composición del gas de aireación, en el proceso de desulfuración en biorreactor.

5.2.1. Resultados experimentales

Estudio de la velocidad de agitación

En primer lugar, se realizaron una serie de experimentos para determinar el poder desulfurante a diversas velocidades de agitación. Para ello, se llevaron a cabo cinco experimentos de biodesulfuración en *resting cells* en biorreactor con las siguientes condiciones de operación: biocatalizador formado por la mezcla celular óptima; temperatura de 30 °C; aireación de 1 L/min; medio HEPESx2. Las velocidades de agitación utilizadas se muestran en la Tabla 5.5 y los resultados experimentales, expresados como la evolución de las concentraciones de DBT y HBP se muestran en la Tabla 5.6 y se representan en las Figura 5.6 y 5.7, comparándose con los resultados obtenidos en los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*.

TABLA 5.5. Planificación experimental. Estudio de la influencia de la velocidad de agitación en la capacidad desulfurante

Experimento	N (rpm)	Q (L/L·min)	Gas
200-N	200	1	Aire
300-N	300	1	Aire
400-N	400	1	Aire
450-N	450	1	Aire
500-N	500	1	Aire

TABLA 5.6. Resultados experimentales. Estudio de la influencia de la velocidad de agitación en la capacidad desulfurante

t (min)	200-N		300-N		400-N		450-N		500-N	
	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0	25,00	0,00
15	18,00	5,47	19,39	5,56	17,45	6,44	15,34	7,12	18,64	4,96
30	15,37	10,55	14,39	9,95	12,51	10,00	12,01	11,88	13,87	10,86
45	11,13	12,87	10,35	14,88	9,11	15,21	-	-	-	-
60	9,44	15,45	9,21	15,78	5,17	18,97	7,24	16,91	7,52	16,34
90	7,43	17,86	5,21	18,72	2,95	21,67	5,24	20,95	6,04	19,12
120	5,42	18,29	3,78	19,89	2,32	22,61	3,33	21,92	3,56	19,51
180	3,64	21,01	2,31	22,34	0,76	24,63	1,93	22,91	2,89	20,82

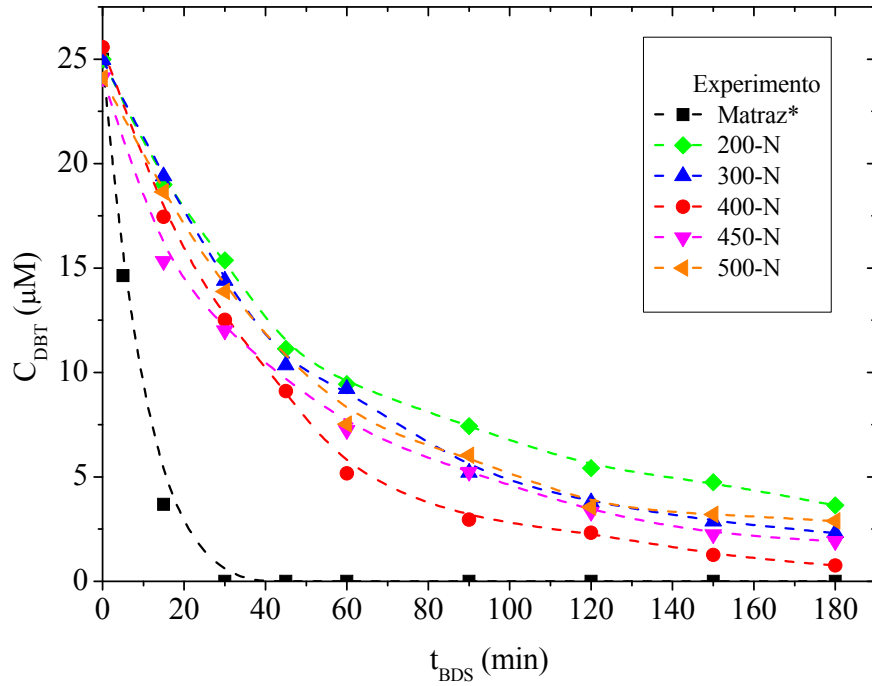


FIGURA 5.6. Influencia de la velocidad de agitación en la evolución de DBT

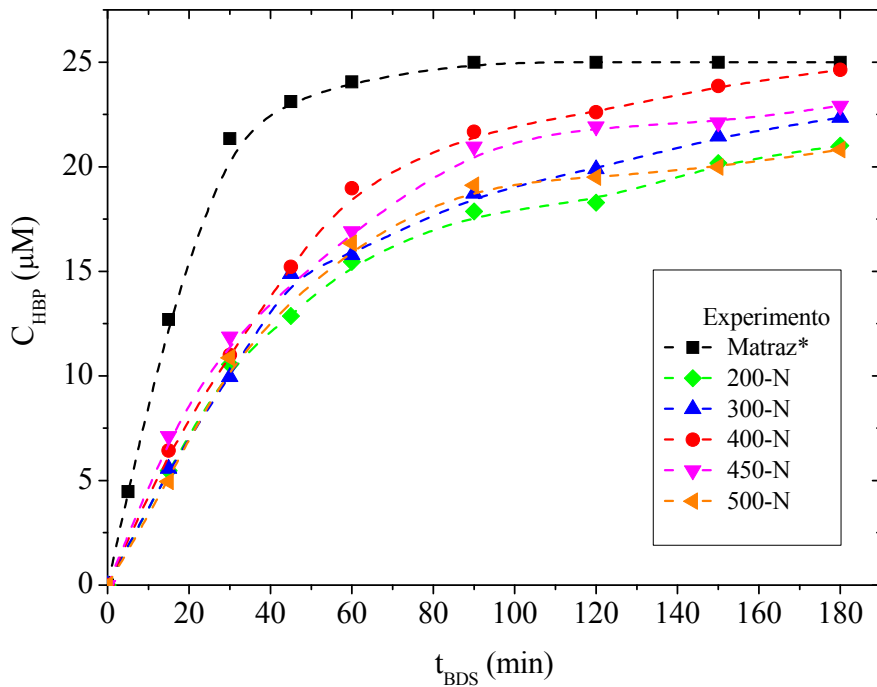


FIGURA 5.7. Influencia de la velocidad de agitación en la evolución de HBP

Estudio del caudal de aireación

A continuación, se estudió el efecto que tiene el caudal de aireación sobre la capacidad desulfurante del microorganismo. Se realizaron tres experimentos de biodesulfuración en biorreactor con las siguientes condiciones de operación: biocatalizador formado por la mezcla celular óptima; temperatura de 30°C; agitación de 400 rpm; medio HEPESx2. Los caudales de aireación empleados se muestran en la Tabla 5.7. Los resultados experimentales de evolución de la concentración de DBT y HBP aparecen en la Tabla 5.8 y se representan en las Figuras 5.8 y 5.9, comparándose con los resultados obtenidos en los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*.

TABLA 5.7. Planificación experimental. Estudio de la influencia del caudal de aireación en la capacidad desulfurante

Experimento	N (rpm)	Q (L/L·min)	Gas
400-N1	400	1	Aire
400-N2	400	2	Aire
400-N3	400	3	Aire

TABLA 5.8. Resultados experimentales. Estudio de la influencia del caudal de agitación en la capacidad desulfurante

t (min)	400-N1		400-N2		400-N3	
	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00
15	17,45	6,44	15,32	9,22	15,16	8,98
30	12,51	10,00	11,26	15,13	11,04	14,64
45	9,11	15,21	5,71	19,12	-	-
60	5,17	18,97	2,32	22,32	4,11	20,76
90	2,95	21,67	0,00	25,00	0,97	23,73
120	2,32	22,61	0,00	25,00	0,00	25,00
150	1,26	23,86	0,00	25,00	0,00	25,00
180	0,76	24,63	0,00	25,00	0,00	25,00

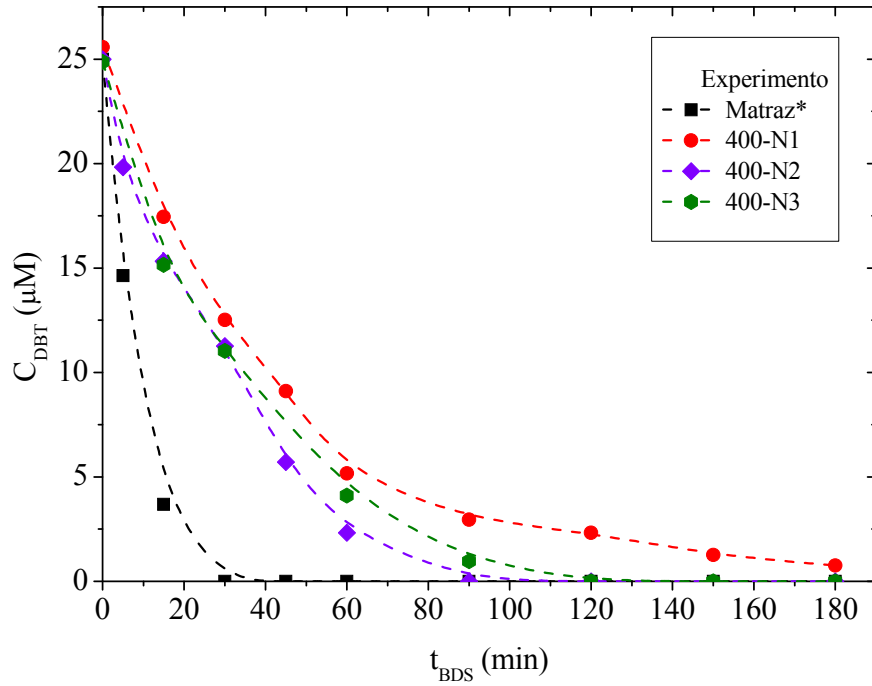


FIGURA 5.8. Influencia del caudal de aireación en la evolución de DBT

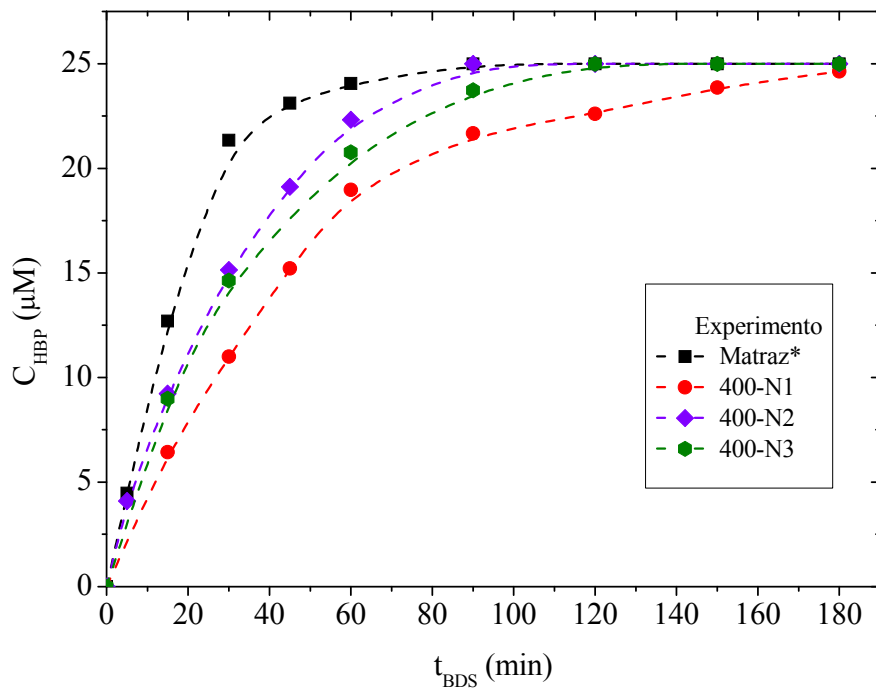


FIGURA 5.9. Influencia del caudal de aireación en la evolución de HBP

Estudio de la composición del gas de aireación

Para completar el estudio sobre la influencia del aporte de oxígeno sobre la capacidad desulfurante se estudió el efecto de la composición del gas de aireación. Para ello, se realizó un experimento de desulfuración en biorreactor con las siguientes condiciones de operación: biocatalizador formado por la mezcla celular óptima; temperatura de 30 °C; agitación de 400 rpm; caudal de aireación de 1 L/L·min; medio HEPESx2, fluido de aireación formado por oxígeno puro, como aparece en la Tabla 5.9. Los resultados experimentales, expresados en forma de evolución de la composición de DBT y HBP, se muestran en la Tabla 5.10 y se representan en las Figuras 5.10 y 5.11, comparándose con los resultados obtenidos en los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer* y con los obtenidos al realizar el proceso en biorreactor alimentando aire al medio en las mismas condiciones de operación.

TABLA 5.9. Planificación experimental. Estudio de la influencia del caudal de aireación en la capacidad desulfurante

Experimento	N (rpm)	Q (L/L·min)	Gas
400-O ₂	400	1	Oxígeno

TABLA 5.10. Resultados experimentales. Estudio de la influencia de la composición del gas de aireación en la capacidad desulfurante. Experimento alimentando oxígeno puro

t (min)	C _{DBT} (μM)	C _{HBP} (μM)
0	25,00	0,00
15	19,84	4,31
30	15,57	8,48
45	13,65	12,53
60	9,94	14,83
90	6,12	19,44
120	5,46	20,94
180	3,05	22,03

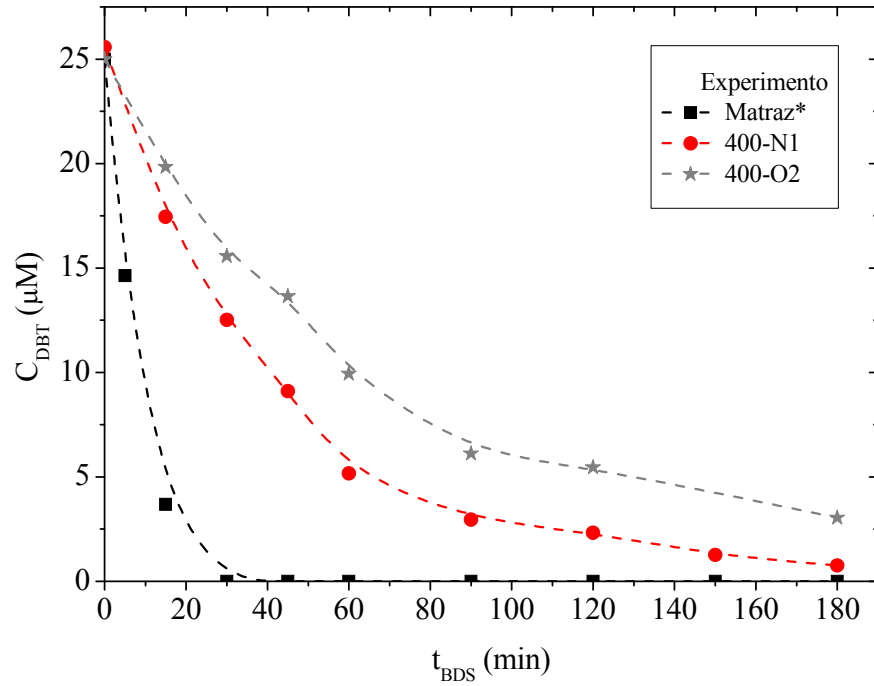


FIGURA 5.10. Influencia de la composición del gas de aireación en la evolución de DBT

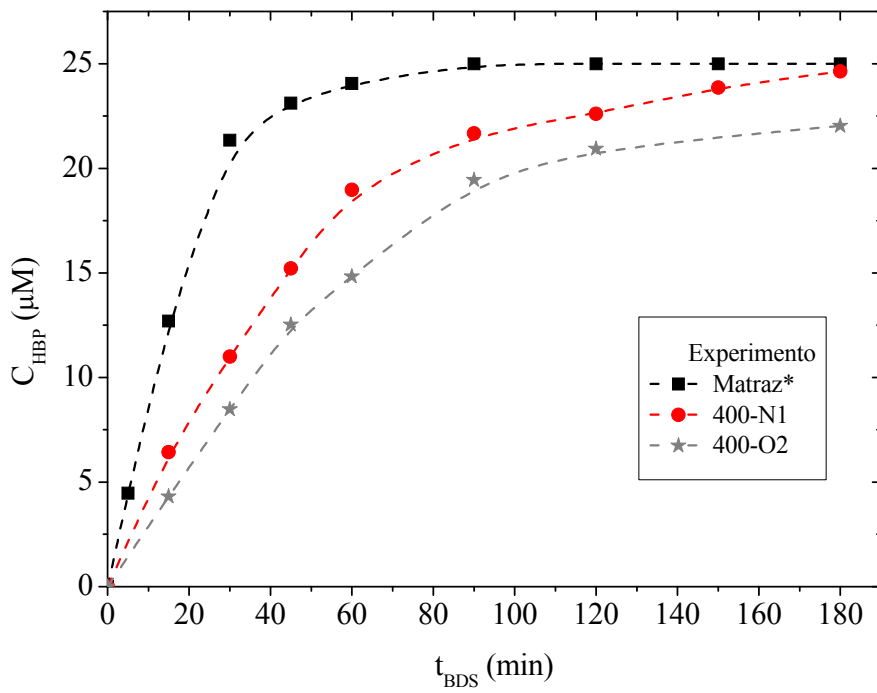


FIGURA 5.11. Influencia de la composición del gas de aireación en la evolución de HBP

5.2.2. Discusión de los resultados

Velocidad de agitación

En la Figura 5.6 se observa que la evolución de la concentración de DBT al realizar la biodesulfuración en biorreactor tiene un comportamiento muy diferente del observado en matraz *Erlenmeyer*. Mientras que en matraz se consume todo el DBT añadido en aproximadamente 30 minutos, en biorreactor, a los 180 minutos, aún queda algo disponible en todos los experimentos realizados. La evolución de la concentración de HBP, mostrada en la Figura 5.7, muestra un comportamiento similar. Mientras que en matraz *Erlenmeyer* se produce la conversión completa a HBP en aproximadamente 90 minutos, en biorreactor el único experimento que consigue acercarse a esta conversión es el realizado a una velocidad de agitación de 400 rpm a los 180 minutos. No obstante, debido a la ausencia de compuestos intermedios (DBTO, DBTO₂ y HBPS) al realizar la biodesulfuración en biorreactor, la diferencia en la evolución de HBP respecto al experimento en matraz es menos acusada que la diferencia observada en la evolución de DBT.

En la Figura 5.12 se representa el valor del parámetro empleado para la comparación de los experimentos realizados en este estudio en función de la velocidad de agitación. Dicho parámetro es el grado de desulfuración máximo (X_{BDS}^{max}), definido en la ecuación [3.2]. Como se observa en la mencionada figura, el grado de desulfuración máximo aumenta con la velocidad de agitación, alcanza un máximo a una agitación de 400 rpm, y disminuye posteriormente.

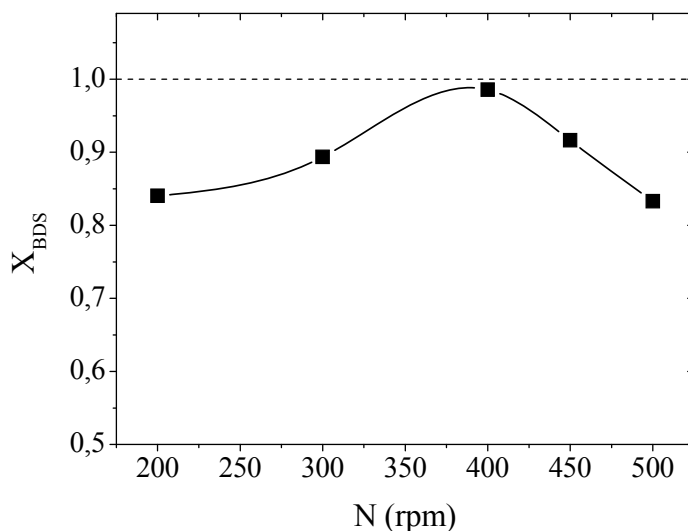


FIGURA 5.12. Valor de X_{BDS}^{max} obtenido a varias velocidades de agitación

Caudal de aireación

En el estudio anterior se estableció que la velocidad de agitación a la que la capacidad desulfurante es máxima es 400 rpm. Por este motivo, el estudio sobre la influencia del caudal de aireación se realizó a dicha velocidad de agitación (400 rpm).

Como puede observarse en las Figuras 5.8 y 5.9, al realizar la biodesulfuración en biorreactor a 400 rpm variando el caudal de aireación, no se llega a obtener los resultados observados en matraz. Nuevamente, la evolución en la concentración de HBP en biorreactor presente menos diferencias respecto al matraz que la evolución en la concentración de DBT. En el experimento 400-N2 se llega a la conversión completa a HBP en 90 minutos, esto es, al mismo tiempo que al realizar la biodesulfuración en matraz. Para la comparación entre los distintos experimentos se han empleado los siguientes parámetros: grado de desulfuración a los 90 minutos (X_{BDS}^{90}), y productividad máxima (P_{BDS}^{max}), definidos en las ecuaciones [3.2] y [3.4]. En la Figura 5.13 se representan los valores de ambos parámetros respecto al caudal de aireación. Puede observarse que, para ambos parámetros, se obtiene un valor máximo al emplear un caudal de aireación de 2 L/L·min.

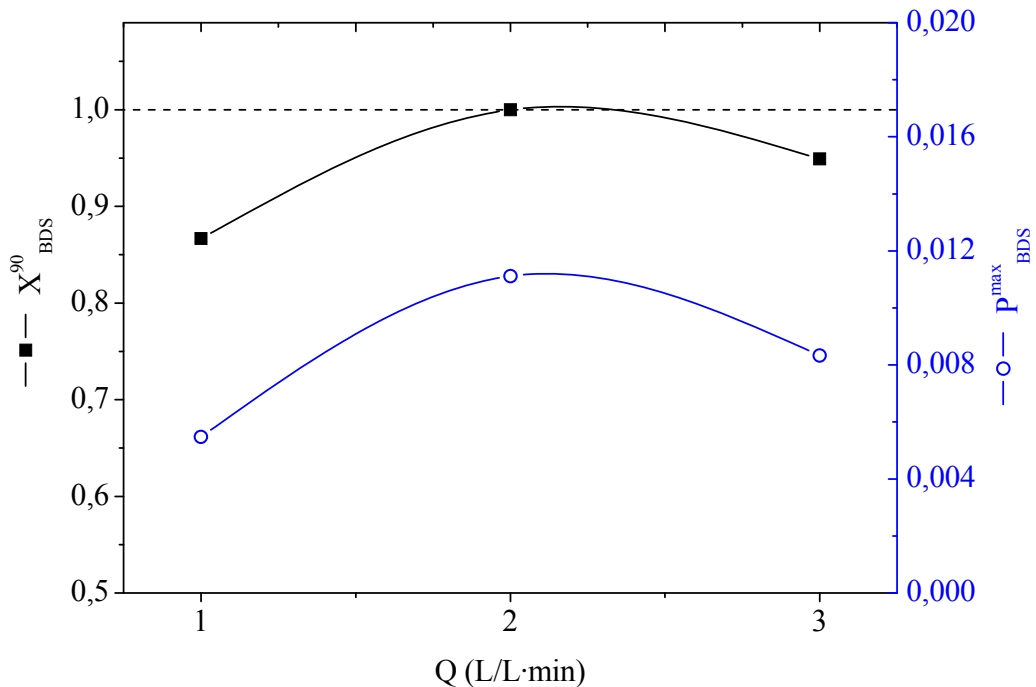


FIGURA 5.13. Grado de biodesulfuración a los 90 minutos de experimento y productividad máxima obtenidos en experimentos de desulfuración a varios caudales de aireación

Composición del gas de aireación

En las secciones anteriores se ha observado que, al variar tanto la velocidad de agitación como el caudal de aireación, la capacidad desulfurante presenta un valor máximo a unas determinadas condiciones (400 rpm y 2 L/L·min). Este comportamiento implica que hay un límite en las condiciones hidrodinámicas a partir del cual la biodesulfuración se ve afectada. Para estudiar el efecto de la composición del gas de aireación sobre la capacidad desulfurante se ha empleado oxígeno puro y se han escogido las siguientes condiciones: velocidad de agitación de 400 rpm, valor al que se obtiene una capacidad desulfurante máxima; y caudal de aireación de 1 L/L·min, valor que no afecta negativamente a la desulfuración.

En las Figuras 5.10 y 5.11 se observa que, al emplear oxígeno puro en el biorreactor, tanto la evolución de la concentración de DBT como de HBP se ven negativamente afectadas respecto del comportamiento observado al utilizar aire.

En la Tabla 5.11 se muestra el valor del grado de desulfuración a los 90 minutos (X_{BDS}^{90}), definido en la ecuación [3.2] para todos los experimentos realizados para una velocidad de agitación de 400 rpm, incluyendo el experimento en el que se emplea oxígeno puro como gas de aireación. En ella se observa que el empleo de oxígeno puro perjudica el proceso de desulfuración. De los estudios realizados en este apartado se puede concluir que las mejores condiciones hidrodinámicas para llevar a cabo el proceso de desulfuración en fermentador son: velocidad de agitación de 400 rpm; aire como gas de aireación; caudal de aireación 2 L/L·min.

TABLA 5.11. Grado de desulfuración a los 90 minutos empleando aire y oxígeno como gas de aireación a distintos caudales de aireación

N (rpm)	Q (L/L·min)	gas	X_{BDS}^{90}
400	1	aire	0,87
400	2	aire	1,00
400	3	aire	0,95
400	1	oxígeno	0,78

5.3. ESTUDIO del CONSUMO de OXÍGENO

En el apartado anterior se ha realizado un estudio en el que se determina la influencia de las condiciones fluidodinámicas sobre la capacidad desulfurante. Estas condiciones hidrodinámicas (velocidad de agitación y caudal de aireación) influyen sobre la disponibilidad de oxígeno. En este apartado se estudia cómo dichas condiciones hidrodinámicas influyen sobre el transporte y el consumo de oxígeno y su relación con la capacidad y velocidad de biodesulfuración.

Durante los experimentos descritos en el apartado 5.2 se monitorizó la evolución de la concentración del oxígeno disuelto en el medio. En la Figura 5.14 se muestran los perfiles de oxígeno de todos los experimentos realizados. El comportamiento observado resulta algo sorprendente, puesto que, en ausencia de crecimiento, el microorganismo consume todo el oxígeno que tiene disponible, en las condiciones de operación. El tiempo al que la concentración de oxígeno disuelto llega a cero depende de las condiciones hidrodinámicas, de esta manera, al aumentar la velocidad de agitación y el caudal de aireación la concentración de oxígeno disuelto cae más lentamente.

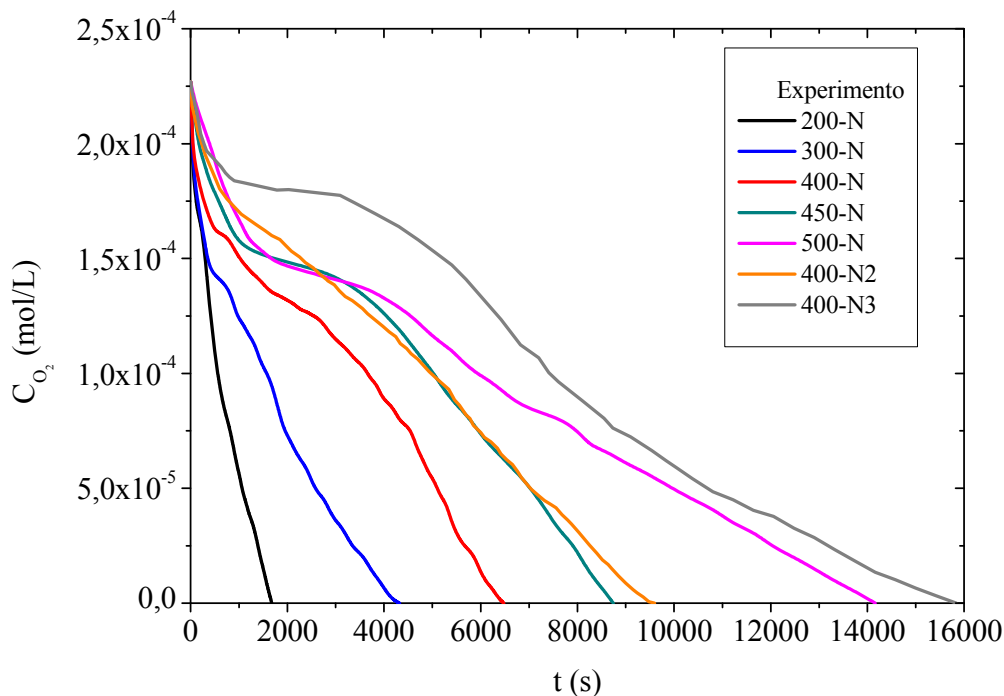


FIGURA 5.14. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto en los experimentos de biodesulfuración realizados bajo diferentes condiciones hidrodinámicas

Cuando, en un biorreactor, un componente poco soluble, como el oxígeno, debe ser transferido desde la fase gas al medio líquido, donde se encuentran los microorganismos, el balance de oxígeno puede expresarse según la diferencia entre dos términos, uno correspondiente al transporte de oxígeno (OTR: *Oxygen Transfer Rate*) y otro correspondiente a su consumo (OUR, *Oxygen Uptake Rate*), según la expresión [5.1]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad [5.1]$$

El término de transporte, OTR, se expresa habitualmente según la siguiente ecuación:

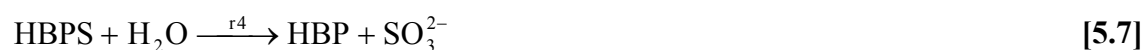
$$OTR = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [5.2]$$

donde $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $C_{O_2}^*$ es la concentración de saturación de oxígeno disuelto y C_{O_2} es la concentración de oxígeno disuelto en cada momento.

El término correspondiente al consumo de oxígeno, OUR, puede describirse, a su vez, en función de varias contribuciones, tal y como aparece en la ecuación [5.3]. En esta ecuación se considera que el microorganismo consume oxígeno con tres objetivos: el mantenimiento celular en estado viable (representado por un coeficiente de mantenimiento, m_{O_2}); el crecimiento (considerado mediante un rendimiento macroscópico, Y_{OX}) y la desulfuración (rendimiento Y_{BDS})

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_X = m_{O_2} C_X + Y_{OX} \frac{dC_X}{dt} + Y_{BDS} \frac{dX_{BDS}}{dt} \quad [5.3]$$

La ruta 4S, mostrada en la Figura 1.12 consta de cuatro reacciones en serie y una en paralelo cuyo esquema de reacción puede simplificarse a las siguientes expresiones (Hernández, 2006):



Debido a que, al llevar a cabo el proceso de desulfuración en biorreactor, no se observan intermedios de la ruta 4S en el medio (DBTO, DBTO₂, HBPS), el esquema de reacción previamente mostrado puede simplificarse a la siguiente expresión:



La variación de oxígeno debida a la biodesulfuración puede expresarse como:

$$\Delta n_{\text{O}_2} = -3 \Delta n_{\text{HBP}} \quad [5.9]$$

Teniendo en cuenta que el proceso de biodesulfuración estudiado en este trabajo se realiza en estado de *resting cells*, esto es, en ausencia de crecimiento, y la relación mostrada en la ecuación [5.9], la expresión [5.3] puede reescribirse de la siguiente manera:

$$\text{OUR} = m_{\text{O}_2} C_X + 3 \frac{dC_{\text{HBP}}}{dt} \quad [5.10]$$

Con las consideraciones anteriores, el balance de oxígeno queda:

$$\frac{dC_{\text{O}_2}}{dt} = k_L a \cdot (C_{\text{O}_2}^* - C_{\text{O}_2}) - \left[m_{\text{O}_2} C_X + 3 \frac{dC_{\text{HBP}}}{dt} \right] \quad [5.11]$$

Para la determinación del transporte y consumo de oxígeno se ha seguido la siguiente metodología de trabajo:

- 1) Se han obtenido los valores experimentales de concentración de oxígeno disuelto (C_{O_2}) a lo largo de cada experimento.
- 2) Se ha determinado la derivada numérica de los pares de datos $C_{\text{O}_2} - t$ para obtener el término de acumulación dC_{O_2}/dt .
- 3) Se ha aplicado un método predictivo (García-Ochoa y Gómez, 2004) para estimar los valores de $k_L a$ correspondientes a cada experimento.
- 4) Se ha determinado la velocidad de transporte de oxígeno (OTR) aplicando la ecuación [5.2].
- 5) Se ha calculado la velocidad de consumo de oxígeno debida a la desulfuración por su relación estequiométrica con la velocidad de producción de HBP, teniendo en cuenta la relación establecida en la ecuación [5.9].
- 6) Se ha determinado la velocidad de consumo de oxígeno aplicando la ecuación [5.1].
- 7) Se ha calculado el consumo de oxígeno debido al mantenimiento (m_{O_2}) según la ecuación [5.10].

5.3.1. Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia

La transferencia de oxígeno en un biorreactor tipo tanque agitado es función de un número elevado de variables que hace que surjan numerosas correlaciones empíricas que permiten estimar el valor de $k_L a$. Empleando como variables la velocidad de agitación, la velocidad superficial del gas y , en el caso de fluidos no-newtonianos, la viscosidad, se obtienen correlaciones del tipo:

$$k_L a = C_1 \cdot V_S^a \cdot N^b \cdot \mu^c \quad [5.12]$$

También puede emplearse la potencia suministrada por el agitador, según:

$$k_L a = C_2 \cdot V_S^a \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{b'} \cdot \mu^c \quad [5.13]$$

Los valores de los exponentes (a , b , b' y c) son diferentes para los distintos autores, en función de los parámetros geométricos del tanque y las propiedades del sistema. De manera aproximada se pueden acotar los valores de dichos exponentes como se indica a continuación (García-Ochoa y Gómez, 2004):

$$0,4 \leq a \leq 0,7; \quad 2,0 \leq b \leq 2,7; \quad 0,6 \leq b' \leq 1,0; \quad -0,7 \leq c \leq -0,4.$$

Debido a la complejidad del problema, los modelos empíricos para la descripción de la transferencia de materia comienzan a ser reemplazados por modelos predictivos o teóricos. Dichos modelos teóricos se han desarrollado para reactores de tipo columna o airlift (Kawase y col., 1987; García Calvo, 1989; Tobajas y col., 1999) y para reactores tipo tanque agitado (García-Ochoa y Gómez, 2004).

La predicción del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$, incluye, en primer lugar, la predicción del coeficiente de transferencia de materia, k_L y, por otra parte, la determinación del área interfacial específica, a .

Para la predicción del **coeficiente de transferencia, k_L** , se ha empleado un modelo (García-Ochoa y Gómez, 2004) basado en la teoría de penetración de Higbie (Kawase y col., 1987; Billet y Schules, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999), que supone una difusión no estacionaria de los elementos de la interfase gas-líquido. La expresión que se obtiene es:

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad [5.14]$$

Para la determinación del tiempo de exposición, t_e , se ha empleado la teoría desarrollada en 1941 por Kolmogorov, en la que se propone que el flujo turbulento puede representarse mediante pequeños torbellinos albergados en torbellinos cada vez más grandes (Kolmogorov, 1961).

La turbulencia es independiente de las condiciones externas, por lo que cualquier cambio en ella sólo puede ser resultado del efecto de los parámetros ε y ν . Kolmogoroff obtuvo la velocidad de escala y la longitud de escala para los enjambres más pequeños, de acuerdo a los parámetros η (longitud del enjambre) y u (velocidad de fluctuación). Estos parámetros dependen, tal y como se ha descrito, de los parámetros ε y ν , de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad [5.15]$$

$$u = (\nu \cdot \varepsilon)^{1/4} \quad [5.16]$$

El tiempo de exposición, t_e , suele considerarse como el tiempo en el que la burbuja se desplaza una longitud igual a su diámetro, y se estima mediante el cociente entre la longitud del enjambre, η , y la velocidad de fluctuación, u . Aplicando este modelo cuando el comportamiento reológico del líquido se describe mediante el modelo de Ostwald – de Waele (García-Ochoa y Gómez, 2004), se obtiene el tiempo de exposición como:

$$t_e = \left(\frac{K}{\varepsilon \cdot \rho} \right)^{\frac{1}{1+n}} \quad [5.17]$$

Al sustituir la ecuación [5.17] en la ecuación [5.14], y considerando, como es el caso, un comportamiento newtoniano del fluido ($n=1$), se obtiene la siguiente expresión para el coeficiente de transporte:

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left(\frac{\varepsilon \cdot \rho}{k} \right)^{1/4} \quad [5.18]$$

Como se observa en la ecuación [5.18], para la determinación de k_L es necesario calcular la disipación local de energía, ε . En un tanque agitado, la velocidad media de disipación de energía por unidad de masa puede aproximarse a:

$$\varepsilon \approx \varepsilon_{\text{ave}} = \frac{P}{\rho \cdot \frac{\pi}{4} \cdot T^2 \cdot H} \quad [5.19]$$

En sistemas aireados, la potencia suministrada, P , es siempre menor que en sistemas no aireados. Mediante la siguiente ecuación (Michel y Miller, 1962) es posible determinar P en un amplio rango de condiciones experimentales:

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot T^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad [5.20]$$

donde las constantes α y β dependen del tipo de agitador y la configuración del sistema de agitación. Sus valores para sistemas con doble turbina tipo Rushton, como las empleadas en este trabajo, son $\alpha = 1,224$ y $\beta = 0,432$ (Abrardi y col., 1988).

La potencia suministrada, P_0 , se puede evaluar teniendo en cuenta que el número de potencia, N_P , puede considerarse constante en régimen turbulento ($Re > 10000$) y, por tanto, depende sólo del tipo de agitador y de la geometría según la expresión:

$$N_P = \frac{P_0}{\rho \cdot N^3 \cdot T^5} \quad [5.21]$$

De esta forma, una vez conocidos todos los parámetros, el coeficiente de transferencia, k_L , puede calcularse empleando las ecuaciones [5.18], [5.19], [5.20] y [5.21].

Para el cálculo del **área interfacial específica**, a , hay que considerar su dependencia de las propiedades hidrodinámicas del reactor, concretamente del diámetro de burbuja, d_b , y de la fracción volumétrica del gas en el líquido, o *hold-up* del gas, φ , a su vez dependientes de la geometría y las propiedades físicas del sistema. Suponiendo burbujas esféricas, el área interfacial específica puede calcularse según la siguiente ecuación (Kawase y col., 1987; Tobajas y col., 1999):

$$a = \frac{6d_b}{\varphi} \quad [5.22]$$

El **hold-up** del gas puede estimarse a partir de la teoría de la turbulencia isotrópica con la siguiente ecuación (Kudrewizki y Rabe, 1986):

$$\frac{\varphi}{1-\varphi} = 0,5 \cdot \frac{V_s^{2/3}}{(g \cdot l)^{1/3}} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \quad [5.23]$$

Suponiendo que la velocidad de agitación afecta al diámetro de las burbujas formadas en régimen turbulento (Kudrewizki y Rabe, 1986), la microescala lateral de la turbulencia, l , puede expresarse según la siguiente expresión:

$$l = 2 \cdot \left(\frac{\sigma}{\xi \cdot \rho_L} \right)^{3/5} \cdot \left(\frac{L^{2/5}}{w^{6/5}} \right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{0,1} \quad [5.24]$$

donde el coeficiente de resistencia, ξ , tiene un valor constante de 0,4 para un intervalo de valores del número de Reynolds de $1 \cdot 10^3 \leq Re \leq 2 \cdot 10^5$.

Para configuraciones estándar del reactor y para la velocidad en la pala del agitador pueden considerarse las siguientes ecuaciones:

$$L = \frac{1}{6} h \quad [5.25]$$

$$w = \pi \cdot T \cdot N \quad [5.26]$$

Sustituyendo las ecuaciones [5.24], [5.25] y [5.26] en la ecuación [5.23] se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{\varphi}{1-\varphi} = 0,819 \cdot \frac{V_s^{2/3} \cdot N^{2/5} \cdot T^{4/15}}{g^{1/3}} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\sigma} \right)^{1/5} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{-1/15} \quad [5.27]$$

Si la fase líquida es viscosa, es preciso modificar la ecuación [5.27] para que tenga en cuenta las fuerzas viscosas (Bhavaraju y col., 1978; Kawase y Hashiguchi, 1996). Una forma de hacerlo es mediante la siguiente ecuación (García-Ochoa y Gómez, 2004):

$$\frac{\varphi_v}{1-\varphi_v} = \frac{\varphi}{1-\varphi} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{-1/4} \quad [5.28]$$

siendo φ_v , el **hold-up** en el sistema viscoso.

El **diámetro de burbuja** de equilibrio puede calcularse haciendo un balance entre la resistencia de la interfase y la presión dinámica ejercida por el flujo turbulento sobre la burbuja produciendo su rotura. El número de Weber, We , relaciona la tensión superficial y las fuerzas de fluctuación, y puede suponerse constante, es decir:

$$We = \frac{\tau \cdot d_b}{\sigma} = \text{cte} \quad [5.29]$$

Si se trata de un flujo turbulento isotrópico, la presión dinámica puede expresarse en términos de la microescala lateral de la turbulencia en equilibrio, l , supuesta del mismo orden de magnitud que el diámetro de burbuja, d_b , y de la velocidad de fluctuación, u , de forma que:

$$u = (\varepsilon \cdot l)^{1/3} \quad [5.30]$$

$$\tau \approx \rho_L \cdot u^2 \approx \rho_L \cdot \left[\left(\frac{P}{V} \right) \cdot \frac{d_b}{\rho_L} \right]^{2/3} \quad [5.31]$$

Combinando las ecuaciones [5.29] a [5.31], se obtiene:

$$d_b = 0,7 \cdot \frac{\sigma^{3/5}}{\left(\frac{P}{V} \right)^{2/5} \cdot \rho_L^{1/5}} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{0,1} \quad [5.32]$$

Una vez determinados el *hold-up* del gas (ecuación [5.28]) y el diámetro de burbuja (ecuación [5.32]) se puede calcular el área interfacial específica aplicando la ecuación [5.22]. Este valor, junto con el coeficiente de transferencia de materia calculado con la ecuación [5.18] permite la determinación del **coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$** .

En la Tabla 5.12 se muestran los valores de los parámetros empleados para la predicción de $k_L a$ y en la Tabla 5.13 se muestran los valores obtenidos para dicho coeficiente, para diferentes condiciones hidrodinámicas, correspondientes con las estudiadas en el presente apartado.

Tabla 5.12. Valores de los parámetros empleados en la predicción del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_{La}

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades
Densidad del líquido	ρ_L	998,25	kg/m ³
Densidad del gas	ρ_G	1,175	kg/m ³
Viscosidad del líquido	μ_L	0,0011	kg/m·s
Viscosidad del gas	μ_G	$1,86 \cdot 10^{-6}$	kg/m·s
Diámetro del agitador	T	0,045	m
Velocidad de agitación	N	variable	s ⁻¹
Número de potencia	Np	9	-
Velocidad de aireación	Q	variable	m ³ /s
Altura del líquido	H	0,115	m
Difusividad en el líquido	D _L	$2 \cdot 10^{-9}$	m ² /s
Tensión superficial	σ	0,035	kg·m ² /s ²
Volumen del líquido	V	0,001	m ³

TABLA 5.13. Valores del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_{La} , a distintas condiciones de operación

N (rpm)	Q (L/L·min)	$k_{La} \cdot 10^{-2}$ (s ⁻¹)
200	1	0,19
300	1	0,49
400	1	0,97
450	1	1,28
500	1	1,64
400	2	1,37
400	3	1,68

5.3.2. Resultados experimentales

La metodología descrita anteriormente se aplica a los experimentos mostrados en la Tabla 5.14. En las Tablas 5.15 a 5.21 se muestran los resultados obtenidos para los valores de OTR y OUR.

TABLA 5.14. Planificación experimental. Estudio de la velocidad de transporte y consumo de oxígeno

Exp	N (rpm)	Q (L/L·min)
200-N	200	1
300-N	300	1
400-N	400	1
450-N	450	1
500-N	500	1
400-N2	400	2
400-N3	400	3

TABLA 5.15. Resultados experimentales. Experimento 200-N

t (s)	C _{O2} (mol/L)·10 ⁻⁴	dC _{O2} /dt (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10 ⁻⁷
0	2,27	-11,23	0,00	11,23
120	1,73	-1,48	1,02	2,49
240	1,61	-1,44	1,24	2,68
480	1,13	-1,70	2,15	3,85
600	0,95	-1,25	2,49	3,74
720	0,83	-0,81	2,71	3,53
840	0,73	-1,00	2,90	3,90
960	0,60	-0,97	3,14	4,11
1080	0,48	-0,87	3,36	4,23
1200	0,39	-0,68	3,53	4,21
1320	0,32	-0,81	3,67	4,48
1440	0,20	-0,91	3,89	4,80
1680	0,00	-0,76	4,27	5,02

TABLA 5.16. Resultados experimentales. Experimento 300-N

t (s)	C_{O2} (mol/L)·10 ⁻⁴	dC_{O2}/dt (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10 ⁻⁷
0	2,27	-8,29	0,00	8,29
30	2,02	-6,30	1,22	7,52
60	1,89	-3,13	1,85	4,98
240	1,64	-1,24	3,10	4,34
480	1,43	-0,28	4,10	4,38
720	1,38	-0,29	4,34	4,64
1080	1,22	-0,34	5,16	5,50
1440	1,05	-0,52	5,97	6,49
1800	0,86	-0,80	6,93	7,73
2160	0,66	-0,39	7,88	8,27
2520	0,52	-0,46	8,56	9,02
2880	0,40	-0,40	9,17	9,57
3600	0,19	-0,30	10,20	10,50
4320	0,00	-0,11	11,10	11,21

TABLA 5.17. Resultados experimentales. Experimento 400-N

t (s)	C_{O2} (mol/L)·10 ⁻⁴	dC_{O2}/dt (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10 ⁻⁷
0	2,27	-7,64	0,00	7,64
60	1,95	-2,04	3,05	5,09
360	1,69	-0,60	5,58	6,18
720	1,60	-0,18	6,50	6,68
1560	1,38	-0,22	8,65	8,87
2040	1,31	-0,12	9,25	9,37
2520	1,25	-0,12	9,84	9,96
3000	1,15	-0,21	10,90	11,11
3480	1,05	-0,21	11,80	12,01
4080	0,87	-0,21	13,50	13,71
4680	0,67	-0,52	15,40	15,92
5280	0,44	-0,48	17,70	18,18
5760	0,23	-0,24	19,70	19,94
6480	0,00	-0,19	22,00	22,19

TABLA 5.18. Resultados experimentales. Experimento 450-N

t (s)	C_{O2} (mol/L)·10⁻⁴	dC_{O2}/dt (mol/L·s)·10⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10⁻⁷
0	2,27	-2,45	0,00	2,45
60	2,15	-1,51	1,56	3,07
120	2,06	-1,40	2,63	4,03
390	1,84	-0,59	5,55	6,14
750	1,67	-0,47	7,69	8,16
1125	1,55	-0,16	9,20	9,36
3330	1,38	-0,14	11,40	11,54
4320	1,19	-0,25	13,80	14,05
5025	1,00	-0,30	16,20	16,50
5640	0,83	-0,23	18,40	18,63
6420	0,64	-0,22	20,80	21,02
7425	0,38	-0,32	24,10	24,42
8040	0,21	-0,34	26,40	26,74
8745	0,00	-0,28	29,00	29,28

TABLA 5.19. Resultados experimentales. Experimento 500-N

t (s)	C_{O2} (mol/L)·10⁻⁴	dC_{O2}/dt (mol/L·s)·10⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10⁻⁷
0	2,27	-0,99	0,00	0,99
90	2,18	-0,81	1,46	2,27
300	2,05	-0,59	3,59	4,18
810	1,75	-0,47	8,60	9,07
1620	1,51	-0,17	12,50	12,67
4020	1,33	-0,12	15,50	15,62
5175	1,13	-0,16	18,60	18,76
6150	0,97	-0,14	21,30	21,44
7710	0,80	-0,12	24,20	24,32
9000	0,61	-0,11	27,20	27,31
10800	0,41	-0,13	30,50	30,63
12060	0,24	-0,13	33,20	33,33
13320	0,10	-0,12	35,60	35,72
14160	0,00	-0,12	37,20	37,32

TABLA 5.20. Resultados experimentales. Experimento 400-N2

t (s)	C_{O2} (mol/L)·10 ⁻⁴	dC_{O2}/dt (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10 ⁻⁷
0	2,27	-3,53	0,00	3,53
150	2,05	-0,81	2,99	3,80
1050	1,69	-0,18	7,92	8,10
1845	1,58	-0,16	9,44	9,60
2370	1,48	-0,17	10,80	10,97
2970	1,38	-0,19	12,20	12,39
3660	1,26	-0,20	13,90	14,10
4335	1,13	-0,25	15,60	15,85
4935	1,01	-0,22	17,30	17,52
5700	0,82	-0,26	19,90	20,16
6345	0,67	-0,27	21,90	22,17
6945	0,52	-0,25	24,00	24,25
7800	0,36	-0,21	26,20	26,41
9600	0,00	-0,06	31,20	31,26

TABLA 5.21. Resultados experimentales. Experimento 400-N3

t (s)	C_{O2} (mol/L)·10 ⁻⁴	dC_{O2}/dt (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OTR (mol/L·s)·10 ⁻⁷	OUR (mol/L·s)·10 ⁻⁷
0	2,27	-1,58	0,00	1,58
120	2,15	-0,99	2,06	3,05
330	1,97	-0,40	5,06	5,46
810	1,85	-0,19	7,01	7,20
1785	1,80	-0,02	7,95	7,97
3405	1,74	-0,11	8,90	9,01
5040	1,53	-0,16	12,50	12,66
6825	1,12	-0,21	19,30	19,51
8100	0,88	-0,17	23,40	23,57
9540	0,66	-0,14	27,10	27,24
10800	0,49	-0,11	30,00	30,11
12480	0,33	-0,11	32,70	32,81
14160	0,13	-0,10	36,00	36,10
15840	0,00	-0,07	38,20	38,27

5.3.3. Discusión de los resultados

En la Tabla 5.22 se muestran los resultados obtenidos para el consumo de oxígeno por desulfuración, calculados según la ecuación [5.9]. Dichos resultados, comparados con los valores de OUR_{total} (Tablas 5.15 a 5.21), muestran que la aportación de la biodesulfuración al consumo de oxígeno es muy baja. Este efecto se muestra en la Figura 5.15, en la que se representa la evolución con el tiempo de OUR_{total} y de OUR_{BDS} . En dicha figura se observa que el consumo de oxígeno calculado estequiométricamente para la desulfuración es de aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior al consumo de oxígeno total, por lo que se puede considerar que el consumo de oxígeno se debe principalmente al mantenimiento celular.

Con estas consideraciones, la ecuación [5.10], que define el consumo de oxígeno al desulfurar en condiciones de *resting cells*, puede simplificarse a la siguiente expresión:

$$OUR = m_{O_2} C_X \quad [5.33]$$

TABLA 5.22. Consumo de oxígeno por biodesulfuración (OUR_{BDS})

t (s)	200-N	300-N	400-N	450-N	500-N	400-N2	400-N3
	$OUR_{BDS} \text{ (mol/L}\cdot\text{s)} \cdot 10^{-9}$						
0	18,20	18,50	21,50	23,70	16,50	13,60	29,90
900	17,60	16,60	18,30	19,80	18,10	15,40	24,40
1800	12,30	15,50	14,60	12,10	14,40	18,40	14,50
2700	8,17	9,72	13,30	-	-	16,50	-
3600	6,31	3,96	8,52	7,56	6,88	9,30	7,58
5400	2,36	3,43	3,04	4,18	2,64	4,90	3,53
7200	1,93	2,27	1,83	0,97	0,73	2,23	1,06
9000	2,27	2,04	1,68	0,82	1,09	0,00	0,00
10800	1,38	1,48	1,28	1,32	1,39	0,00	0,00

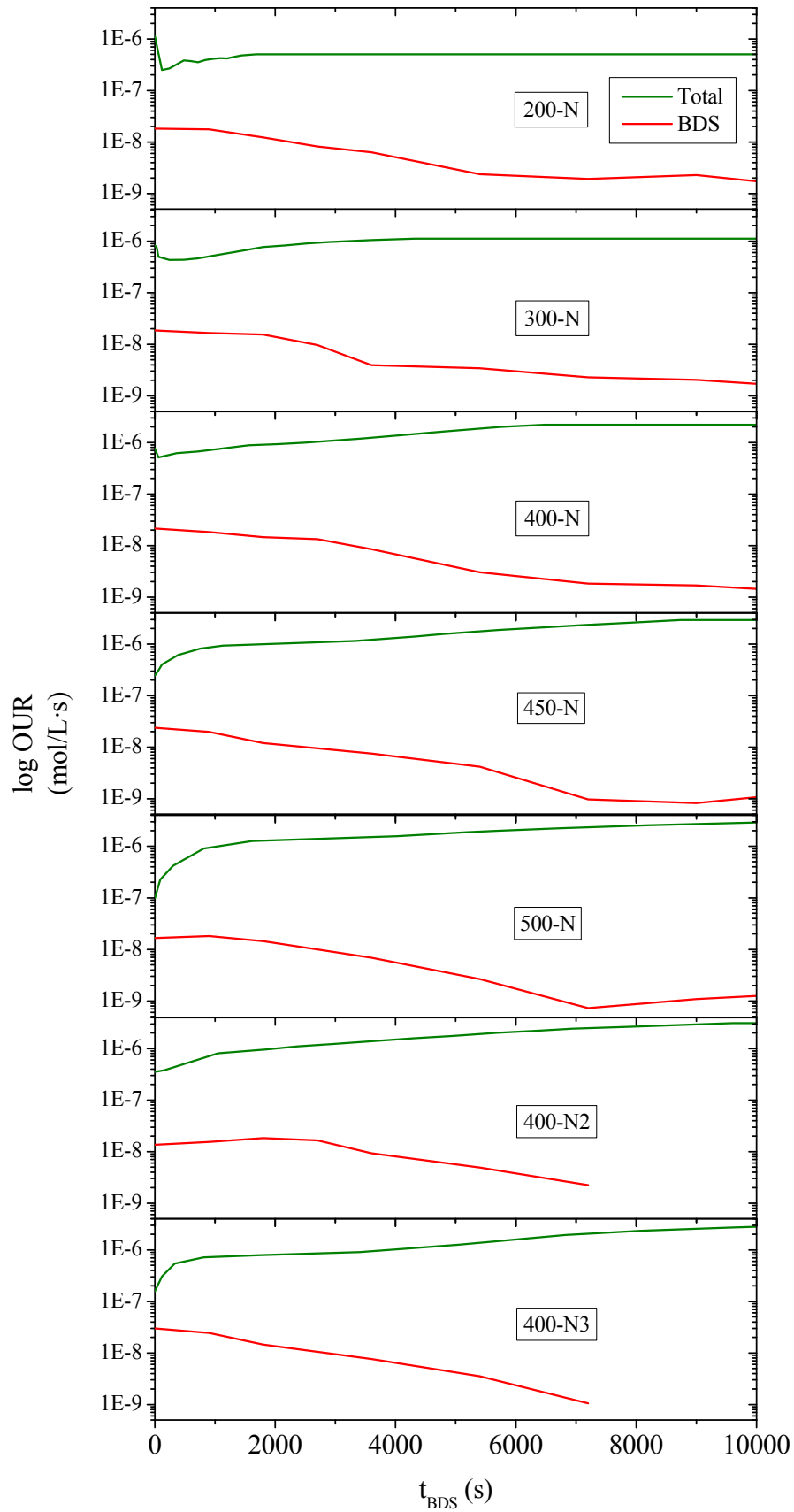


FIGURA 5.15. Comparación entre $\text{OUR}_{\text{total}}$ y OUR_{BDS} en experimentos de biodesulfuración realizados a distintas condiciones hidrodinámicas

Para comprobar experimentalmente este comportamiento, se realizaron los siguientes dos experimentos. Se empleó como biocatalizador células de 23 horas de edad de crecimiento en una concentración de 1,4 g/L obtenidas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1 de la presente Memoria. El procedimiento empleado para llevar a cabo los experimentos en biorreactor es el descrito en el apartado 2.2.2. La reacción se llevó a cabo en medio HEPESx2. A uno de los experimentos se le añadió una concentración de DBT como sustrato azufrado de 25 μM , mientras que al otro experimento no se le añadió ningún sustrato azufrado. Las condiciones de operación fueron: temperatura de 30 °C; caudal de aire 1 L/L·min; agitación de 200 rpm. Durante el proceso se monitorizó la concentración de oxígeno disuelto, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 5.16. En dicha figura se observa que ambas evoluciones son muy similares, por lo que se puede afirmar que el consumo de oxígeno debido a la biodesulfuración es prácticamente despreciable comparado con el consumo debido a otras reacciones metabólicas.

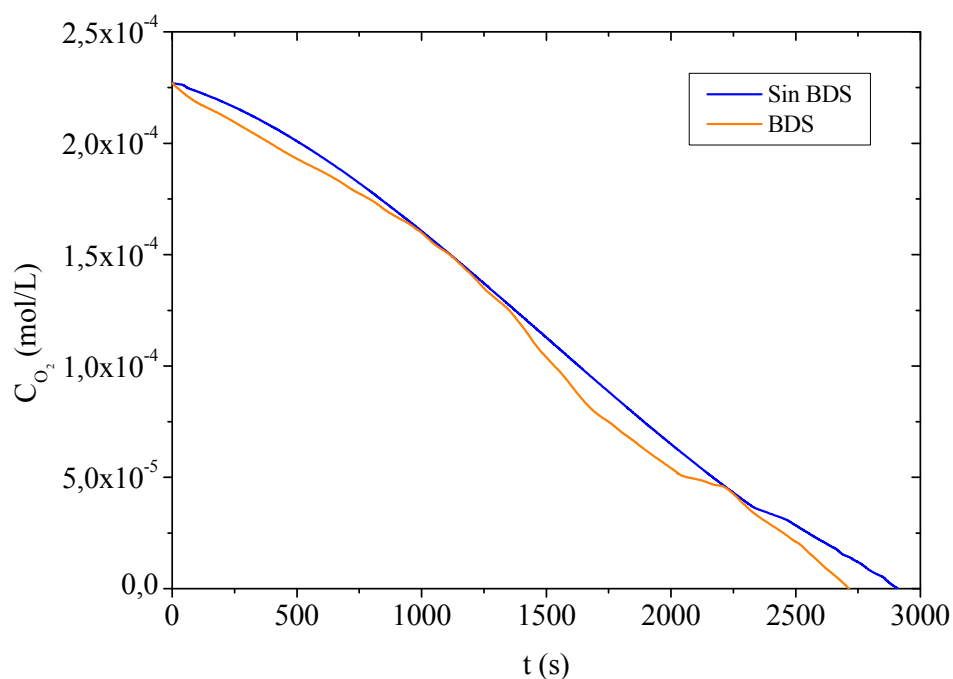


FIGURA 5.16. Comparación en la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en biorreactor en el proceso de desulfuración y cuando no existe desulfuración

Como se puede observar en la Figura 5.14, en todos los casos la concentración de oxígeno disuelto cae a cero, siendo el tiempo necesario para agotar el oxígeno disuelto dependiente de las condiciones hidrodinámicas. En ninguno de los casos se observa, a los tiempos de experimentación analizados, una recuperación en la concentración de oxígeno, comportamiento que significa que, en todos los experimentos, el consumo de oxígeno está limitado por su transporte.

En la Figura 5.17 se muestra la evolución de OTR y OUR a lo largo de cada experimento. En los experimentos 200-N y 300-N se observa que la velocidad de consumo de oxígeno es algo mayor a la de transporte a tiempos cortos, debido a este hecho, la velocidad de caída del oxígeno disuelto es mayor que en el resto de experimentos, en los que la diferencia entre OTR y OUR es mínima.

En los experimentos realizados con un caudal de aireación de 1 L/L·min (200-N, 300-N, 400-N, 450-N y 500-N) se observa que, al aumentar la velocidad de agitación aumenta a su vez la velocidad de transporte de oxígeno y, consecuentemente, la de su consumo. El mismo comportamiento se observa al aumentar el caudal de aireación manteniendo la velocidad de agitación constante (experimentos 400-N, 400-N2 y 400-N3).

En un estudio anterior del grupo de investigación sobre el consumo y transporte de oxígeno durante el crecimiento celular (Gomez y col., 2006) se encontró un comportamiento similar al observado en el presente trabajo al estudiar el consumo y transporte en *resting cells*. Se comprobó que, al aumentar la velocidad de agitación, aumentaban tanto OUR como OTR, así como la velocidad de crecimiento y la cantidad máxima de biomasa alcanzada. Sin embargo, la capacidad desulfurante comenzó a disminuir a partir de una velocidad de agitación de 500 rpm.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el presente capítulo, en el que se observa una dependencia del consumo y del transporte de oxígeno en función de las condiciones hidrodinámicas empleadas. Como se ha descrito anteriormente, la capacidad desulfurante en *resting cells* presenta un máximo para unas condiciones hidrodinámicas determinadas. Es significativo el hecho de que una velocidad de agitación de 500 rpm sea perjudicial para el correcto funcionamiento de la ruta 4S tanto en la etapa de crecimiento (Gomez y col., 2006) como en el proceso de desulfuración en biorreactor, descrito en este capítulo.

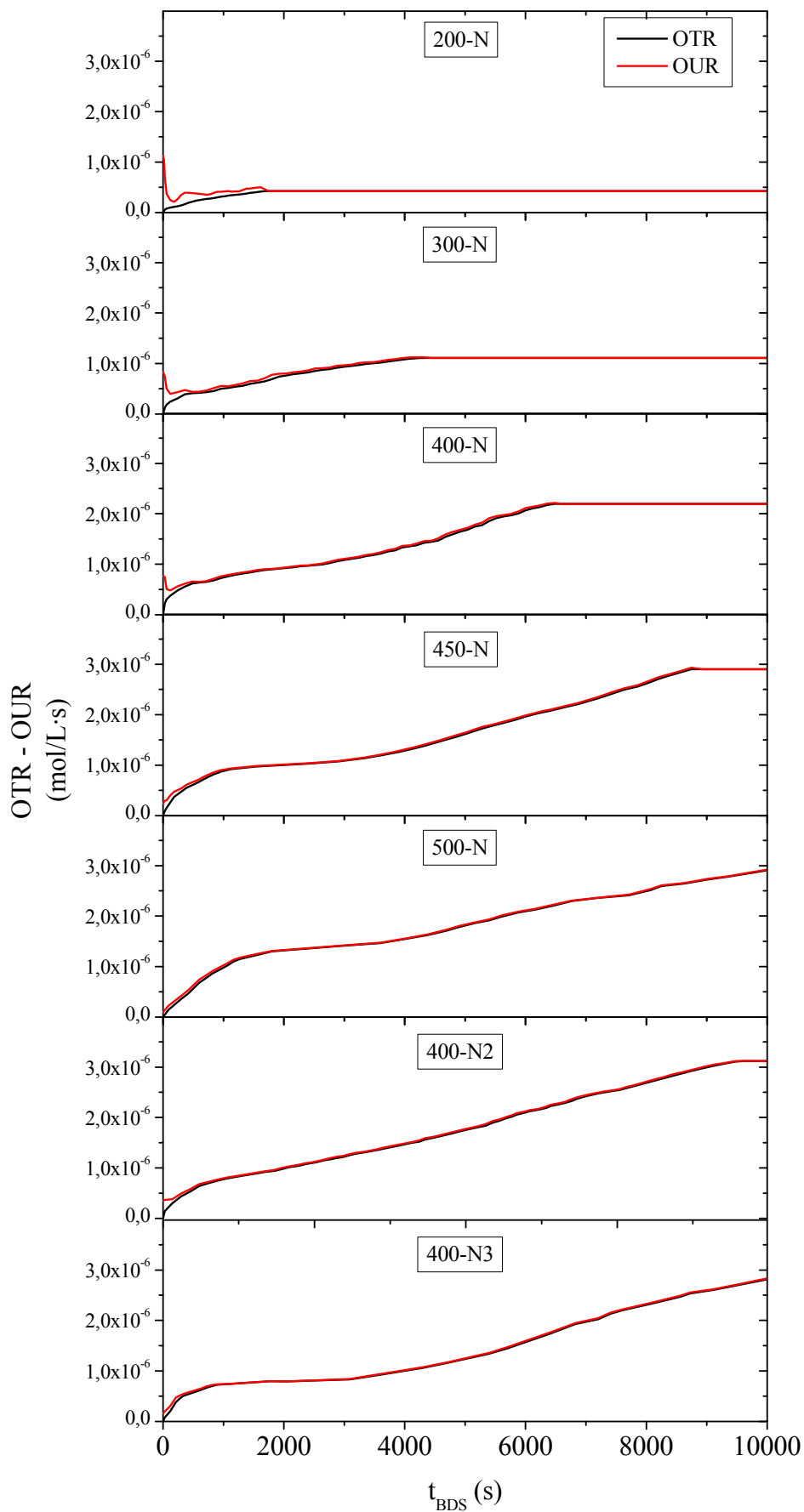


FIGURA. 5.17. Evolución a lo largo de cada experimento de los valores de OTR y OUR

En un estudio paralelo a éste del grupo de investigación (Escobar, 2013) se determinó el consumo de oxígeno debido al mantenimiento celular, representado por el coeficiente m_{O_2} (ecuación [5.3]). Dicho estudio reveló que, a velocidades de agitación menores de 400 rpm, el coeficiente de mantenimiento, m_{O_2} , alcanza un valor determinado para cada velocidad de agitación, valor que aumenta al aumentar dicha velocidad. A velocidades de agitación mayores de 500 rpm, el valor de m_{O_2} no varía con la velocidad de agitación, tal y como se muestra en la Figura 5.18. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo y permiten la posibilidad de comparar el comportamiento del microorganismo en condiciones de crecimiento y de *resting cells*.

En la Figura 5.19 se muestra la evolución del coeficiente de consumo de oxígeno para mantenimiento, m_{O_2} , en los experimentos descritos en el presente capítulo para las distintas condiciones hidrodinámicas mostradas en la Tabla 5.14. Dicho coeficiente se ha calculado según la ecuación [5.33], teniendo en cuenta que, en todos los casos, la concentración de biomasa presente en el medio es constante e igual a 2,1 g/L. En dicha figura se representa, a su vez, el valor del coeficiente de mantenimiento obtenido durante el crecimiento para las mismas condiciones (Escobar, 2013). Se puede observar que, en todos los casos, el coeficiente de mantenimiento en *resting cells* tiende a alcanzar el valor determinado en crecimiento.

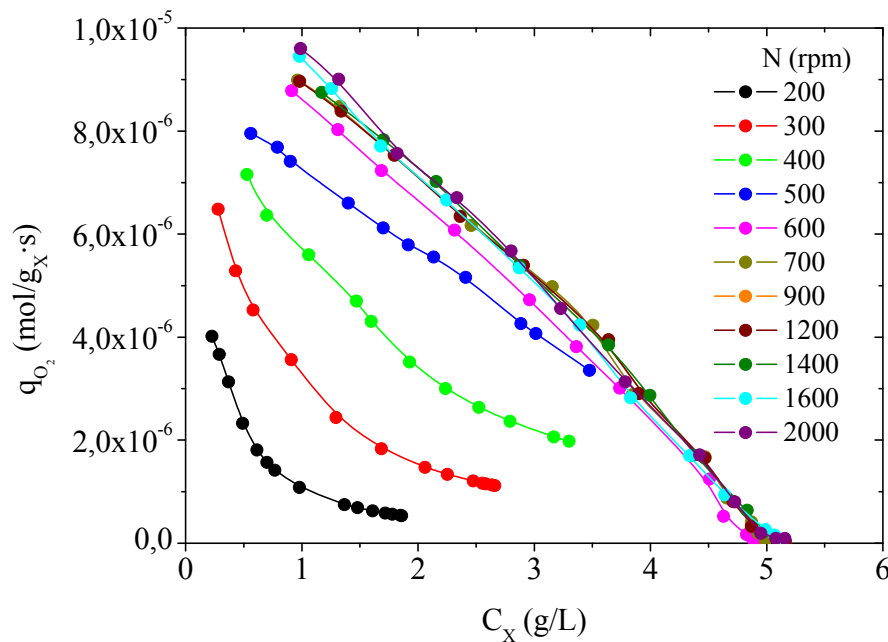


FIGURA 5.18. Valores del coeficiente de consumo de oxígeno, q_{O_2} , en función de la concentración de biomasa (Escobar, 2013). Cuando la biomasa permanece constante, q_{O_2} equivale a m_{O_2}

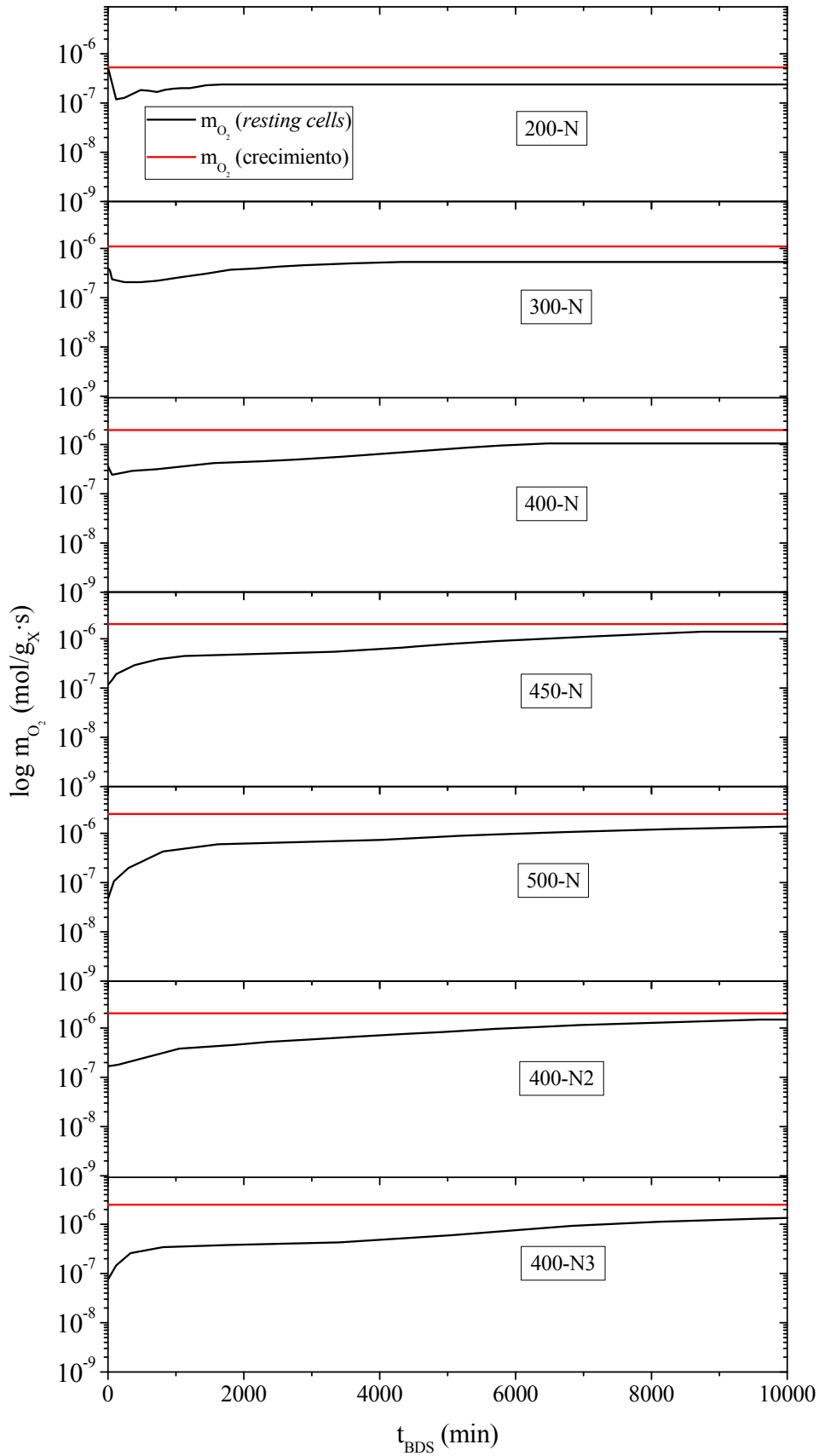


FIGURA 5.19. Representación del coeficiente consumo de oxígeno por mantenimiento, m_{O_2} , obtenida en condiciones de crecimiento (Escobar, 2013) y en desulfuración en resting cells

5.3.4 Justificación de las condiciones fluidodinámicas en biorreactor

En los apartados anteriores se han determinado las condiciones fluidodinámicas óptimas para llevar a cabo el proceso de biodesulfuración en biorreactor tipo tanque agitado de 1 L. Empleando estas condiciones (agitación de 400 rpm y caudal de aireación de 2 L/min) se han conseguido unos resultados de biodesulfuración comparables con los obtenidos en matraz *Erlenmeyer*. Esto puede deberse a que las condiciones fluidodinámicas en ambos sistemas sean parecidas, ya que un criterio bastante extendido de cambio de escala en los bioprocesos con microorganismos es mantener la velocidad de transporte de oxígeno (OTR) constante, es decir, un valor similar de k_{La} , el coeficiente volumétrico de transporte (García-Ochoa y Gómez, 2009).

Existen en la literatura expresiones para la estimación del valor de dicho coeficiente de transferencia de oxígeno, k_{La} , en matraz *Erlenmeyer*. En este caso se va a emplear la ecuación [5.34] (García-Ochoa y col., 2012). Los valores de los parámetros y propiedades utilizados para el cálculo de k_{La} en matraz *Erlenmeyer* se muestran en la Tabla 5.23 y corresponden a las condiciones de operación empleadas para llevar a cabo la BDS en matraz *Erlenmeyer* en el presente trabajo.

$$k_{La} = 1,44 \cdot 10^{-3} \cdot N^{0,88} \cdot \left(\frac{V_F}{V_L}\right)^{0,8} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_w}\right)^{-0,4} \quad [5.34]$$

TABLA 5.23. Valores de los parámetros empleados para la estimación de k_{La} en matraz *Erlenmeyer*. Valor obtenido a las condiciones de operación empleadas

Parámetro	Unidades	Valor
N	s ⁻¹	200
V _F	L	0,100
V _L	L	0,0021
μ _L	kg·m ⁻¹ ·s ⁻¹	1,1·10 ⁻³
k_{La}	s⁻¹	1,39·10⁻²

Como se observa en la Tabla 5.23, el valor de k_{La} obtenido al realizar la biodesulfuración en matraz *Erlenmeyer* es de 1,39·10⁻² s⁻¹. En la Figura 5.20 se muestran los valores de k_{La} estimados para un biorreactor de tanque agitado, a varias velocidades de agitación y varios caudales de aireación, siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.3.1; también se muestran los valores obtenidos para k_{La} en

matraz *Erlenmeyer* a distintas velocidades de agitación, incluyendo las empleadas en el presente trabajo (200 rpm). En dicha figura se observa que, de todos los experimentos de biodesulfuración en biorreactor realizados, el que más se aproxima el valor de k_La al obtenido en matraz *Erlenmeyer* a 200 rpm es el llevado a cabo a una velocidad de agitación de 400 rpm y un caudal de 2 L/min ($k_La = 1,37 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Se trata, precisamente, de las condiciones de operación que proporcionan los mejores resultados de desulfuración en biorreactor.

Como ya se ha indicado, uno de los criterios más empleados para llevar a cabo el cambio de escala en bioprocesos aerobios es el basado en mantener el valor de k_La constante. En este caso este criterio se puede considerar válido teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Ha sido necesario combinar las dos condiciones fluidodinámicas fundamentales (velocidad de agitación y caudal de aireación) para obtener el transporte de oxígeno adecuado para llevar a cabo la biodesulfuración.
- Al llevar a cabo la desulfuración en biorreactor con un caudal de aireación de 1 L/min, se obtuvo el máximo de desulfuración a una velocidad de agitación de 400 rpm. Este hecho implica que la variable velocidad de agitación afecta al biocatalizador en mayor medida que la variable caudal de aireación. De la citada gráfica se desprende que a 450 rpm y un caudal de 1 L/min el valor de k_La es de $1,28 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, mayor que el obtenido a 400 rpm y un caudal de 1 L/min ($0,97 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) y más cercano al estimado para matraz *Erlenmeyer* a 200 rpm ($1,39 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, el rendimiento del proceso es menor a 450 rpm que a 400 rpm, con un caudal de 1 L/min. Este comportamiento puede explicarse debido a que las condiciones fluido dinámicas pueden ser muy diferentes. De hecho, en un trabajo de investigación realizado en paralelo, se observó que la capacidad desulfurante de células crecidas a más de 400 rpm en biorreactor disminuía bruscamente frente a la capacidad de células crecidas a 400 rpm, lo que hace pensar en un stress hidrodinámico u oxidativo que perjudica la acción de las enzimas involucradas en la ruta 4S, en especial la que cataliza la última de las reacciones, la desulfinaasa DszB (Escobar, 2013).

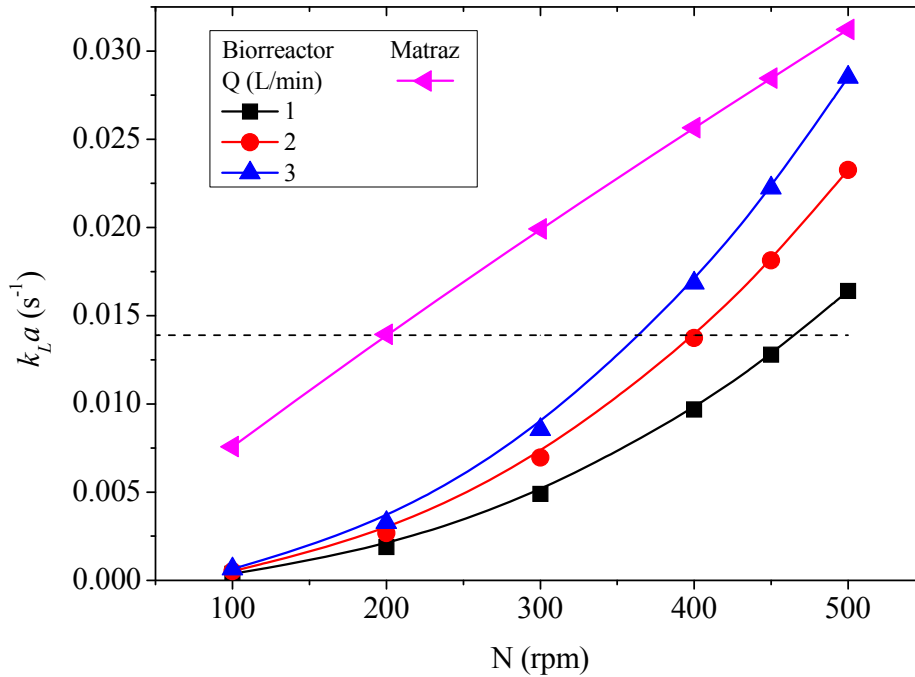


FIGURA 5.20. Comparación de los valores de k_La estimados en biorreactor y en matraz *Erlenmeyer*

5.4. ESTUDIO MORFOLÓGICO del CULTIVO

Como se observó en el apartado 5.1.1, al llevar a cabo el proceso de biodesulfuración sin la adición de Tween® 80 en matraz *Erlenmeyer*, aparecen un gran número de agregados en el caldo. Dichas estructuras no se aprecian *de visu* al realizar la biodesulfuración en biorreactor en las mismas condiciones, tal y como se puede observar en la Figura 5.21. Los resultados experimentales mostrados en los apartados 5.1 y 5.2 concluyen que la mayor capacidad desulfurante se obtiene al llevar a cabo el proceso en matraz *Erlenmeyer* y que la adición de un surfactante externo, como es Tween® 80, elimina los agregados del medio aunque no modifica el desarrollo del proceso en matraz (apartado 5.1.2). Este comportamiento implica que la adición de un surfactante externo compensa el efecto producido por los agregados con un aumento de la biodisponibilidad de DBT en fase acuosa.

Al emplear un biorreactor para realizar el proceso de biodesulfuración se modifican completamente las condiciones de operación. El estrés hidrodinámico que supone la agitación mecánica por medio de una turbina de palas provoca la disgregación de los aglomerados que se forman en matraz *Erlenmeyer*.

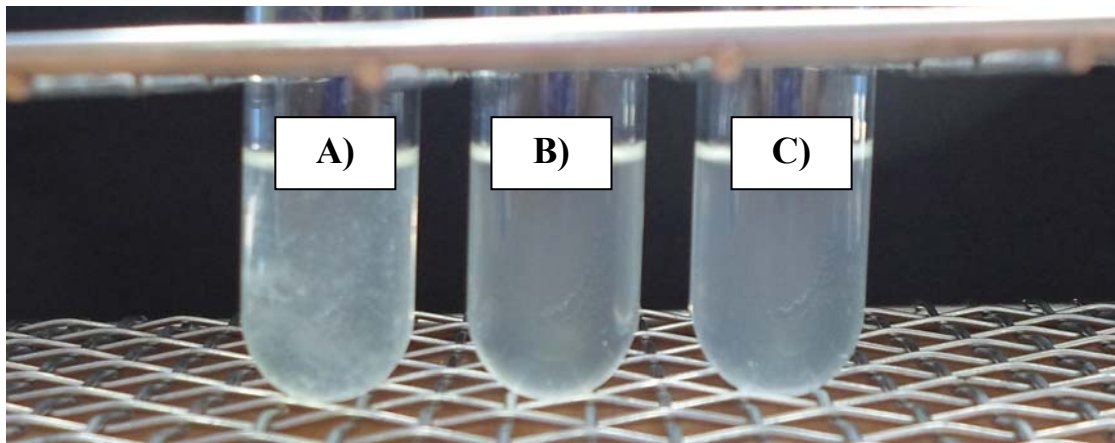


FIGURA 5.21. *Fotografías del medio de biodesulfuración. A) Matraz Erlenmeyer sin Tween® 80; B) Matraz Erlenmeyer con Tween® 80; C) Biorreactor sin Tween® 80*

5.4.1. Estudio de la formación de agregados

En primer lugar se realizó un estudio para establecer las causas que llevan a la formación de los citados agregados. Se realizaron diversos experimentos en matraz *Erlenmeyer*, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2 de la presente Memoria.

Para comprobar si la formación de los agregados se debe al propio proceso de desulfuración, se realizaron dos experimentos en los que a uno de ellos se le añadió DBT al medio en una concentración de 25 μM , mientras que el otro se llevó a cabo en ausencia de DBT. En ambos casos se formaron agregados en los primeros 5 minutos de proceso, como se observa en la Figura 5.22. De esta manera se puede descartar la relación entre la biodesulfuración y la aglomeración.

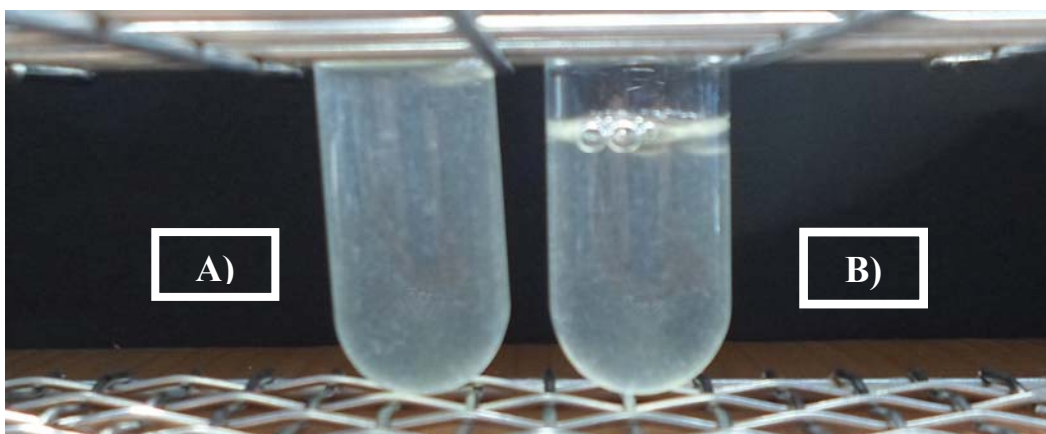


FIGURA 5.22. *Fotografías del medio de biodesulfuración. A) Matraz Erlenmeyer con DBT; B) Matraz Erlenmeyer sin DBT*

El siguiente paso fue determinar si los agregados se forman debido a la presencia de cosustratos en el medio. Se realizaron cuatro experimentos, todos en presencia de DBT en concentración de 25 μM . En uno de ellos se empleó medio HEPES sin cosustrato, mientras que en los otros tres se utilizó medio HEPES con ácido acético, cítrico y succínico, respectivamente. La Figura 5.23 muestra fotografías de los cuatro experimentos y en ella se observa que únicamente en el caso de emplear ácido acético en el medio se forman agregados.

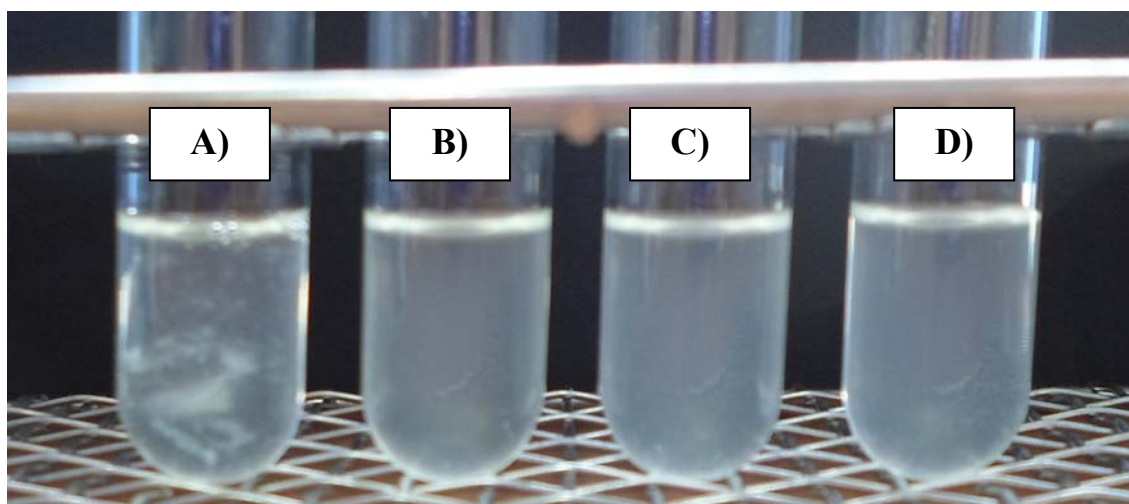


FIGURA 5.23. Fotografías del medio de biodesulfuración. A) Matraz Erlenmeyer con ácido acético; B) Matraz Erlenmeyer con ácido cítrico; C) Matraz Erlenmeyer con ácido succínico; D) Matraz Erlenmeyer sin cosustrato

La producción microbiana de polímeros extracelulares (EPS) está influenciada por muchos factores tales como la composición del medio (fuentes de carbono y nitrógeno) y las condiciones de operación (temperatura, pH, etc.). Esta variedad de condiciones explica que, en ocasiones, se produzcan resultados extraños o contradictorios en la producción de EPS (Celik y col., 2008). Existen varias especies de *Pseudomonas putida* capaces de producir EPS y agruparse en forma de biofilms (Auerbach y col., 2000; Celik y col., 2008; McEwen y col., 2010); este comportamiento puede estimularse en presencia de altas concentraciones de algunas fuentes de carbono (Celik y col., 2008). En este caso, la producción de EPS y la generación de biofilms se ven favorecidas por la presencia de ácido acético. Una de las características de los biofilms es su naturaleza hidrofóbica (Allison y col., 1990), característica que debe ayudar a aumentar la biodisponibilidad de DBT por parte de las células.

5.4.2. Estudio microscópico del cultivo

Una vez determinadas las causas de la presencia de agregados en el medio de reacción se realizó un estudio microscópico del cultivo. De esta manera se pretende determinar las características morfológicas de dicho cultivo a nivel celular, relacionándose, si es posible, con su capacidad desulfurante.

Para el análisis microscópico de las muestras se emplearon tres técnicas distintas. Se utilizó un microscopio óptico para observación directa de las muestras. Para un análisis más detallado se emplearon dos técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM); se realizó un análisis por tinción negativa para obtener un mayor detalle de la morfología bacteriana y un análisis de cortes ultrafinos de muestras incluidas en resina para visualizar el interior celular.

Se realizaron seis experimentos detallados en la Tabla 5.24. El experimento MIC-1 corresponde a la mezcla celular que es empleada como inóculo en los demás experimentos. Los experimentos MIC-2 y MIC-3 están realizados en matraz *Erlenmeyer*, el experimento MIC-2 se lleva a cabo en ausencia de Tween® 80 para analizar la formación de los agregados, mientras que el experimento MIC-3 se realiza con 5 % de Tween® 80 para observar el efecto del surfactante. Los experimentos MIC-4 y MIC-5 están realizados en biorreactor con una velocidad de agitación de 200 rpm y con un caudal de aire de 1 L/min, el experimento MIC-4 se lleva a cabo en ausencia de Tween® 80 para ser comparado con el experimento MIC-2, mientras que el experimento MIC-5 se realiza con 5 % de surfactante. El experimento MIC-6 se ha realizado en biorreactor en las condiciones óptimas previamente determinadas (velocidad de agitación de 400 rpm y caudal de aire de 2 L/min). El tiempo de muestreo de todos los experimentos es de 180 minutos, salvo en el caso del experimento MIC-1.

TABLA 5.24. Planificación experimental para el estudio microscópico del cultivo

Experimento	Matraz (rpm)	Biorreactor (rpm / L _{aire} /min)	Tween® 80
MIC-1		Inóculo	
MIC-2	200	-	No
MIC-3	200	-	Si
MIC-4		(200 / 1)	No
MIC-5		(200 / 1)	Si
MIC-6		(400 / 2)	Si

Observaciones en microscopio óptico

En la Figura 5.24 se muestran las fotografías obtenidas en el microscopio óptico con 2000 aumentos. En el experimento MIC-2 se observan claramente los agregados celulares, como se ha descrito anteriormente, se trata de un biofilm bacteriano formado por la adhesión de un gran número de células. Debido a la presencia de ácido acético, y a las características fluidodinámicas del proceso en matraz *Erlenmeyer*, las células reaccionan generando una sustancia que hace que agreguen formando el biofilm. Es destacable la morfología de las células en el experimento MIC-4, correspondiente a la desulfuración en biorreactor a 200 rpm sin la adición de surfactante externo; en este caso, no se producen agregados, como en el caso de hacerlo en matraz *Erlenmeyer*, sin embargo, se produce un cambio en la morfología celular, se observa que las células son mucho más alargadas que en el resto de experimentos. En los demás experimentos, las células presentan un aspecto muy similar, sin detectarse diferencias significativas respecto a la morfología inicial.

Observaciones en microscopio electrónico de transmisión

En las Figuras 5.25 y 5.26 se muestran las fotografías obtenidas al microscopio electrónico de transmisión empleando las técnicas de tinción negativa y de cortes ultrafinos, respectivamente.

En la Figura 5.25 se observa la morfología celular con un nivel de detalle mayor que en el microscopio óptico. En la muestra MIC-1, correspondiente al inóculo, se observan dos tipos de células bien diferenciados, por una parte unas células cortas y de color claro, y por otra parte unas células alargadas y oscuras, correspondientes a células de 5 horas y de 23 horas de edad de crecimiento, respectivamente. En el experimento MIC-2 se observa la generación de EPS. El mismo comportamiento se observa en las células del experimento MIC-4; sin embargo, en este caso, no llega a formarse el biofilm debido a la agitación mecánica en el biorreactor. En el resto de experimentos, en los que se añade Tween® 80 al medio, no se observa ninguna secreción.

La Figura 5.26 corresponde a la técnica de cortes ultrafinos, en la que se muestra el interior de las células. En el experimento MIC-2 se observa el corte del biofilm que en las figuras anteriores se mostraba como una secreción celular. En el experimento MIC-4 también existen indicios de la misma secreción, mostrando las células nuevamente cambios morfológicos, fundamentalmente en cuanto a la forma de la pared celular, más irregular que en las células del resto de experimentos. En general, en los

experimentos MIC-1, 2, 3 y 5, las células presentan una morfología muy similar, sin que se aprecien diferencias significativas.

Conclusiones derivadas de este estudio

En ausencia de un surfactante externo, y con la presencia de una concentración alta de ácido acético las células generan un polímero extracelular. Al llevar a cabo el proceso de BDS en *resting cells* en matraz *Erlenmeyer* se forma un biofilm bacteriano. La naturaleza hidrofóbica del biofilm aumenta la biodisponibilidad de DBT, factor que ayuda a aumentar la capacidad desulfurante. Al llevar a cabo el proceso en biorreactor, la agitación mecánica hace que el biofilm se rompa, o no llegue a formarse, por lo que el material extracelular se encuentra disperso por el medio, disminuyendo la disponibilidad de DBT por parte de las células. También se observa en este caso un cambio en la morfología celular, obteniéndose células más alargadas.

La adición de un surfactante externo (Tween® 80) hace que se reduzca el estrés por parte del microorganismo, se eliminan los agregados y se recupera la morfología celular inicial. En matraz *Erlenmeyer* el efecto, en principio negativo, de eliminar los agregados parece compensarse por el aumento de la solubilidad y la biodisponibilidad de DBT, obteniéndose unos resultados de BDS similares. En biorreactor, el efecto es positivo, puesto que se evita la formación de material extracelular disperso que “atrapa” el DBT y no permite que esté disponible para las células y, por otra parte, aumenta su solubilidad debido al efecto surfactante.

La integridad de la pared celular no se ve afectada al realizar la biodesulfuración en biorreactor en las condiciones hidrodinámicas empleadas. Estas observaciones son coherentes con el comportamiento observado durante el crecimiento celular (Escobar, 2013), donde macroscópicamente no se observaron signos de estrés hidrodinámico u oxidativo al llevar a cabo el crecimiento celular a altas velocidades de agitación.

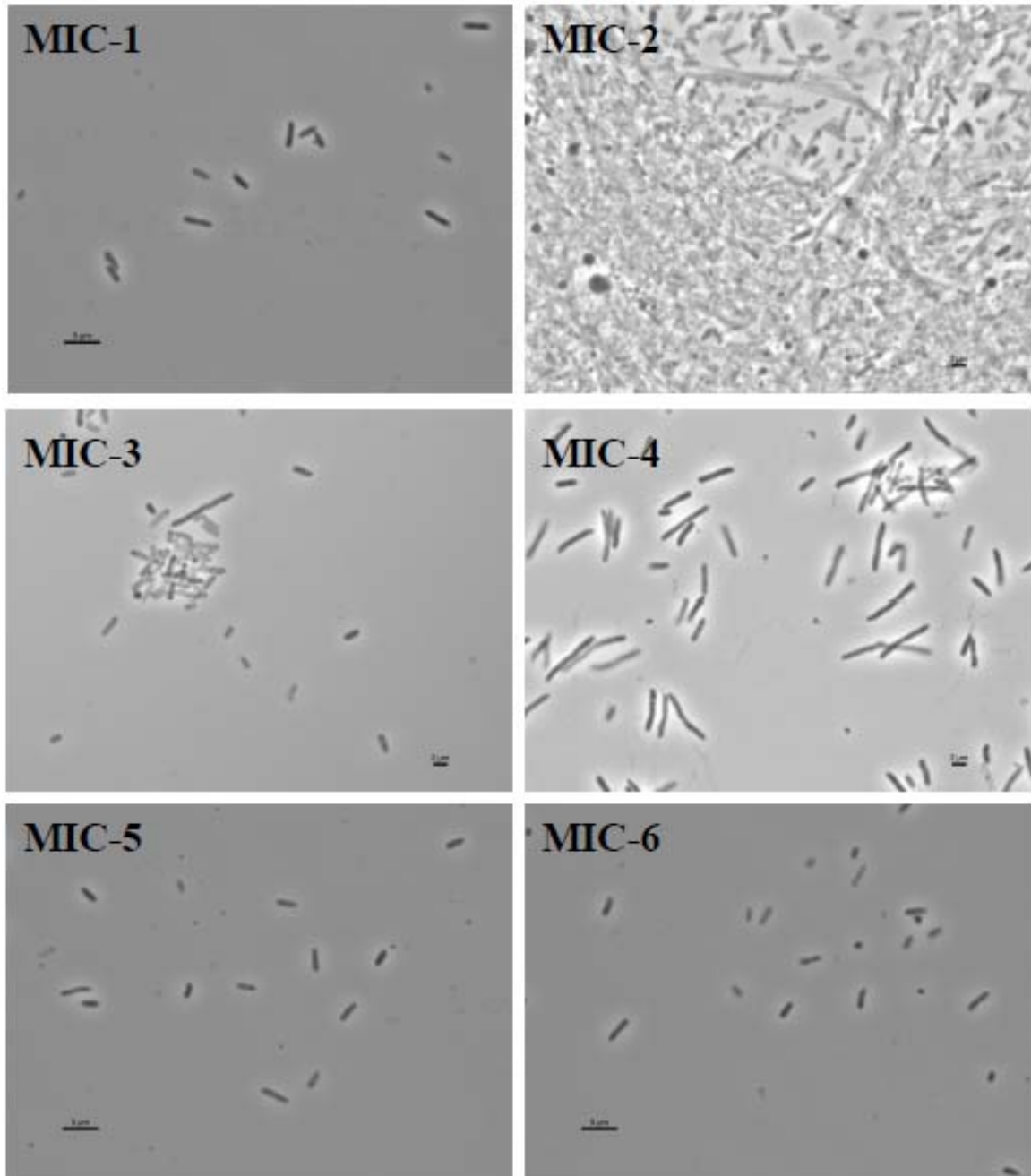


FIGURA 5.24. Fotografías al microscopio óptico de *Pseudomonas putida* KTH2 desulfurando en diferentes condiciones de operación.

MIC-1) Inóculo; **MIC-2)** Matraz, sin Tween® 80; **MIC-3)** Matraz, con Tween® 80;
MIC-4) Biorreactor, 200 rpm, 1 L_{aire}/min , sin Tween® 80;
MIC-5) Biorreactor, 200 rpm, 1 L_{aire}/min , con Tween® 80;
MIC-6) Biorreactor, 400 rpm, 2 L_{aire}/min , con Tween® 80

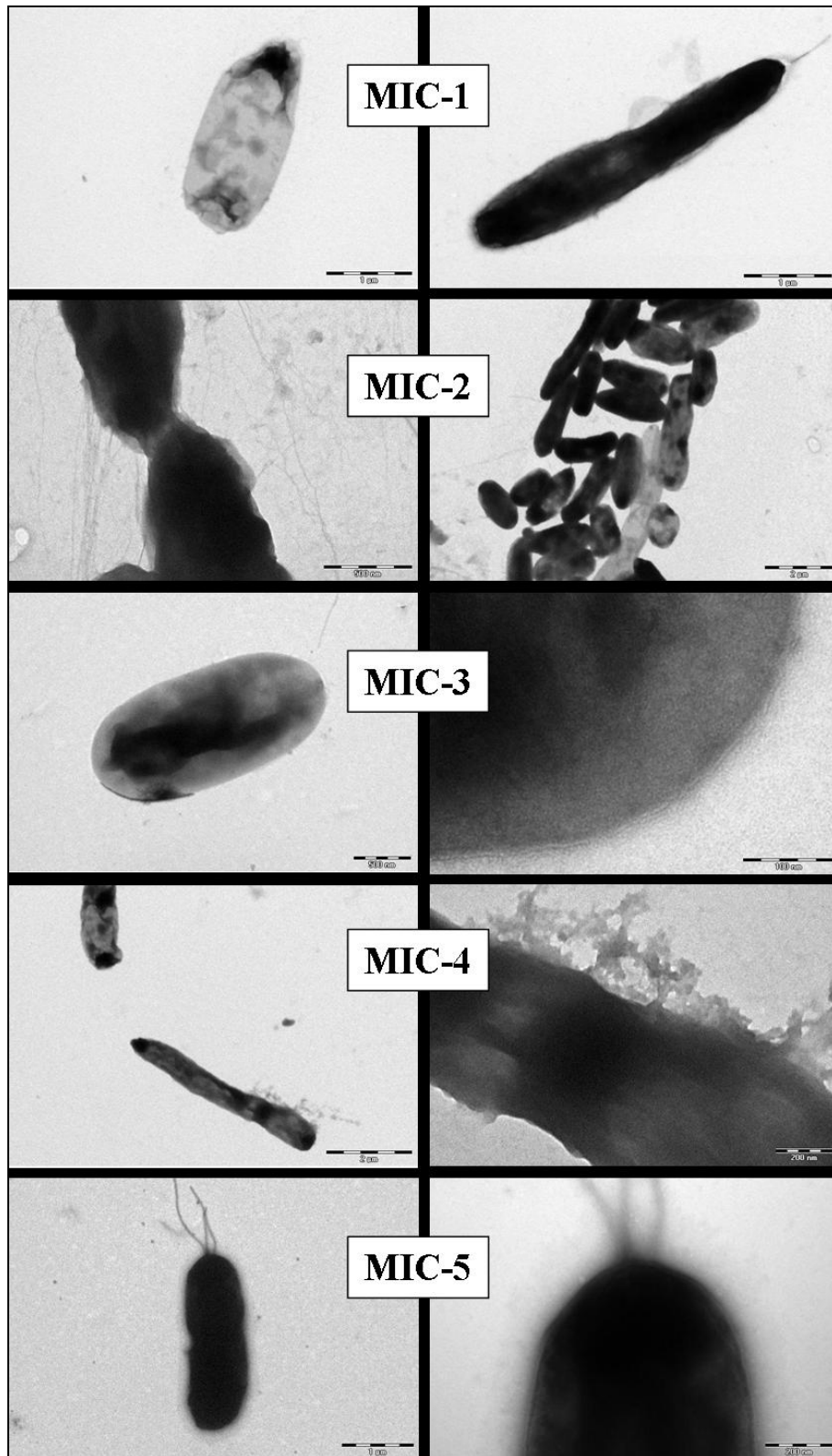


FIGURA 5.25. *Micrografías electrónicas de transmisión mediante la técnica de tinción negativa. MIC-1) Inóculo; MIC-2) Matraz, sin Tween® 80; MIC-3) Matraz, con Tween® 80; MIC-4) Biorreactor, 200 rpm, 1 L_{aire}/min, sin Tween® 80; MIC-5) Biorreactor, 200 rpm, 1 L_{aire}/min, con Tween® 80*

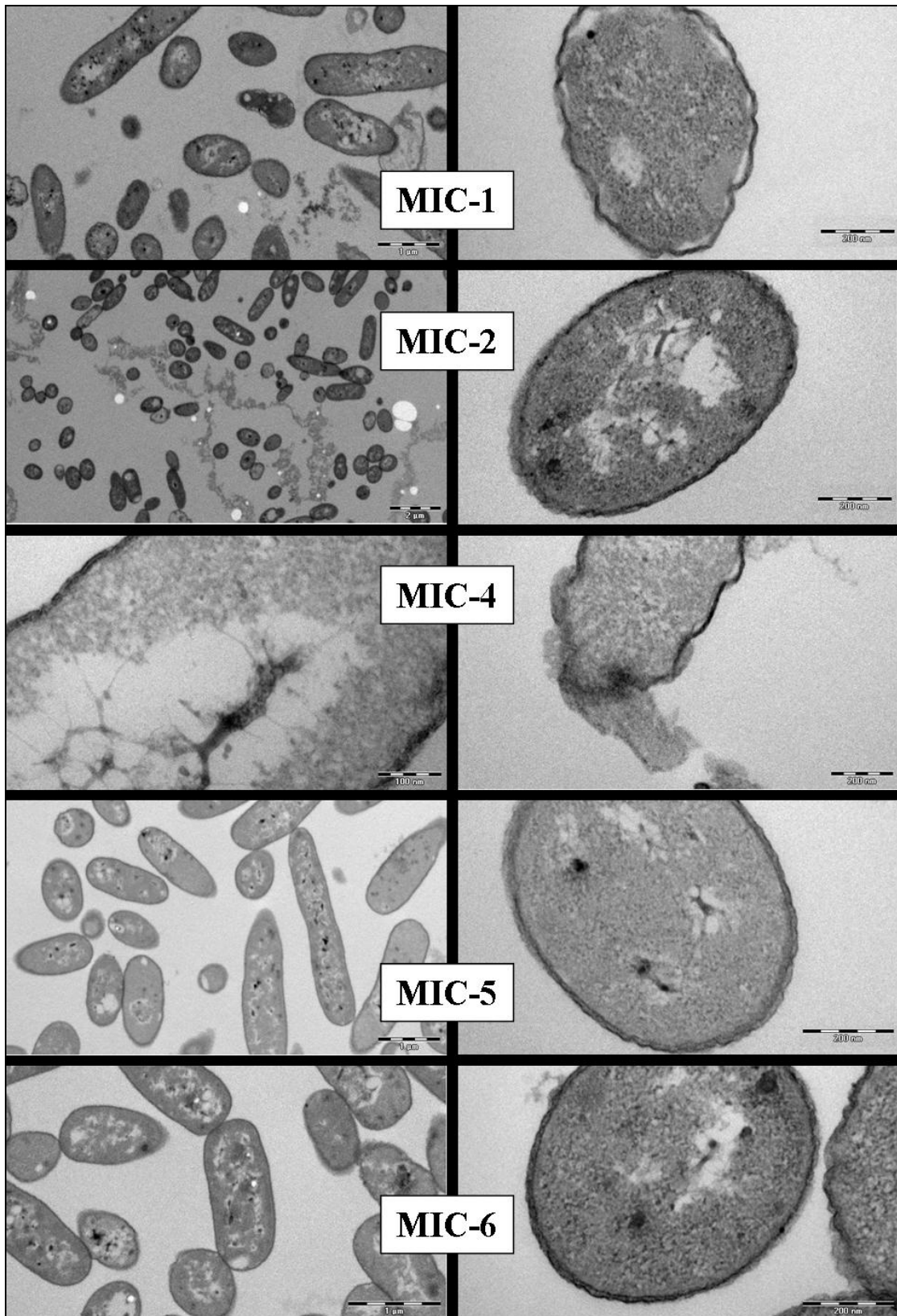


FIGURA 5.26. Micrografías electrónicas de transmisión mediante la técnica de cortes ultrafinos. MIC-1) Inóculo; MIC-2) Matraz, sin Tween® 80; MIC-4) Biorreactor, 200 rpm, 1 L_{aire}/min , sin Tween® 80; MIC-5) Biorreactor, 200 rpm, 1 L_{aire}/min , con Tween® 80; MIC-6) Biorreactor, 400 rpm, 2 L_{aire}/min , con Tween® 80

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abrardi, V.; Rover, G.; Sicardi, S.; Baldi, G. y Conti, R. (1988). Sparged vessels agitated by multiple turbines. *Proc. Eur. Conf. Mix.* 6, 329-336.
- Allison, D.G.; Brown, M.R.W.; Evans, D.E. y Gilbert, P. (1990). Surface hydrophobicity and dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *FEMS Microbiol. Let.* 71, 101-104.
- Auerbach, I.D.; Sorensen, C.; Hansma, H.G. y Holden, P.A. (2000). Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 3809-3815.
- Bhavaraju, S.M.; Russell, T.W.F. y Blanch, H.W. (1978). The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *AIChE. J.* 24, 454-466.
- Billet, R. y Schultes, M. (1993). Predicting mass transfer in packed columns. *Chem. Eng. Technol.* 16, 1-9.
- Boltes, K.; Alonso del Águila, R. y García-Calvo, E. (2013). Effect of mass transfer on biodesulfurization kinetics of alkylated forms of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida* CECT5279. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 422-431.
- Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2011). Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochem.* 46, 1323-1328.
- Celik, G.Y.; Aslim, B. y Beyatli, Y. (2008). Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydr. Polim.* 73, 178-182.
- Escobar, S. (2013). *Estudio del estrés hidrodinámico en bacterias*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Feng, J.; Zeng, Y.; Ma, C.; Cai, X.; Zhang, Q.; Tong, M.; Yu, B. y Xu, P. (2006). The surfactant Tween 80 enhances biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7390-7393.
- García-Calvo, E. (1989). A fluid dynamic model for airlift reactors. *Chem. Eng. Sci.* 44, 321-323.

- García-Ochoa, F. y Gómez, E. (2004). Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* 59, 2489-2501.
- García-Ochoa, F.; Gómez, E.; Alcon, A. y Santos, V.E. (2012). The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst.* DOI 10.1007/s00449-012-025-y.
- Gómez, E.; Santos, V.E.; Alcon, A.; Martín, A.B. y García-Ochoa, F. (2006). Oxygen-uptake and mass-transfer rates on the growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy Fuels.* 20, 1565-1571.
- Hernández, C. (2005). *Desulfuración de dibenzotiofeno con Rhodococcus erythropolis IGTS8*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Hou, Y.; Kong, Y.; Jinrong, Y.; Zhang, J.; Shi, D. y Xin, W. (2005). Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1. *Fuel.* 84, 1975-1979.
- Kawase, Y.; Halard, B. y Moo-Young, M. (1987). Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for newtonian and non-newtonian fluids. *Chem. Eng. Sci.* 42, 1609-1617.
- Kawase, Y. y Hashiguchi, N. (1996). Gas-liquid mass transfer in external-loop airlift columns with newtonian and non-newtonian fluids. *Chem. Eng. J. Bioch. Eng.* 62, 35-42.
- Kobayashi, M.; Horiuchi, K.; Yoshikawa, O.; Hirasawa, K.; Ishii, Y.; Fujino, K.; Sugiyama, H. y Maruhashi, K. (2001). Kinetic analysis of microbial desulfurization of model and Light gas oils containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 298-304.
- Kolmogorov, A.N. (1962). A refinement of previous hypotheses concerning the local structure of turbulence in a viscous incompressible fluid at high Reynolds number. *J. Fluid. Mech.* 13, 82-85.

- Kudrewizki, F. y Rabe, P. (1986). Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* 41, 2247-2252.
- Lin, X.; Liu, J.; Zhu, F.; Wei, X.; Li, Q. y Luo, M. (2012). Enhancement of biodesulfurization by *Pseudomonas delafieldii* in a ceramic microsparging aeration system. *Biotechnol. Lett.* 34, 1029-1032.
- Maghsoudi, S.; Vossoughi, M.; Kheiriloom, A.; Tanaka, E. y Katoh, S. (2001). Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem. Eng. J.* 8, 151-156.
- McEwen, G.D.; Wu, Y. y Zhou, A. (2010). Probing nanostructures of bacterial extracellular polymeric substances (EPS) versus culture time by raman microspectroscopy and atomic force microscopy. *Biopolymers.* 93, 171-177.
- Michel, B.J. y Miller, S.A. (1962). Power requirements of gas-liquid agitated systems. *AIChE. J.* 8, 262-267.
- Schilling, B.M.; Alvarez, L.M.; Wang, D.I.C. y Cooney, C.L. (2002). Continuous desulfurization of dibenzothiophene with *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968). *Biotechnol. Prog.* 18, 1207-1213.
- Tobajas, M.; Garcia-Calvo, E.; Siegel, M.H. y Aplitz, S.E. (1999). Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chem. Eng. Sci.* 54, 5347-5354.
- Wang, M.; Li, W.; Shi, Y.; Wang, D. y Feng, H. (2006). Effects of surfactants on biodesulfurization by *Corynebacterium* sp. ZD-1 in the presence of organic phase. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE A.* 7, 371-375.
- Yang, J.Z.; Hu, Y.; Zhao, D.; Wang, S.; Lau, P.C. y Marison, I.W. (2007). Two-layer continuous process design for the biodesulfurization of two diesel oils under bacterial growth conditions. *Biochem. Eng.* 37, 212-218.

6. RESUMEN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

**CAPÍTULO 6.- RESUMEN, CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

Indice

6.1.	<i>RESUMEN</i>	279
6.2.	<i>CONCLUSIONES</i>	284
6.3.	<i>RECOMENDACIONES</i>	289

CAPÍTULO 6

RESUMEN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se realiza un resumen del trabajo descrito en esta Memoria, se presentan las principales conclusiones derivadas del mismo, y se plantean ciertas recomendaciones para seguir avanzando en el desarrollo del proceso.

6.1. RESUMEN

Las necesidades energéticas de la población mundial actual aumentan año a año. En 2011, el 85 % del consumo energético se obtuvo de combustibles fósiles, y no parece probable que en un futuro próximo finalice la dependencia de estos combustibles.

Debido a su origen biológico, los combustibles fósiles tienen una composición muy compleja, incluyendo diferentes compuestos azufrados, por lo que una de las consecuencias derivadas del alto consumo de combustibles fósiles es la emisión de importantes cantidades de óxidos de azufre a la atmósfera. El principal efecto de las emisiones de óxidos de azufre es la formación de lluvia ácida, fenómeno que causa deterioros tanto en los ecosistemas como en los materiales. La salud humana también se ve afectada por dichas emisiones, produciéndose daños cardiopulmonares de carácter acumulativo. Debido a los problemas citados, el contenido en azufre en la gasolina y el gas-óleo está siendo limitado a unas concentraciones cada vez menores, siendo la tendencia actual a fijar unos niveles de azufre inferiores a 50 ppm, incluso llegando a niveles de 10 ppm.

De las diferentes tecnologías desarrolladas para la reducción en origen del contenido de azufre en los combustibles fósiles, la hidrosulfuración (HDS) es la más empleada en la actualidad. Se trata de una hidrogenación catalítica a alta presión (10-15 atm) y temperatura (200-450 °C) que conlleva un elevado consumo energético y puede producir cambios en la estructura de los combustibles. Además, existen algunos compuestos azufrados que son recalcitrantes a la HDS, como el tiofeno y sus derivados. Debido a estas limitaciones, hay varias tecnologías que se están proponiendo como complemento a una primera etapa de HDS menos agresiva. Entre estas tecnologías se encuentra la biodesulfuración (BDS), que consiste en el empleo de organismos vivos o partes de ellos para la eliminación de azufre. Debido a la alta selectividad de los microorganismos y a los bajos requerimientos energéticos necesarios, la BDS es una de las tecnologías más prometedoras para la producción de combustibles fósiles con bajo contenido en azufre.

El compuesto modelo en los estudios de desulfuración es el dibenzotiofeno (DBT), por ser una molécula representativa del conjunto de compuestos recalcitrantes a la HDS. La ruta metabólica más empleada para el estudio de la biodesulfuración es la denominada ruta 4S, hallada de forma natural en la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Se trata de una ruta aerobia no destructiva que consta de cuatro reacciones en serie, mediante las cuales la molécula de DBT se transforma en un compuesto libre de azufre, el 2-hidroxibifenilo (HBP).

En este trabajo se ha empleado como biocatalizador la bacteria *Pseudomonas putida* KTH2, se trata de un organismo modificado genéticamente en el departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) que porta los genes *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y el gen *hpaC* de *Escherichia coli* W. Todo el estudio de biodesulfuración realizado en el presente trabajo se ha llevado a cabo en condiciones de *resting cells*.

El trabajo realizado en la presente Memoria se inicia a partir de los conocimientos previos del proceso de biodesulfuración obtenidos por el grupo de investigación. Estos trabajos previos demostraron que los resultados de una operación en *resting cells* son muy superiores a los que se obtienen en *crecimiento*. La capacidad desulfurante en *resting cells* del biocatalizador depende del tiempo de crecimiento de las células. Esta dependencia se debe a que la actividad de cada una de las enzimas de la ruta 4S presenta un máximo a una edad de crecimiento determinada. Debido a este comportamiento, se pudo formular un biocatalizador optimizado mezclando células de

distintas edades celulares, para las que la actividad de cada enzima es máxima. Para predecir la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S se desarrolló un modelo cinético cuyos parámetros son diferentes para cada edad celular. Suponiendo un comportamiento aditivo de la mezcla de células, es posible simular un proceso realizado empleando dicha mezcla óptima a partir del comportamiento de cada edad celular por separado. Dicho modelo cinético incluye un término de desactivación enzimática para explicar la ralentización de las reacciones implicadas en la ruta 4S con el tiempo.

El punto de partida del presente trabajo es el estudio de la influencia del tiempo de operación en el proceso de biodesulfuración. Para ello, se estudió el proceso en *fed-batch*, realizando sucesivas adiciones de DBT al medio, empleando la mezcla óptima como biocatalizador. El análisis de la evolución de los compuestos de la ruta 4S informa sobre una clara desaceleración del proceso con el tiempo, fundamentalmente en la última reacción de la ruta 4S, comportamiento similar al observado cuando se emplean células de una misma edad de crecimiento. La aplicación del modelo cinético previamente desarrollado a partir de los datos experimentales obtenidos en *batch* para simular el proceso en *fed-batch* fue, sin embargo, insatisfactoria.

En las tres primeras reacciones de la ruta 4S interviene un compuesto que no lo hace en la cuarta y última reacción, NADH. Debido al diferente comportamiento que presenta la cuarta reacción respecto de las demás, al realizar el proceso en *fed-batch*, se propuso analizar la evolución de la concentración intracelular de NADH y su introducción en el modelo cinético. Los resultados mostraron una disminución en la concentración de NADH con el tiempo. Al introducir dicha concentración en las ecuaciones cinéticas correspondientes a las tres primeras reacciones de la ruta 4S, se obtuvo un modelo capaz de simular correctamente el comportamiento de la mezcla celular, tanto en *batch*, como en *fed-batch*, así como de predecir el comportamiento del proceso al emplear células de una sola edad como biocatalizador.

El siguiente paso en el desarrollo del presente trabajo trata de aumentar la capacidad desulfurante del biocatalizador, eliminando, o minimizando, la ralentización observada en las velocidades de reacción. Como se ha descrito anteriormente, la concentración de NADH disminuye con el tiempo de operación, dicha disminución puede estar asociada al agotamiento de otros cofactores esenciales, tales como ATP, y estar implicada en la desaceleración de las reacciones. Uno de los posibles mecanismos que pueden emplearse para regenerar cofactores es el empleo de cosustratos. Dichos

cosustratos pueden favorecer la formación de cofactores al introducirse en determinadas rutas metabólicas.

El estudio de la adición de cosustratos comenzó con la elección de posibles compuestos. Se optó por el empleo de ácidos orgánicos de cadena corta, involucrados de alguna manera en el ciclo de Krebs (ácidos acético, cítrico y succínico). En primer lugar, se realizó un estudio empleando diferentes concentraciones de cosustrato en procesos de biodesulfuración catalizados por células de distintas edades celulares, determinándose así una concentración óptima. Una vez determinada la concentración de cosustratos que maximiza el rendimiento del proceso, se procedió a estudiar el efecto de los cosustratos a lo largo de la biodesulfuración en diferentes condiciones de composición de biocatalizador y formas de operación. El compuesto con el que se obtuvieron los mejores resultados fue ácido acético con una concentración de 15 g/L.

Una vez determinado el cosustrato que proporciona unos mejores resultados, cuantificados por la capacidad desulfurante, se pasó a estudiar el mecanismo de acción de dicho compuesto. En primer lugar, se estudió su efecto sobre cada una de las reacciones de la ruta 4S individualmente. Los resultados mostraron que todas las velocidades de reacción aumentaron al añadir ácido acético al medio; sin embargo, fue la cuarta reacción (correspondiente a la transformación de HBPS en HBP) en la que se observó un aumento más significativo. Dicho aumento se vio confirmado al emplear distintas concentraciones de HBPS como sustrato azufrado inicial.

A continuación, se cuantificaron las concentraciones intracelulares de NADH y ATP para comprobar si el cosustrato ejerce el efecto previsto de aumentar su disponibilidad. Los resultados confirmaron dicha hipótesis, obteniéndose unas mayores concentraciones intracelulares de ambos compuestos al emplear ácido acético en el medio. Dichos metabolitos deben ser producidos por la propia célula, puesto que una serie de experimentos en los que se añadió al medio de reacción tanto ATP como NADH no produjeron la mejoría de la capacidad desulfurante observada al añadir ácido acético al medio.

Para la descripción cinética del proceso de desulfuración llevado a cabo en presencia de ácido acético como cosustrato, se realizó una modificación del modelo cinético propuesto anteriormente. Se introdujo la concentración del compuesto ATP en la ecuación cinética correspondiente a la cuarta reacción de la ruta 4S. El empleo de dicho modelo cinético permitió predecir correctamente la evolución de los compuestos de la ruta 4S al emplear células de 5 y de 23 horas de crecimiento como biocatalizador,

así como simular el comportamiento de la mezcla celular (compuesta por células de ambas edades), tanto en *batch*, como en *fed-batch*.

En el último capítulo del presente trabajo se realiza un estudio del proceso de biodesulfuración a escala de biorreactor. Los estudios encontrados en la literatura sobre el proceso de biodesulfuración en biorreactor no son abundantes y, además, no se ha realizado un análisis completo de los factores que afectan al proceso a esta escala.

Debido a los problemas de biodisponibilidad presentados por el compuesto inicial de la ruta 4S, DBT, se realizó un estudio preliminar sobre la adición de un surfactante, Tween® 80, que permite aumentar la disponibilidad de DBT en fase acuosa. Se determinó una concentración óptima de dicho surfactante para ser empleada en los experimentos de desulfuración en biorreactor.

El microorganismo empleado en el presente trabajo es de naturaleza aeróbica. De la misma manera, la ruta 4S necesita oxígeno para su progreso. Todas las reacciones bioquímicas en las que se vea implicado el oxígeno van a ser directamente afectadas por su disponibilidad en el medio. Debido a que los factores que más afectan a la disponibilidad de oxígeno en un biorreactor son las condiciones fluidodinámicas, establecidas en un tanque agitado por la aireación y la agitación, se realizó un estudio sobre cómo afectan dichas condiciones a la capacidad desulfurante.

En primer lugar, se estudió el efecto de la velocidad de agitación; se encontró que la capacidad desulfurante aumenta con la velocidad de agitación hasta alcanzar su valor máximo a 400 rpm, momento a partir del cual la velocidad y capacidad de desulfuración se ven afectadas negativamente. En el estudio del caudal de aireación se obtuvieron unos resultados similares, la capacidad desulfurante presenta un máximo al introducir aire a 2 L/L·min. El empleo de oxígeno puro como gas de aireación produjo un empeoramiento en el desarrollo del proceso.

En todos los experimentos realizados en biorreactor, el oxígeno disuelto se consumió totalmente. Este comportamiento implica que, en ausencia de crecimiento, el microorganismo consume todo el oxígeno que se le transporta al medio. Para cuantificar dicho comportamiento, se determinaron las velocidades de transporte de oxígeno (*OTR*, *Oxygen Transfer Rate*) y de consumo (*OUR*, *Oxygen Uptake Rate*), así como el consumo de oxígeno teórico necesario para las reacciones de desulfuración. Los resultados mostraron que el consumo estequiométrico debido a la ruta 4S puede considerarse despreciable en comparación con el consumo de oxígeno metabólico.

Uno de los criterios de cambio de escala más empleados consiste en mantener constante el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_La . Se estimó el valor de k_La al realizar la BDS en matraz *Erlenmeyer* para las condiciones de operación empleadas en el presente trabajo. El valor obtenido es muy similar al calculado para el proceso de BDS en biorreactor en las mejores condiciones fluidodinámicas (velocidad de agitación de 400 rpm; caudal de aireación de 2 L/min). De esta manera, se comprobó la validez del criterio de cambio de escala mencionado anteriormente.

Se observó que la adición de ácido acético al medio de desulfuración provoca la formación de agregados al llevar a cabo el proceso en matraz *Erlenmeyer*, pero no así al hacerlo en un biorreactor tipo tanque agitado, debido a las condiciones fluidodinámicas del sistema. Estos agregados parecen formarse por la secreción de alguna sustancia, de naturaleza hidrofóbica, por lo que estos compuestos extracelulares ayudan a aumentar la biodisponibilidad de DBT. La adición de Tween® 80 al medio de desulfuración evita la formación de los agregados; sin embargo, al aumentar la biodisponibilidad de DBT por su naturaleza surfactante, este compuesto es adecuado para ser empleado en el proceso de BDS en biorreactor.

6.2. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas del presente trabajo son las siguientes:

Respecto a la BDS en resting cells empleando células de distinta edad (5 y 23 horas)

1.- Se observa una ralentización de todas las reacciones con el tiempo, en especial la formación de HBP, que prácticamente se detiene a partir de los 90 minutos, lo que se traduce en una acumulación de HBPS.

2.- El empleo de una mezcla celular formada por 0,7 g/L de células de 5 horas de edad y 1,4 g/L de células de 23 horas de edad proporciona mejores resultados que el empleo de 2,1 g/L de células de cada una de las edades individualmente. En el caso de utilizar la mezcla celular, se alcanza la conversión completa a HBP en 90 minutos, empleando células de 23 horas la conversión completa se consigue en 180 minutos, mientras que al emplear células de 5 horas de edad se alcanza una conversión del 82 % a los 180 minutos de reacción. Al llevar a cabo el proceso de desulfuración en *fed-*

batch, empleando la mezcla celular como biocatalizador, se observa que, al ir realizando adiciones de DBT, la cuarta reacción se va ralentizando hasta casi detenerse, lo que se traduce en una disminución de la cantidad de HBP producido en cada ciclo de adición de DBT, y en una acumulación de HBPS.

Respecto a la formulación de un modelo cinético empírico

3.- Se ha empleado un modelo cinético previamente propuesto por el grupo de investigación que describe correctamente la evolución de los compuestos implicados en la ruta 4S. Para ello, se ha considerado la pérdida de actividad que pueden sufrir las enzimas DszA, DszB y DszC durante el tiempo de operación, y la concentración de células de 5 horas y de 23 horas que participan como biocatalizador. Para la determinación de los parámetros cinéticos se han empleado datos experimentales obtenidos con biocatalizadores de 5 y 23 horas de edad celular. Las ecuaciones cinéticas, así como los valores óptimos de los parámetros cinéticos, se muestran a continuación:

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = - \frac{k_1' \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = \frac{k_1' \cdot \exp(-s_1 \cdot t) \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X - \frac{k_2' \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X$$

$$\frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = \frac{k_2' \cdot \exp(-s_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X - \frac{k_3' \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X$$

$$\frac{dC_{HBPS}}{dt} = \frac{k_3' \cdot \exp(-s_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X - \frac{k_4' \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K_I' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \frac{k_4' \cdot \exp(-s_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS}}{1 + K_I' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X$$

Parámetro	Células de 5 horas		Células de 23 horas	
	Valor	Intervalo confianza	Valor	Intervalo confianza
$k'_{1 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	1,13·10 ⁻¹	2,94·10 ⁻³	1,68·10 ⁻¹	5,55·10 ⁻³
$s_{1 5h}$ (min ⁻¹)	2,89·10 ⁻³	1,00·10 ⁻³	7,96·10 ⁻³	1,71·10 ⁻³
$k'_{2 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	2,14·10 ⁻¹	1,25·10 ⁻²	4,95·10 ⁻¹	3,81·10 ⁻²
$s_{2 5h}$ (min ⁻¹)	1,17·10 ⁻³	1,48·10 ⁻⁴	1,57·10 ⁻²	2,35·10 ⁻³
$k'_{3 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	9,74·10 ⁻²	5,95·10 ⁻³	1,86·10 ⁻¹	1,36·10 ⁻²
$s_{3 5h}$ (min ⁻¹)	8,69·10 ⁻³	7,73·10 ⁻⁴	1,00·10 ⁻²	1,43·10 ⁻³
$k'_{4 5h}$ (L·min ⁻¹ ·g _x ⁻¹)	5,57·10 ⁻¹	1,30·10 ⁻¹	3,25·10 ⁻¹	3,76·10 ⁻²
$s_{4 5h}$ (min ⁻¹)	3,96·10 ⁻²	3,58·10 ⁻³	2,60·10 ⁻²	1,74·10 ⁻³

4.- Mediante el modelo cinético previamente determinado, y asumiendo un comportamiento aditivo de la mezcla celular, se ha simulado la evolución de las concentraciones de los compuestos de la ruta 4S obtenida al llevar a cabo la desulfuración con biocatalizadores formados por mezclas de células de 5 y 23 horas. Se obtuvo una simulación correcta del proceso operando en *batch*. Sin embargo, al realizar el proceso *fed-batch* se observa que la simulación se desvía de los datos experimentales a partir del tercer *batch*. La incorporación del término de desactivación en las ecuaciones cinéticas en forma de exponencial decreciente con el tiempo hace que, con el transcurso de la reacción, este término vaya tomando valores cada vez más pequeños, haciendo que la velocidad de producción de cada uno de los compuestos disminuya progresivamente hasta casi detenerse. Sin embargo, la evolución de los datos experimentales es distinta, ya que la última reacción se ve mucho más afectada en el transcurso del proceso que las demás.

Respecto al empleo de cosustratos en el proceso de biodesulfuración

5.- Se han estudiado tres cosustratos distintos (ácido acético, ácido cítrico y ácido succínico) para aumentar la capacidad desulfurante del biocatalizador mediante la regeneración de metabolitos tales como ATP y NADH y el aumento de su concentración intracelular. Independientemente del compuesto empleado, la concentración de cosustrato que proporciona una mayor mejora del proceso es 15 g/L.

Al realizar el proceso de desulfuración empleando la mezcla celular óptima en *fed-batch*, añadiendo 15 g/L del cosustrato correspondiente, se observó que los mejores resultados se obtuvieron empleando **ácido acético**, llegando a obtener el doble de producto final, HBP, tras cuatro ciclos de adición de DBT, que al no emplear cosustrato. El efecto de la adición de ácido acético sobre las velocidades de reacción de la ruta 4S muestra que la reacción que más se ve afectada es la cuarta, correspondiente a la transformación de HBPS en HBP. Respecto a la concentración intracelular de ATP y NADH, ambos metabolitos aumentan su concentración al emplearse ácido acético como cosustrato del proceso de biodesulfuración.

Respecto a la formulación de un modelo cinético que incorpora la concentración intracelular de cofactores (ATP y NADH)

6.- Para la descripción cinética del proceso de desulfuración empleando ácido acético se empleó una modificación del modelo cinético propuesto anteriormente. Se sustituyeron los términos de desactivación enzimática de las cuatro reacciones (un término del tipo: $\exp(-s_i \cdot t)$) por las concentraciones de NADH, en las tres primeras reacciones, y de ATP, en la cuarta reacción. El empleo de este modelo cinético permitió describir correctamente el proceso de biodesulfuración en *resting cells* empleando células de 5 y de 23 horas de edad como biocatalizadores. Asimismo, este modelo, asumiendo un efecto aditivo, describe bien los resultados obtenidos con la mezcla óptima de células de 5 y 23 horas de tiempo de crecimiento tanto en *batch*, como en *fed-batch*. Las ecuaciones cinéticas, así como los parámetros cinéticos obtenidos se muestran a continuación:

$$r_1 = \frac{k_1' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBT}}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \cdot C_X$$

$$r_2 = \frac{k_2' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO}}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \cdot C_X$$

$$r_3 = \frac{k_3' \cdot C_{NADH} \cdot C_{DBTO_2}}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \cdot C_X$$

$$r_4 = \frac{k_4'' \cdot C_{ATP} \cdot C_{HBPS}}{1 + K_1' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \cdot C_X$$

Parámetro	Células de 5 horas		Células de 23 horas	
	Valor	Intervalo confianza	Valor	Intervalo confianza
$k'_{1 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$8,30 \cdot 10^{-2}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$	$1,39 \cdot 10^{-1}$	$4,90 \cdot 10^{-3}$
$k'_{2 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$1,65 \cdot 10^{-1}$	$6,82 \cdot 10^{-3}$	$4,37 \cdot 10^{-1}$	$5,92 \cdot 10^{-2}$
$k'_{3 5h} \left(\frac{L^2}{\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$6,13 \cdot 10^{-2}$	$1,93 \cdot 10^{-3}$	$2,38 \cdot 10^{-1}$	$2,80 \cdot 10^{-2}$
$k''_{4 5h} \left(\frac{L^2}{\text{nmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{min}} \right)$	$3,06 \cdot 10^{-3}$	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$3,77 \cdot 10^{-3}$	$1,02 \cdot 10^{-3}$

Respecto a la BDS en resting cells en biorreactor

7.- Al llevar a cabo el proceso de biodesulfuración en *resting cells* en un biorreactor de 1 L se observó un comportamiento diferente al observado cuando el proceso se realiza en matraz *Erlenmeyer*. La concentración de DBT disponible en el medio es menor a la añadida inicialmente (7,35 μM frente a 25 μM). Para aumentar la biodisponibilidad de DBT en biorreactor se añadió una cantidad determinada del surfactante Tween® 80. Al añadir dicho surfactante, con una concentración de 5 %, se obtuvo una disponibilidad completa de DBT en el medio. Los resultados así obtenidos en biorreactor presentaron diferencias respecto a los obtenidos en matraz *Erlenmeyer*. Se obtuvo un rendimiento a HBP a los 180 minutos del 85 %, mientras que en matraz *Erlenmeyer* el rendimiento fue del 100 % en 90 minutos.

8.- Se determinaron las mejores condiciones fluidodinámicas para llevar a cabo el proceso de biodesulfuración en biorreactor. Los resultados mostraron que las mejores condiciones son: velocidad de agitación de 400 rpm; caudal de aireación de 2 $L_{\text{aire}}/\text{min}$. En estas condiciones, el rendimiento y la velocidad del proceso de BDS son similares a los obtenidos en matraz *Erlenmeyer*. En todos los experimentos de desulfuración realizados en biorreactor, el transporte de oxígeno limita su consumo. Se ha determinado, teórica y experimentalmente, que el consumo de oxígeno debido a la desulfuración es de aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que el consumo total de oxígeno. Aplicando una metodología anteriormente desarrollada para calcular los valores de velocidad de consumo (OUR) y de transporte de oxígeno (OTR), se ha determinado que el valor del coeficiente de consumo de oxígeno por mantenimiento

tiende a acercarse al valor de dicho coeficiente determinado durante el crecimiento del microorganismo (estudio realizado en un trabajo paralelo a esta Tesis Doctoral). El valor calculado del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_{La} , para el proceso de BDS en matraz *Erlenmeyer*, en las condiciones de operación empleadas, es muy similar al estimado al llevar a cabo la BDS en biorreactor en las mejores condiciones fluidodinámicas determinadas ($1,39 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ frente a $1,37 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Este hecho implica que, combinando los valores de las condiciones fluidodinámicas, uno de los criterios más empleados para el cambio de escala en bioprocesos, consistente en mantener constante el valor de k_{La} , es válido en este caso.

10.- Al realizar el proceso de desulfuración en matraz *Erlenmeyer* con ácido acético en el medio se ha observado que se producen unos agregados que hacen que aumente la disponibilidad de DBT en fase acuosa. Dichos agregados no se producen en biorreactor por las características hidrodinámicas del sistema. Mediante el estudio morfológico del cultivo se ha determinado que, al añadir ácido acético al medio, las células producen una sustancia extracelular que hace que se formen los agregados. La adición del surfactante Tween® 80 evita la formación de los agregados en matraz *Erlenmeyer*, pero al aumentar la biodisponibilidad de DBT en el medio los resultados obtenidos son similares. Al realizar el proceso en biorreactor, el surfactante, además de permitir que todo el DBT esté disponible, homogeniza la morfología celular, que se había visto afectada al llevar a cabo la biodesulfuración en ausencia de Tween® 80.

6.3. RECOMENDACIONES

A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, a continuación se comentan brevemente una serie de recomendaciones para enfocar futuras investigaciones.

Es necesario continuar estudiando el comportamiento del proceso de biodesulfuración en *resting cells* en biorreactor debido a la influencia de las condiciones de operación sobre la capacidad desulfurante de las células. Cuando las células forman agregados, se obtienen rendimientos más altos; estos agregados se forman debido a la adición de ácido acético al medio; el estudio del transporte de dicho compuesto en el microorganismo ayudará a determinar las causas de la formación de dichos agregados. Una vez determinada la composición de los agregados, pueden desarrollarse sistemas

inmovilizados que simulen en biorreactor el mismo comportamiento observado en matraz *Erlenmeyer*.

Para el desarrollo industrial del proceso de biodesulfuración es imprescindible el empleo de una fase orgánica que contenga disueltas las moléculas azufradas que deben ser desulfuradas. Debido a las limitaciones observadas en el transporte entre las fases, y a las dificultades técnicas derivadas de las operaciones de separación, el empleo de un sistema de separación por membranas se posiciona como una alternativa clara a los procesos tradicionales de mezcla directa y emulsión bifásica. En el desarrollo de este trabajo se comenzó a trabajar con diferentes membranas comerciales. Los resultados no fueron buenos, pocas membranas resistían la fase orgánica, muchas se disolvían o rompían con facilidad (por ejemplo, silicona); las menos, que eran resistentes, por ejemplo las fabricadas en polietersulfona (PES), presentan una velocidad de transporte muy baja, que no las hace utilizables a escala comercial. En la actualidad, se puede afirmar que no existen membranas comerciales que puedan satisfacer esta demanda.

NOMENCLATURA

NOMENCLATURA

General

a	Área interfacial específica (m^{-1})
A	Área del pico en cromatograma ($\text{mV}\cdot\text{min}$)
$A(\lambda)$	Absorbancia medida a λ nm de longitud de onda (UA)
a, b, b', c	Exponentes de las ecuaciones [5.12] y [5.13]
ATP	Adenosín trifosfato
b	Anchura de la pala en el agitador (m)
BDS	Biodesulfuración
BSM	Medio basal salino (<i>Basal Salt Medium</i>) empleado durante el crecimiento del microorganismo en biorreactor
BT	Benzotiofeno
C_1, C_2	Parámetros de las ecuaciones [5.12] y [5.13]
C_{ATP}	Concentración de adenosín trifosfato ($\text{nmol}\cdot\text{g}_x^{-1}$)
C_{DBT}	Concentración de dibenzotiofeno (μM)
C_{DBTO}	Concentración de dibenzotiofeno-5-óxido (μM)
C_{DBTO_2}	Concentración de dibenzotiofeno-5,5-dióxido (μM)
C_{HBP}	Concentración de 2-hidroxibifenilo (μM)
C_{HBPS}	Concentración de 2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato (μM)
C_j^0	Concentración del compuesto j a tiempo = 0
C_j^t	Concentración del compuesto j a tiempo = t
C_j^{max}	Concentración máxima del compuesto j
C_{NADH}	Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido ($\mu\text{mol}/\text{g}_x$)
C_{O_2}	Concentración de oxígeno disuelto ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

C_X	Concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
D	Diámetro del reactor (m)
d_b	Diámetro de burbuja (m)
DBT	Dibenzotiofeno
DBTO	Dibenzotiofeno-5-óxido (sulfóxido)
DBTO ₂	Dibenzotiofeno-5,5-dióxido (sulfona)
D_L	Difusividad en el líquido ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>dszABC</i>	Operón que incluye los genes <i>dszA</i> , <i>dszB</i> y <i>dszC</i> de <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8
<i>dszA</i>	Gen que codifica la proteína DszA
<i>dszB</i>	Gen que codifica la proteína DszB
<i>dszC</i>	Gen que codifica la proteína DszC
DszA	Segunda enzima monooxigenasa de la ruta 4S que cataliza la transformación de DBTO ₂ en HBPS
DszB	Enzima desulfinaasa de la ruta 4S que cataliza la transformación de HBPS en HBP
DszC	Primera enzima monooxigenasa de la ruta 4S que cataliza la transformación de DBT en DBTO, y posteriormente en DBTO ₂
DszD	Enzima flavin:NADH reductasa de <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8, que cataliza la transformación de NADH en FMNH ₂ , necesario para las tres primeras reacciones de la ruta 4S
EPS	Polímeros extracelulares
FADH ₂	Flavín adenina dinucleótido
F_F	Parámetro estadístico <i>F de Fischer</i>
FMN	Flavín mononucleótido
FMNH ₂	Flavín mononucleótido reducido
g	Constante gravitacional ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$)
GLP	Gases Licuados del Petróleo
h	Altura de la pala en el agitador
HBP	2-hidroxibifenilo
HBPS	2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfonato (sulfonato)
HDS	Hidrodesulfuración
HEPES	(N-2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico)

HpaC	Enzima flavin:NADH oxidorreductasa, presente en <i>Pseudomonas putida</i> KTH2 y procedente de <i>Escherichia coli</i> W, que cataliza la transformación de NADH en FMNH ₂ , necesario para las tres primeras reacciones de la ruta 4S
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IPTG	Isopropil-β-tiogalactopiranosido
k _i	Constante cinética de la reacción <i>i</i>
k' _i	Constante cinética que representa el cociente de k _i con K _i en cada reacción <i>i</i>
K _i	Constante cinética relacionado con la afinidad por el sustrato de cada reacción <i>i</i> (μM)
K' _i	Constante cinética cuyo valor es el inverso de K _i para cada reacción <i>i</i> (μM ⁻¹)
K _I	Constante de inhibición de la cuarta reacción por la presencia del compuesto HBP (μM)
K' _I	Constante cinética cuyo valor es el inverso de K _I (μM ⁻¹)
k _L	Coefficiente de transferencia de materia (m·s ⁻¹)
k _{L,a}	Coefficiente volumétrico de transferencia de materia (s ⁻¹)
LB	Medio de crecimiento Luria-Bertani
MBP	2-metoxibifenilo
m _{O2}	Coefficiente de mantenimiento (mol·g ⁻¹ ·s ⁻¹)
n	Número de moles
N	Número de datos
	Velocidad de agitación (rpm)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NL2SOL	Algoritmo de ajuste no lineal (<i>Non-Linear Least Squares Solver</i>)
N _p	Número de potencia
m _{O2}	Coefficiente de consumo de oxígeno por mantenimiento (mol·g ⁻¹ ·s ⁻¹)
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
OTR	Velocidad de transporte de oxígeno (<i>Oxygen Transfer Rate</i>) (mol·L ⁻¹ ·s ⁻¹)

OUR	Velocidad de consumo de oxígeno (<i>Oxygen Uptake Rate</i>) ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
P	Potencia suministrada en condiciones de aireación (W)
$P_{\text{BDS}}^{\text{max}}$	Productividad máxima (min^{-1})
P_0	Potencia suministrada en sistemas no aireados (W)
Q	Caudal de aireación ($\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
q_{O_2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
r	Matriz de velocidades de reacción
r_i	Velocidad de la reacción i ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)
R	Matriz de velocidades de producción
R_j	Velocidad de producción del compuesto j ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)
Re	Número de Reynolds
RLU	Unidades de luz relativa (<i>Relative Light Unit</i>)
S_{BDS}	Productividad específica ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
s_i	Constante de desactivación del parámetro k_i para la reacción i (min^{-1})
SRC	Suma de residuos al cuadrado
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	Tiempo (s)
t_s	Parámetro estadístico <i>t de Student</i>
t_{BDS}	Tiempo del ensayo de desulfuración en <i>resting cells</i> (min – s)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
t_e	Tiempo de exposición (s)
t_G	Tiempo de crecimiento (h)
u	Velocidad de fluctuación ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
ULSD	Diesel con muy bajo contenido en azufre (<i>Ultra Low Sulfur Diesel</i>)
V	Volumen (m^3)
V_F	Volumen del recipiente (m^3)
V_L	Volumen del líquido (m^3)
V_S	Velocidad superficial del gas ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
w	Velocidad de la pala ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
We	Número de Weber
X_{BDS}	Grado de desulfuración
$X_{\text{BDS}}^{\text{max}}$	Grado de desulfuración máximo
X_{BDS}^t	Grado de desulfuración a tiempo = t

Y_{OX}	Rendimiento de oxígeno en biomasa ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)
Y_{BDS}	Rendimiento de oxígeno en biodesulfuración ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Letras griegas

α, β	Parámetros de la ecuación [1.9] Parámetros de la ecuación [5.20]
Δ	Incremento
ε	Velocidad de disipación de energía ($\text{w}\cdot\text{kg}^{-1}$)
η	Longitud del torbellino (m)
λ	Longitud de onda (nm)
μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) Viscosidad ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
μ_G	Viscosidad del gas ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
μ_L	Viscosidad del líquido ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
μ_W	Viscosidad del agua ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
ξ	Coefficiente de resistencia
π	Número pi
ρ	Densidad ($\text{kg}\cdot\text{m}^3$)
ρ_G	Densidad del gas ($\text{kg}\cdot\text{m}^3$)
ρ_L	Densidad del líquido ($\text{kg}\cdot\text{m}^3$)
σ	Tensión superficial ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)
τ	Tensión tangencial ($\text{N}\cdot\text{m}^2$)
ν	Matriz de coeficientes estequiométricos Viscosidad cinemática ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
φ	Fracción del gas en la fase líquida, o <i>hold-up</i>
φ_v	<i>Hold-up</i> en sistemas viscosos

Subíndices

1	Relativo a la primera reacción de la ruta 4S ($\text{DBT} \rightarrow \text{DBTO}$)
2	Relativo a la segunda reacción de la ruta 4S ($\text{DBTO} \rightarrow \text{DBTO}_2$)
3	Relativo a la tercera reacción de la ruta 4S ($\text{DBTO}_2 \rightarrow \text{HBPS}$)
4	Relativo a la cuarta reacción de la ruta 4S ($\text{HBPS} \rightarrow \text{HBP}$)

5h	Relativo a células de 5 horas de edad de crecimiento
23h	Relativo a células de 23 horas de edad de crecimiento
BDS	Relativo al proceso de biodesulfuración
DBT	Relativo a dibenzotiofeno
DCW	Relativo a la masa celular seca (<i>Dry Cell Weight</i>)
DBTO	Relativo a dibenzotiofeno-5-óxido
DBTO ₂	Relativo a dibenzotiofeno-5,5-dióxido
HBP	Relativo a 2-hidroxibifenilo
HBPS	Relativo a 2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato
O ₂	Relativo a oxígeno

Superíndices

*	Relativo a las condiciones de saturación
0	Relativo a tiempo cero
90	Relativo a tiempo = 90 minutos
exp	Relativo al valor experimental
max	Relativo al valor máximo
teo	Relativo al valor teórico