

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Ingeniería Química**



**DESULFURACIÓN DE DIBENZOTIOFENO CON  
Rhodococcus erythropolis IGTS8**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Carolina Hernández del Olmo

Bajo la dirección de los Doctores:

Félix García-Ochoa Soria  
Victoria Eugenia Santos Mazorra

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2840-5**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE de MADRID**

**FACULTAD de CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO de INGENIERÍA QUÍMICA**



**Desulfuración de Dibenzotiofeno  
con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8**

**MEMORIA**

*que para optar al Grado de Doctor*

**presenta:**

***Carolina Hernández del Olmo***

Madrid, 2004

*A Valeria, mi niña, mi alegría.*

El Profesor Dr. Félix GARCÍA-OCHOA SORIA, Catedrático de Universidad de la Universidad Complutense de Madrid, y la Dra. VITORIA E. SANTOS MAZORRA, afirman haber dirigido la presente Tesis Doctoral en el Departamento 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,

D. Félix García-Ochoa Soria

Dña. Victoria E. Santos Mazorra

## ***Agradecimientos***

*Quisiera agradecer a varias personas y entidades la ayuda que me han prestado en la realización de esta Tesis Doctoral.*

*Entre ellas, y en primer lugar, a mis directores, por todo lo que me han enseñado y lo que me han transmitido durante estos años:*

*Al Dr. Félix García-Ochoa Soria, por su inmensa ayuda y enseñanza durante la realización de esta Tesis, de quien he aprendido muchísimo y a quien nunca he agradecido lo suficiente el esfuerzo realizado, especialmente en esta última etapa.*

*A la Dra. Victoria Santos Mazorra, por todos estos años, en los que me ha guiado y me ha enseñado a trabajar en el campo de la ciencia.*

*Quisiera agradecer también, por supuesto, a la Dra. Almudena Alcón Martín, su enseñanza y experiencia, que ha conseguido transmitirme con enorme cariño y paciencia infinita, gracias a las cuales este trabajo ha sido posible.*

*Al Dr. Emilio Gómez Castro, por los conocimientos que me ha proporcionado, no sólo a nivel académico, sino también en muchos otros aspectos, entre ellos su buen humor y sus preciosos consejos.*

*A Repsol-YPF, por la financiación prestada durante la primera parte de esta investigación.*

*Al Plan Nacional de I+D, que a través de su Programa de Procesos y Productos Químicos ha financiado mi beca-contrato y gran parte de la investigación realizada.*

*Al Dr. D. José Luis García y a su equipo de investigación del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) por la aportación del microorganismo utilizado, y también al grupo de investigación del Dr. Eloy García-Calvo del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Alacá de Henares por la aportación científica a este trabajo.*

*A la Dra. Aurora Santos, por su apoyo desinteresado y por facilitar mi trabajo en todo momento.*

*También quiero agradecer la ayuda de Miguel Ladero, siempre dispuesto a ayudarme, aconsejarme y a enseñarme, y como no, a arreglar el HPLC las numerosas veces que teníamos algún problema con él.*

*A Pedro Yustos, no sólo por haber sintetizado uno de los compuestos más importantes en este trabajo, sino por toda la ayuda prestada y los útiles consejos que me ha brindado durante la realización de este trabajo.*

*A Ima, a Roberto y a Sara, por los momentos que hemos compartido, los buenos y los no tan buenos. A ellos les agradezco de todo corazón la amistad y comprensión que siempre me han mostrado.*

*A Vanesa, Gema, Sergio, Esperanza, mis otros compañeros de laboratorio, por las risas y ánimos que me han dado diariamente.*

*A José Timón, por su gran ayuda en la resolución de los “problemillas técnicos”.*

*Como no, a mi amiga inseparable, Ana, con la que he compartido todos estos años, por su confianza, comprensión, amistad y ayuda. De ella es la mitad de este trabajo.*

*Por último, a mi familia: mis padres, Félix y Ángeles, que me lo han dado todo y siguen mimándome y apoyándome cada día; a mi hermano, que sabe bien lo que significa esto porque también lo está pasando; a Gabriel, porque me da fuerza en casi todo lo que hago, porque es mi motor y a la vez mi refugio; y a mi pequeña Valeria, por sus sonrisas de cada día.*

*Sin éstas y otras ayudas, este trabajo no se hubiera realizado.*

# ÍNDICE

## OBJETO y ALCANCE del TRABAJO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1.1. COMBUSTIBLES FÓSILES</b> .....	8
1.1.1. Carbón.....	8
1.1.2. Gas Natural.....	9
1.1.3. Petróleo.....	11
<b>1.2. REFINO del PETRÓLEO</b> .....	13
1.2.1. Productos de la Refinería.....	16
<b>1.3. CONTAMINACIÓN por COMBUSTIBLES</b> .....	17
<b>1.4. MÉTODOS de ELIMINACIÓN del AZUFRE</b> .....	21
1.4.1. Hidrodesulfuración.....	23
1.4.2. Desulfuración Microbiana.....	26
<b>1.5. BIODESULFURACIÓN</b> .....	27
1.5.1. Biodesulfuración de Carbón.....	27
1.5.2. Biodesulfuración de Petróleo y Fracciones Petrolíferas.....	29
1.5.3. Degradación y Desulfuración de DBT.....	30
1.5.3.1. Degradación de DBT con Ruptura de Enlace C-C.....	30
1.5.3.2. Desulfuración de DBT con Ruptura de Enlace C-S.....	34
1.5.4. La Bacteria <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	37

<b>1.6. PROCESOS INDUSTRIALES de BIODESULFURACIÓN</b> .....	40
1.6.1. Desarrollo del Proceso de BDS.....	45
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	59
<b>2.1. EQUIPOS</b> .....	59
<b>2.2. MATERIALES EMPLEADOS</b> .....	67
2.2.1. Microorganismo.....	67
2.2.2. Reactivos utilizados.....	67
2.2.2.1. <i>Síntesis de Reactivos no Comerciales</i> .....	70
2.2.3. Composición de los Medios Empleados.....	70
<b>2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	72
2.3.1. Conservación y Mantenimiento.....	73
2.3.2. Preparación del Inóculo.....	74
2.3.3. Proceso de Crecimiento.....	75
2.3.4. Análisis de la Capacidad de Desulfuración.....	76
2.3.5. Proceso de BIODESULFURACIÓN.....	77
<b>2.4. MÉTODOS de ANÁLISIS</b> .....	78
2.4.1. Análisis de Biomasa.....	78
2.4.2. Medida de la Concentración de Glucosa.....	79
2.4.3. Medida de la Concentración de Ácido Cítrico.....	80
2.4.4. Medida de la Concentración de Ácido Glutámico.....	82
2.4.5. Medida de la Concentración de Amonio.....	83
2.4.6. Medida de la Concentración de Dimetilsulfóxido.....	83



2.4.7. Medida de los Compuestos de la Ruta 4S por HPLC.....	85
2.4.8. Análisis de la morfología de las células por Microscopía Electrónica.....	88
<b>2.5. MÉTODOS MATEMÁTICOS de CÁLCULO.....</b>	<b>90</b>
<b>3. ESTUDIO del CRECIMIENTO del MICROORGANISMO.....</b>	<b>97</b>
<b>3.1. ESTUDIOS PREVIOS.....</b>	<b>102</b>
3.1.1. Preparación del Inóculo.....	102
3.1.1.1. <i>Influencia de las etapas de crecimiento en medio LB.....</i>	<i>103</i>
3.1.1.2. <i>Influencia de la concentración inicial de biomasa en medio LB.....</i>	<i>106</i>
3.1.1.3. <i>Influencia del lavado del inóculo.....</i>	<i>107</i>
3.1.2. Procedimiento Experimental Estándar.....	109
<b>3.2. ESTUDIO del MEDIO de CRECIMIENTO.....</b>	<b>114</b>
3.2.1. Estudio de la Fuente de Azufre.....	117
3.2.2. Estudio de la Fuente de Carbono.....	124
3.2.3. Estudio de la Fuente de Nitrógeno.....	128
<b>3.3. ESTUDIO de las CONDICIONES de OPERACIÓN.....</b>	<b>131</b>
3.3.1. Estudio de la Temperatura.....	132
3.3.2. Estudio del pH.....	135

<b>3.4. ESTUDIO CINÉTICO del CRECIMIENTO</b> .....	139
3.4.1. Modelo Cinético de Crecimiento.....	141
3.4.1.1. <i>Formulación del modelo</i> .....	143
3.4.1.2. <i>Ajuste de los datos experimentales</i> .....	145
3.4.1.3. <i>Análisis de los residuos</i> .....	163
3.4.2. Modelo Cinético del Desarrollo de la Capacidad Desulfurante.....	164
3.4.2.1. <i>Formulación del modelo</i> .....	165
3.4.2.2. <i>Ajuste de los datos experimentales</i> .....	166
3.4.2.3. <i>Análisis de los residuos</i> .....	183
<b>3.5. ESTUDIO del TRANSPORTE y CONSUMO de OXÍGENO</b> .....	184
3.5.1. Estudio del Consumo de Oxígeno.....	186
3.5.2. Estudio del Transporte de Oxígeno.....	190
3.5.2.1. <i>Predicción del Coeficiente Volumétrico de Transferencia de Materia</i> .....	196
3.5.2.2. <i>El Factor de Aumento, E</i> .....	203
3.5.2.3. <i>Coeficiente Volumétrico de Transferencia de Materia en presencia de Biotransformación</i> .....	209
3.5.3. Resultados Experimentales y Discusión.....	210
3.5.3.1. <i>Aplicación del Método Dinámico</i> .....	210
3.5.3.2. <i>Proceso de Crecimiento, Consumo y Transporte de Oxígeno</i> .....	223
<b>4. ESTUDIO de la BIODESULFURACIÓN de DBT</b> .....	247
<b>4.1. ESTUDIOS PREVIOS</b> .....	252
<b>4.2. ESTUDIO de las CONDICIONES de OPERACIÓN</b> .....	259
4.2.1. Influencia de la Temperatura.....	260

4.2.2. Influencia del Transporte de Oxígeno.....	261
<b>4.3. MODELO CINÉTICO de la BIODESULFURACIÓN.....</b>	<b>271</b>
4.3.1. Resultados de los Experimentos Cinéticos.....	274
4.3.2. Estudio Estequiométrico de la Ruta 4S.....	278
4.3.3. Formulación del Modelo.....	281
4.3.4. Método de las Velocidades de Reacción.....	286
4.3.4.1. Aplicación del Método Diferencial.....	286
4.3.4.2. Aplicación del Método Integral.....	296
4.3.4. Método de las Velocidades de Producción.....	308
4.3.5. Validación del Modelo.....	321
<b>5. RESUMEN y CONCLUSIONES.....</b>	<b>327</b>
5.1. RESUMEN.....	327
5.2. CONCLUSIONES.....	332
<b>6. NOMENCLATURA.....</b>	<b>341</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>349</b>

***OBJETO y ALCANCE del TRABAJO***

## **OBJETO y ALCANCE del TRABAJO**

El presente trabajo tiene como objeto el estudio de la **biodesulfuración de dibenzotiofeno** (DBT), utilizado como compuesto modelo, disuelto en fase acuosa. Se emplea para dicho proceso la bacteria *Rhodococcus erythropolis* **IGTS8**, como biocatalizador.

El DBT se considera representativo de los compuestos de azufre que quedan tras una hidrodesulfuración (HDS) convencional de una fracción petrolífera, como por ejemplo gas-óleo, por ser del tipo de compuestos que no son eliminados por HDS. El estudio se va a realizar en fase acuosa, con DBT disuelto en el medio, sin considerar la presencia de una fase orgánica (gas-óleo o un compuesto modelo), problema que se aborda en otros trabajos paralelos. El proceso se va a llevar a cabo utilizando el método de operación conocido como *resting cells* o células en reposo, por tanto, se van a abordar, de forma sistemática, las siguientes etapas en el estudio:

- **Conservación y mantenimiento** de las células de *R. erythropolis* IGTS8 para llevar a cabo el crecimiento de las mismas, desarrollando un método que asegure la reproducibilidad de los resultados.
- **Crecimiento** de dichas células, estudiando la influencia de la composición del medio empleado y de las condiciones de operación. Además, se realizará un estudio del transporte y consumo de oxígeno en el medio de crecimiento y se formulará un modelo cinético que describa dicho crecimiento, imprescindible para la posible aplicación industrial del proceso.
- **Biodesulfuración** de DBT utilizando el microorganismo en *resting cells* como biocatalizador del proceso, teniendo en cuenta las condiciones de operación. También en este caso se desarrollará un modelo cinético que describa la etapa de biodesulfuración.

Para ello, habrá que establecer **procedimientos experimentales** para llevar a cabo tanto la conservación y mantenimiento del microorganismo, como las diferentes etapas de crecimiento y biodesulfuración en condiciones de reproducibilidad, y para la medida de otros aspectos como la transferencia y consumo de oxígeno en ambos procesos, crecimiento y desulfuración.

También será necesario desarrollar **métodos analíticos** para medir las numerosas respuestas necesarias para conocer el progreso del proceso. Así, no sólo habrá que determinar cuantitativamente el crecimiento del microorganismo, sino la capacidad desulfurante que acumula durante dicho crecimiento y que luego aplica en la etapa de biodesulfuración. También habrá que determinar cuantitativamente el consumo de sustratos, tales como las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno, durante el crecimiento. Así mismo, la descripción de la ruta 4S (propuesta en la literatura y aceptada como ruta de desulfuración del microorganismo empleado) exigirá desarrollar los métodos de análisis necesarios para seguir la evolución de los distintos compuestos implicados en dicha ruta.

A continuación, empleando métodos que garanticen la reproducibilidad de los resultados en los experimentos, se realizará un **estudio de las variables** que, en principio, puedan afectar al proceso de crecimiento: composición del medio y condiciones de operación. En cuanto a la composición del medio, se tendrán en cuenta distintas fuentes de azufre, carbono y nitrógeno y, una vez elegidas unas determinadas, se estudiarán sus concentraciones. Posteriormente, se determinarán las condiciones de temperatura, pH y aireación para obtener los mejores resultados, no sólo teniendo en cuenta la concentración de biomasa, sino la capacidad desulfurante que desarrollan las células durante el crecimiento. Después se estudiará la biodesulfuración como una etapa más del proceso, determinando la influencia de las condiciones de operación, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

Una vez conocidas las condiciones necesarias para llevar a cabo el proceso, se abordará la **descripción cinética** de las diferentes etapas y fenómenos que tienen lugar: crecimiento, producción de capacidad desulfurante, evolución de la biodesulfuración, y consumo y transporte de oxígeno (gas-líquido). Se formularán, en principio, modelos cinéticos sencillos, dada la falta de información sobre este tema en la literatura, para luego acoplar las diferentes etapas y fenómenos en la descripción del proceso. Así, se describirá matemáticamente la evolución de la concentración de biomasa, de la capacidad desulfurante acumulada, de la concentración de oxígeno disuelto y de los diferentes compuestos implicados en la ruta 4S de desulfuración.

## ***1. INTRODUCCIÓN***

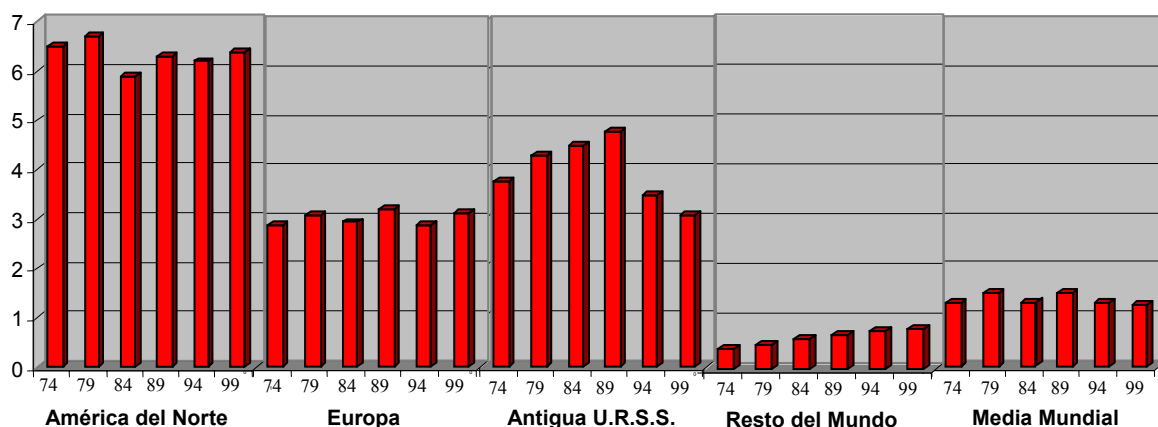


## **1. INTRODUCCIÓN**

Desde tiempos remotos, el hombre ha utilizado el esfuerzo de algunos animales domésticos para obtener energía mecánica, a lo que más tarde unió las fuerzas del viento y la energía procedente de las corrientes de agua. El aporte de energía para otras actividades se completaba con el calor obtenido por la combustión de la madera, principalmente.

Con el inicio de la Revolución Industrial en el siglo XVIII, desaparece paulativamente, en las sociedades más avanzadas, el modelo de consumo y producción imperante hasta entonces, sustituyéndose las fuentes empleadas durante milenios por otras nuevas, cuyo uso, además, se incrementa exponencialmente. De hecho, la Revolución Industrial no habría sido posible sin la sustitución de estas energías arcaicas por el carbón y, después, por los hidrocarburos y la electricidad, las cuales constituyen uno de los pilares básicos de la economía de las sociedades modernas.

El consumo de energía por habitante constituye uno de los indicadores más fiables del grado de desarrollo económico y de bienestar de una sociedad determinada. En este sentido, la demanda energética se asocia de forma generalizada con el PIB de un país, con su capacidad industrial y con el nivel de vida alcanzado por sus habitantes. En EE.UU., en el año 2000, este consumo por habitante es de 8,08 tep/hab, mientras que en Europa es de 3,10 tep/hab, siendo la media mundial de 1,64 tep/hab, cuya evolución en las últimas décadas se muestra en la Figura 1.1. Así se puede comprobar que los países de mayor consumo de energía son los que presentan mejores niveles de bienestar y desarrollo económico. Cuando un país comienza a desarrollarse, su estructura económica se caracteriza por un predominio de las actividades primarias, a las que se unen algunas artesanales, siendo su consumo energético, por tanto, bajo. Iniciado el proceso de crecimiento, la industria aumenta en importancia, al igual que los transportes, sectores que requieren gran cantidad de energía. Si a lo anterior unimos la creciente mecanización de todas las actividades, incluidas las domésticas, se hace evidente la importancia de la energía y el aumento, casi constante, de la demanda. Por otra parte, la mayor eficacia técnica de las máquinas permite reducir progresivamente el uso de la energía para iguales niveles de producción, promoviendo el ahorro energético.



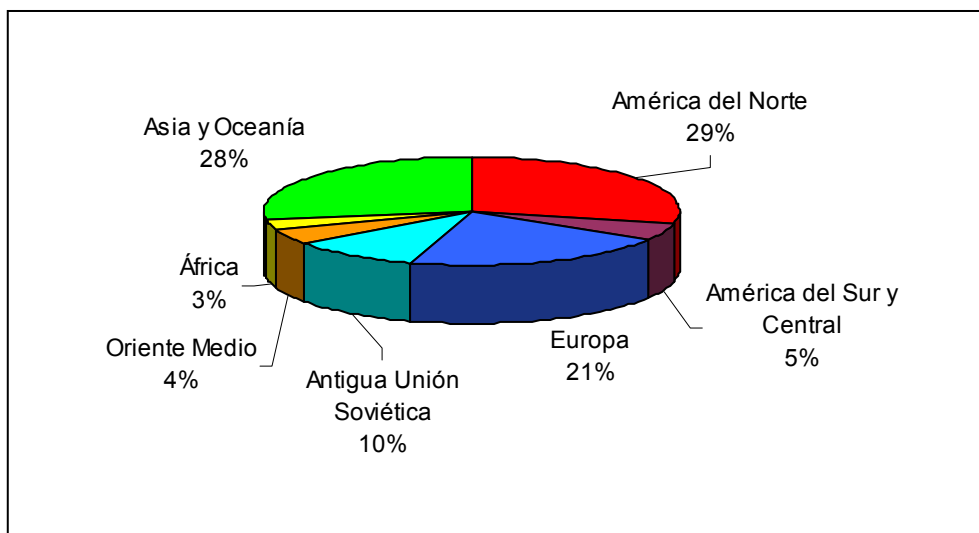
**Figura 1.1.** Evolución del consumo de energía por regiones en el mundo, expresado en tep/hab·año (datos de 2000).

Las fuentes de energía más buscadas son aquellas en que se dispone de energía concentrada (más energía por unidad de masa). Según sea su utilización, las fuentes de energía se pueden clasificar en primarias y secundarias. Las primarias son aquellas que se obtienen directamente de la naturaleza (carbón, petróleo, gas natural, nuclear, hidráulica), mientras que las secundarias se obtienen a partir de éstas mediante una transformación (electricidad, etc.).

De todas las fuentes de energía, únicamente cinco se emplean de forma masiva y por este orden en el mundo actual: petróleo, carbón, gas natural, nuclear de fisión y energía hidráulica. Éstas son las únicas que pueden responder en cantidad, calidad y precio a las necesidades energéticas de la humanidad en las condiciones y con los conocimientos actuales; pero también se emplean otras energías primarias. En los países menos desarrollados, para cubrir las necesidades domésticas, se emplean diversos tipos de biomasa, desde leña hasta residuos agrícolas. En algunos países se utilizan la energía solar y la energía eólica para obtener pequeñas cantidades de electricidad (ésta última empieza a rendir cantidades apreciables de energía, aunque a un coste mucho mayor que las cinco primeras; en Francia y Canadá existen centrales maremotrices, y en Islandia disponen de un aprovechamiento relativamente importante de los recursos geotérmicos).

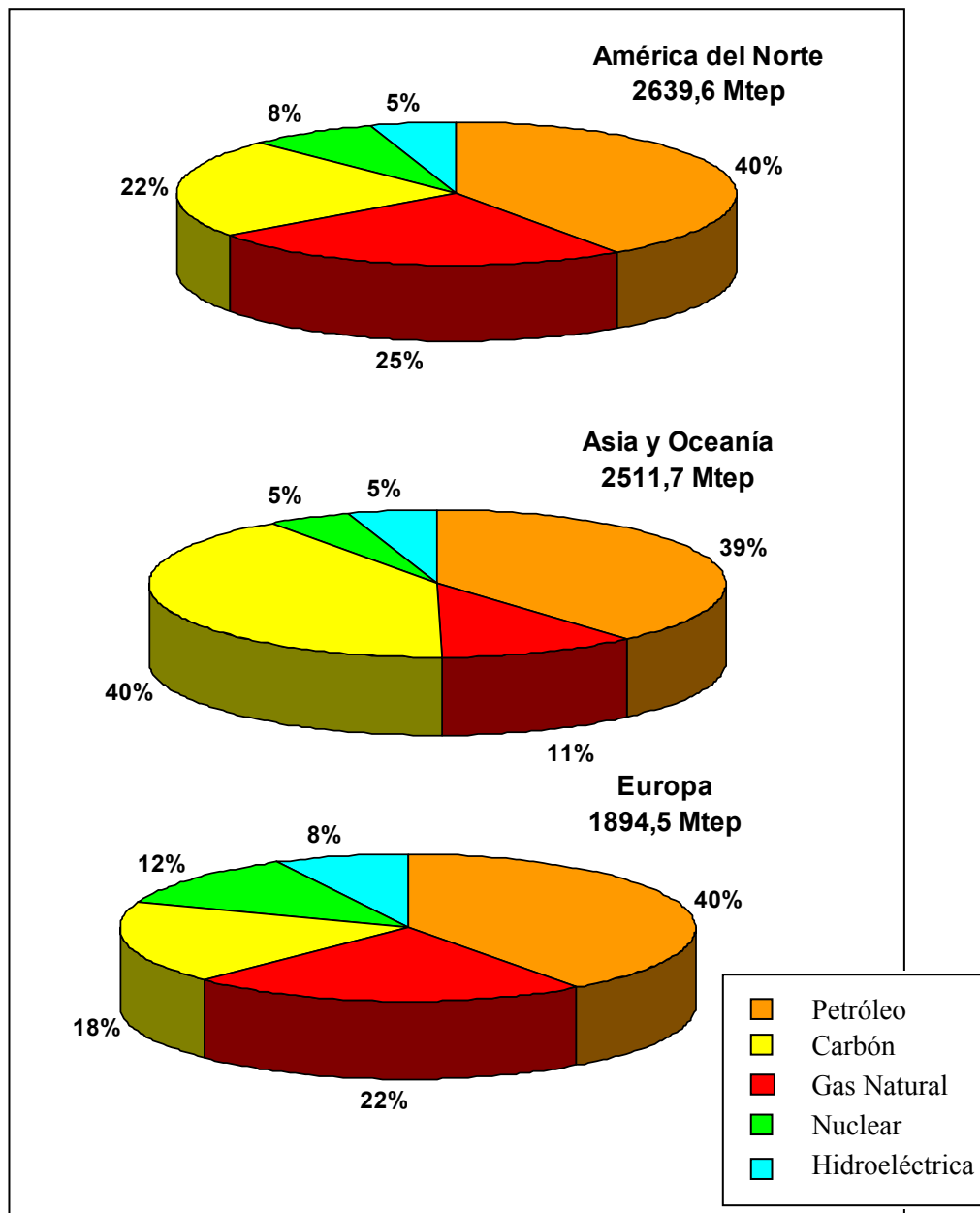
En la Figura 1.2 se muestra el consumo mundial de energía primaria desglosado por regiones. La Figura 1.3 muestra ese consumo de energía primaria desglosado por tipo de energía consumida en tres de las principales regiones del mundo. Europa Occidental, con una producción insuficiente para cubrir sus necesidades energéticas, debe importar un porcentaje significativo (40%) de lo que consume, fundamentalmente petróleo procedente de países de la OPEP. Algunos de los países de esta zona tienen, sin embargo, importantes capacidades productivas de ciertas energías primarias, por ejemplo, Alemania y Reino Unido, en carbón; Holanda, en gas natural; Noruega y Reino Unido en petróleo; Francia, España, Bélgica y Alemania, en energía nuclear. El Pacífico industrializado (Australia, Corea del Sur y Japón) es también deficitario, debido al elevado consumo de Japón. Últimamente, Australia ha surgido como un gran productor y exportador de carbón, elevando algo las cifras de la zona que, como Europa

Occidental, realiza masivas importaciones de crudo procedente de la OPEP. La desaparecida Unión Soviética ha sido el mayor estado productor de energía y el segundo en consumo, con un excedente que ha abastecido las necesidades de los países del Este de Europa y ha exportado a Occidente. La OPEP, organización o cártel exportador de petróleo, presenta un débil consumo frente a una enorme riqueza de hidrocarburos que vende, sobre todo, a los países industrializados de Occidente. América Central y del Sur, con bajos niveles de consumo y producción, presenta un superávit energético no muy relevante, pues si excluimos de la zona a Venezuela y Ecuador, integrados en la OPEP, México, gran exportador de petróleo, que no está integrado en esa organización, desnivela el saldo hacia el lado positivo.



**Figura 1.2.** Consumo de energía primaria en el mundo. Desglose por regiones (datos de 2001).

La energía primaria más utilizada en América del Norte y Europa es el petróleo, seguida por el gas natural. Sin embargo, en Asia y Oceanía, el consumo de carbón iguala prácticamente al de petróleo, siendo el consumo de gas natural muy pequeño en comparación con otras regiones del mundo.



**Figura 1.3.** Consumo de energía primaria en el mundo. Desglose por tipo de energía (datos de 2001).

## **1.1. COMBUSTIBLES FÓSILES**

La generación de energía a partir de combustibles fósiles es uno de los métodos más utilizados para producir energía en el mundo desde hace miles de años. Actualmente, los combustibles fósiles más utilizados son el petróleo, el carbón y el gas natural; la mayor parte de estos combustibles se utiliza en el transporte, la calefacción y la generación de energía eléctrica.

### **1.1.1. Carbón**

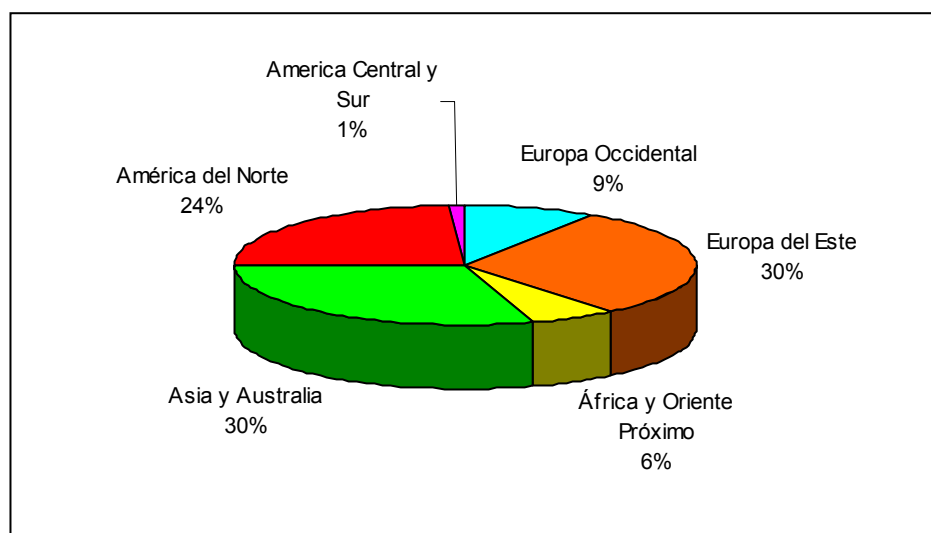
El carbón es un tipo de roca formada por moléculas complejas de alto contenido en carbono; se formó, principalmente, cuando los extensos bosques de helechos y equisetos gigantes que poblaban la Tierra hace unos 300 millones de años, en el periodo Carbonífero de la era Paleozoica, murieron y quedaron sepultados en los pantanos en que vivían. Al ser el terreno una mezcla de agua y barro muy pobre en oxígeno, no se producía la putrefacción habitual y, poco a poco, se fueron acumulando grandes cantidades de plantas muertas. Con el tiempo, nuevos sedimentos cubrieron la capa de plantas muertas y, por la acción combinada de la presión y la temperatura, la materia orgánica se fue convirtiendo en carbón. Según las presiones y temperaturas a que hayan estado sometidas, se formaron distintos tipos de carbón: turba, lignito, hulla (carbón bituminoso) y antracita. Cuanto más altas son las presiones y temperaturas, se origina un carbón más compacto y rico en carbono y con mayor poder calorífico.

El contenido en azufre, cenizas y valor energético del carbón, varía ampliamente de unos carbones a otros. En el caso del azufre, el contenido oscila entre el 0,5% y el 11%.

El carbón todavía cubre en torno al 25% de la demanda energética mundial, situándose aún como la segunda fuente de energía primaria, únicamente superada por el petróleo, pero aventajando al gas natural, a la energía nuclear y a la hidroelectricidad. Sin embargo, el carbón viene experimentando un continuo declive desde poco después de la I Guerra Mundial, retroceso interrumpido por la breve recuperación de finales de los 70 y comienzos de los 80 (debido a las “crisis

del petróleo”). Su principal empleo actual es como combustible para producir electricidad en centrales térmicas.

Las reservas estimadas de carbón son muy grandes. Según los más recientes cálculos del Consejo Mundial de la Energía son superiores al billón de toneladas, cantidad que se reparte a partes iguales entre hulla y antracita (519700 millones de toneladas) y lignito (524130 millones de toneladas). El indicador Reservas/Producción da el número de años durante los que se podría mantener un consumo como el actual bajo la hipótesis de que no se descubrieran nuevos recursos. En el caso del carbón habría recursos para más de dos siglos y medio. Las reservas mundiales de carbón se sitúan principalmente en Europa del Este, Asia y Australia, y América del Norte, como muestra la Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Distribución de reservas mundiales de carbón (%) (datos de 1999)

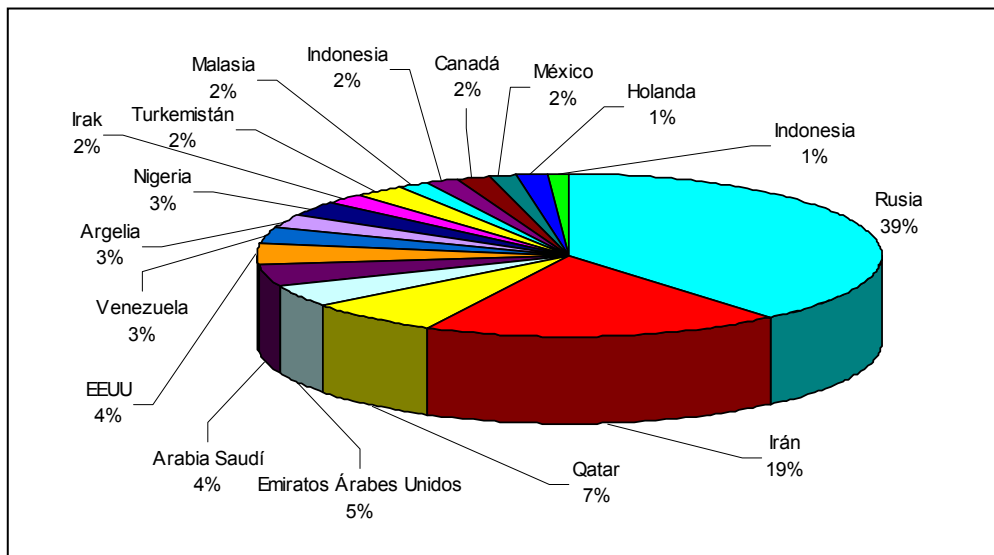
### **1.1.2. Gas Natural**

Es una de las energías primarias de utilización más reciente, puesto que hasta la segunda década del siglo XX no comenzó su comercialización en Estados Unidos, país pionero en su producción y consumo, no extendiéndose su empleo a Europa Occidental hasta después de la II Guerra Mundial, aunque su conocimiento se remonta, al menos, al comienzo de la explotación comercial del petróleo. Las razones que explican la creciente utilización del gas natural en el

mundo, en sustitución de otros combustibles, son diversas, pudiendo sintetizarse en los siguientes puntos:

- Alto poder calorífico.
- Combustión limpia, sin residuos (cenizas).
- Comodidad de utilización, lo que le hace adecuado para los consumos domésticos y comerciales.
- Mejor regulación y control del consumo.
- Versatilidad: puede reemplazar a las otras energías primarias en un 70% de sus empleos; únicamente no entra en competencia con la energía eléctrica en la iluminación y como fuerza motriz.
- Produce una menor cantidad (en torno al 30%) de CO<sub>2</sub> que los otros combustibles fósiles por unidad energética producida.

La distribución de las reservas de gas natural se distribuyen de forma muy desigual en el mundo, ya que entre Rusia (39%), el Próximo Oriente y África (41%) concentran más de las cuatro quintas partes del total mundial, como muestra la Figura 1.5, concentración mayor que la que se da en el petróleo.



**Figura 1.5.** Distribución por países de las reservas de gas natural.



### **1.1.3. Petróleo**

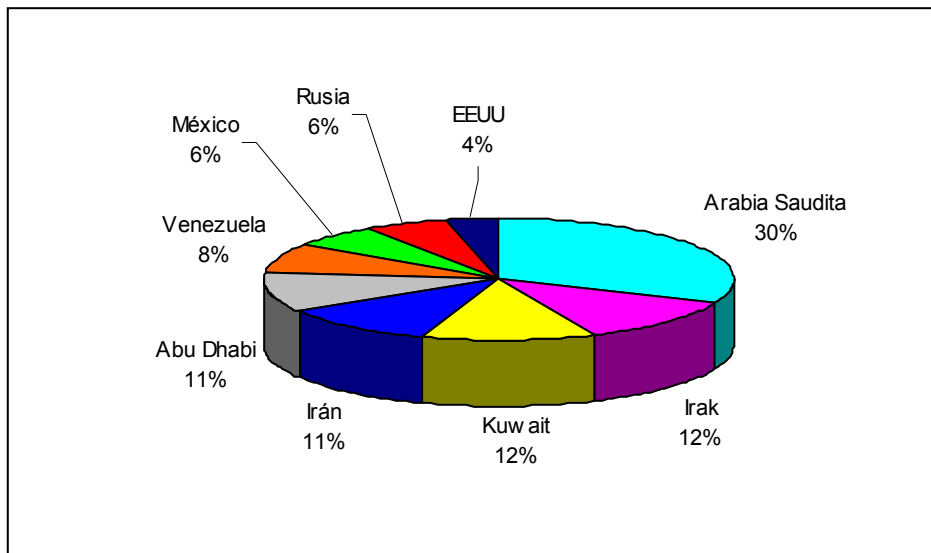
Según la teoría más aceptada, el origen del petróleo y del gas natural es de tipo orgánico y sedimentario. Esa teoría propone que el petróleo es el resultado de un complejo proceso físico-químico en el interior de la Tierra en el que, debido a la presión y las altas temperaturas, se produce la descomposición de enormes cantidades de materia orgánica que se convierten en aceite y gas. Esa materia orgánica está compuesta fundamentalmente por fitoplancton y zooplancton marinos, al igual que por materia vegetal y animal, todo lo cual se depositó en el fondo de los grandes lagos y en el lecho de los mares. Junto a esa materia orgánica se depositaron mantos sucesivos de arenas, arcillas, limo y otros sedimentos que geológicamente se conoce como rocas o mantos sedimentarios, es decir, formaciones hechas de sedimentos. Entre esos mantos sedimentarios es donde se llevó a cabo el fenómeno natural que dió lugar a la creación del petróleo y el gas natural. Éstos, al ser menos densos que la roca, tienden a ascender hasta quedar atrapados debajo de rocas impermeables formando grandes depósitos.

El petróleo es la más importante de las energías primarias con las que cuenta actualmente el Mundo, desde que acabó el proceso de sustitución del carbón, que se había iniciado en el último tercio del siglo XIX. Cuantitativamente, el petróleo abastece en torno al 40% de las necesidades energéticas mundiales, aventajando en unos 13 puntos porcentuales al carbón. Cualitativamente, su importancia se debe a su extraordinaria utilidad, derivada de sus múltiples aplicaciones, tanto como fuente de energía (transporte y calefacción principalmente), como su utilización como materia prima (plásticos, fibras textiles artificiales, pinturas, detergentes, explosivos, fertilizantes, asfaltos, etc.).

Otras razones avalan el carácter fundamental del petróleo en la economía actual. Por un lado, su abundancia y relativa diversificación productiva, pues más de medio centenar de países producen más de un millón de toneladas al año y unos 25 superan los diez millones de toneladas. Por otro lado, está su bajo coste de extracción, que en los países productores exportadores no sobrepasa los 6-7

dólares el barril. Esto significa que es una energía barata y fácilmente transportable a cualquier lugar del planeta.

Actualmente, las reservas de petróleo se estiman en algo más de un billón de barriles (unos 137000 millones de toneladas), lo que permitiría garantizar la actual producción durante 43 años aproximadamente, bajo el supuesto improbable de que no se descubriesen en el futuro nuevas reservas. Esas reservas están muy concentradas, pues dos terceras partes corresponden a cinco países del Golfo Pérsico (Arabia Saudita, Irak, Kuwait, Irán y Abu Dhabi). Otros países con reservas dignas de mención son Venezuela, México, Rusia y EE.UU. La Figura 1.6 ofrece una distribución de las reservas citadas. En su conjunto, los países de la OPEP disponen de más del 75% de las reservas totales conocidas.



**Figura 1.6.** Distribución de las reservas mundiales de petróleo (%) (datos 1999)

La composición elemental del petróleo normalmente está comprendida dentro de los siguientes intervalos: 84-87% de C, 11-14% de H, 0-2% de S, y 0-2% de N. El contenido de azufre en el petróleo oscila en función de la procedencia del crudo; es por lo tanto un compuesto químico muy abundante en el petróleo, el de mayor contenido después del carbono y del hidrógeno. Además, a medida que se van explotando los mejores yacimientos, la calidad del crudo disminuye, aumentando el contenido en azufre (Kropp y Fedorak, 1998).

El petróleo, tal como se encuentra en las profundidades de la Tierra, no tiene prácticamente ninguna utilidad. El valor que posee lo va adquiriendo a través de las fases de su explotación industrial, que son las siguientes:

- **Prospección**
- **Sondeo**
- **Extracción**
- **Transporte**
- **Refino** en instalaciones de creciente complejidad para obtener los productos de consumo
- **Petroleoquímica**. Transformación química en miles de productos derivados como plásticos, caucho, fibras, detergentes, etc.

## **1.2. REFINO del PETRÓLEO**

En el proceso de refino del petróleo, el bruto estabilizado se elabora en la refinería de acuerdo con el destino que se fije para los productos, que también depende de la constitución molecular o de lo que se llama *base* del crudo.

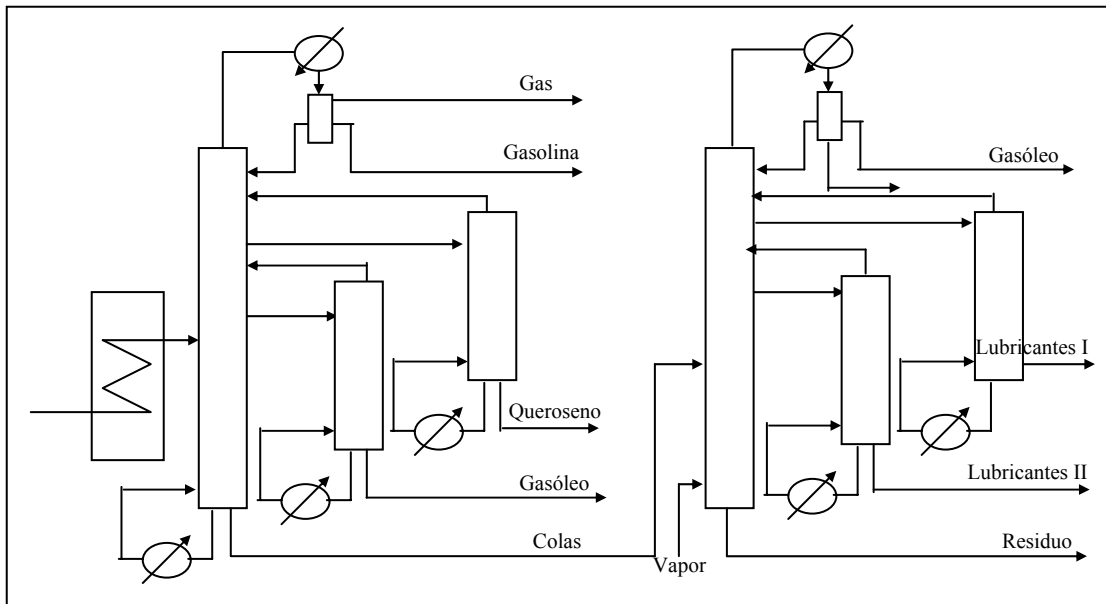
El trabajo de la refinería tiene cuatro objetivos básicos:

- a) Separar el crudo en las distintas fracciones, de acuerdo con las necesidades del mercado (gasolinas, gasóleo, etc.), mediante la **destilación fraccionada** o fraccionamiento del crudo.
- b) Convertir las fracciones de menor demanda en el mercado en otras de mayor demanda, fundamentalmente gasolinas, mediante la ruptura térmica o catalítica, **craqueo**.
- c) Modificar las estructuras de las cadenas carbonadas de las fracciones para elevar su calidad carburante mediante el **reformado**.
- d) Depurar los productos obtenidos, eliminando los compuestos indeseables (compuestos azufrados, por ejemplo) mediante una operación que constituye el **refino final**.

La destilación es el proceso fundamental en la industria del refino del petróleo, pues permite hacer una separación de los hidrocarburos aprovechando sus diferentes volatilidades; por esta razón, el primer proceso que aparece en una refinería es la destilación atmosférica y a vacío. En estas instalaciones, el crudo se calienta y, como puede verse en la Figura 1.7, se alimenta a la primera columna, cuya fracción de cabeza produce gas (GLP) y gasolina. En sendas corrientes laterales extraídas de la columna, se rectifican las fracciones de queroseno y gasóleo, quedando como residuo un producto que a su vez se fracciona seguidamente en un sistema análogo, pero que trabaja a vacío o por arrastre con vapor de agua, para evitar la descomposición térmica de especies que hierven a más de 320°C; con ello, se obtienen nuevas cantidades de gasóleo, unas fracciones centrales (que suelen emplearse como lubricantes) y un residuo que se emplea como combustible (mazut) o para revestir las carreteras (asfalto o bitumen) cuando no puede aprovecharse también para lubricantes. Las fracciones usuales que se separan del crudo se muestran en la Tabla 1.1 por orden de volatilidad decreciente. Este esquema puede verse alterado según las necesidades del mercado y de acuerdo a la naturaleza del crudo.

Normalmente, la proporción de gasolina que puede obtenerse de un crudo no es tan elevada como fuera de desear (por la demanda), pues el principal cliente de la refinería es el motor de gasolina. Por otra parte, las proporciones de productos pesados son mayores de lo que normalmente pide el mercado, ya que el gas natural, la energía nuclear y el carbón han ido sustituyendo, por motivos económicos, al fuelóleo para uso doméstico e industrial y para la generación de electricidad. Por tanto, las refinerías se han ido adaptando para producir cada vez mayor porcentaje de fracciones ligeras, mediante los procesos de craqueo de las fracciones pesadas de la destilación a vacío en fracciones ligeras.

Los procesos de reformado son en muchos casos similares a los de craqueo catalítico, se diferencian de éstos fundamentalmente por el objetivo para el que se realizan. El craqueo se utiliza para incrementar la cantidad de gasolina producida, y el reformado para aumentar la calidad carburante de una fracción de volatilidad parecida a la de la gasolina (nafta) y elevar su poder antidetonante, o índice de octano (IO).



**Figura 1.7.** Fraccionamiento por volatilidad del crudo estabilizado.

**Tabla 1.1.** Fracciones obtenidas en la refinería por orden de volatilidad y longitud de las cadenas.

	<b>Producto</b>	<b>Intervalo <math>T_{eb}</math></b>	<b>Longitud cadena carbonada</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>FRACCIONES LIGERAS</b>	Gas de refinería((GLP)	< 20°C	$C_1 - C_2$	Combustible para refinería; calefacción doméstica e industrial; carburante para automóviles; materia prima para productos químicos, disolvente, etc.
	Gasolina directa	40-150°C	$C_3 - C_4$	
	Nafta pesada	150-200°C	$C_5 - C_9$ $C_{10} - C_{12}$	
<b>FRACCIONES MEDIAS</b>	Queroseno	170-250°C	$C_{13} - C_{17}$	Lámparas de alumbrado; carburante para turborreactores; carburante para motores Diesel; calefacción doméstica
	Gasóleo	250-320°C	$C_{17} - C_{20}$	
<b>FRACCIONES PESADAS</b>	Fuelóleo ligero	340-400°C	$C_{20} - C_{35}$ > $C_{35}$	Combustible para buques, locomotoras, etc; materia prima para lubricantes, ceras y parafinas, cremas, aceites esenciales; pavimentación, techado, impermeabilización; abrasivos, electrodos
	Fuelóleo pesado	400-500°C		
	Asfaltos	>500°C		

Los procesos de depuración son los que constituyen el refino en el más estricto sentido de la palabra. Se llevan a cabo, bien de los productos intermedios para prepararlos para posteriores tratamientos, bien de los productos finales para aumentar su pureza. El objetivo principal de estos tratamientos es eliminar los compuestos azufrados, uno de los causantes de la lluvia ácida, del envenenamiento de los catalizadores, etc. El más importante es el hidrotratamiento, los demás pueden agruparse en refino físico y químico:

- El **refino químico** se efectúa sobre todo en las fracciones lubricantes y se puede realizar por tratamiento con ácido sulfúrico, o por un lavado con álcali.

- El **refino físico** se aplica por lo general a las fracciones pesadas y a residuos de la destilación primaria; puede consistir en un desparafinado, una extracción con disolventes, o un desasfaltado.

- El **hidrotratamiento** consiste en una hidrogenación catalítica a presión. Es de naturaleza química, pero puede también sustituir al refino físico. Los catalizadores que se usan son generalmente mezclas de  $\text{Mo}_2\text{O}_3$  y  $\text{Co}_2\text{O}_3$  sobre óxido de aluminio, que luego reaccionan y forman  $\text{CoMoO}_4$ .

### **1.2.1. Productos de la Refinería**

De la refinería se obtienen gases, gasolina, gasóleo y fracciones pesadas, que comprenden lubricantes, residuos asfálticos y fuelóleos. Los **gases** pueden ser directos o de craqueo. La diferencia esencial entre unos y otros es que los primeros son saturados y no tienen hidrógeno libre, y los segundos son ricos en olefinas e hidrógeno. Las **gasolinas** pueden ser de varios tipos: *ligera*, producida en la estabilización; *directa*, que se obtiene en el fraccionamiento; de *craqueo* y reformado y de *reversión* gaseosa. Para que una gasolina produzca un buen rendimiento en el motor de explosión, debe tener una volatilidad adecuada para asegurar una buena carburación, una constitución química adecuada para evitar la detonación del vapor de gasolina (alto IO), y ausencia de compuestos corrosivos (azufre en diversas formas). De las fracciones más pesadas, el **gasóleo** es la más importante. Los crudos parafínicos dan un gasóleo muy apreciado que se emplea como carburante. Los crudos asfálticos dan una fracción gasóleo de mal


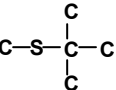
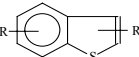
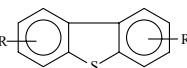
rendimiento como carburantes, por lo que normalmente se destina a craqueo para obtener gases olefínicos, gasolina de calidad y combustibles (fuelóleo). El gasóleo carburante tiene cada día mayor importancia, compitiendo con la gasolina, no sólo por su contribución al transporte pesado, sino también por su aplicación a motores ligeros muy revolucionados. La destilación con vapor o a vacío da una cabeza formada por hidrocarburos de la volatilidad del gasóleo, otra de aceite pesado y un residuo. Estas dos últimas fracciones tienen distinto tratamiento si el petróleo es parafínico o asfáltico. La aplicación preferible es para lubricantes. Cuando esto no es posible (residuos) por su gran asfalticidad, los residuos se destinan los residuos al craqueo o a la producción directa de asfaltos. Los fuelóleos muchas veces son productos de mezcla resultantes de reunir las fracciones más diversas que no tienen otro destino en la refinería.

### **1.3. CONTAMINACIÓN por COMBUSTIBLES**

El petróleo y otros combustibles fósiles constituyen más del 60% de las fuentes de energía primaria, hecho que involucra la generación de apreciables problemas ambientales. Uno de ellos es la producción de emisiones sulfurosas a la atmósfera durante la combustión, especialmente en las actividades industriales y en el transporte (también en la producción de electricidad en el caso del carbón), lo que hace que se libere dióxido de azufre, que es el principal componente de la llamada *lluvia ácida*. Al quemarse, los combustibles fósiles producen óxidos de azufre y de nitrógeno que, al combinarse con el agua de las nubes, se precipitan en forma de lluvia ácida, pudiendo arruinar los bosques, eliminar la vida de los lagos y desertizar grandes superficies terrestres. Además, el azufre contenido en el petróleo, se fija en el platino y el rodio contenidos en los convertidores catalíticos en los procesos de refinado y reformado, inhibiendo así su función y contribuyendo indirectamente al incremento de las emisiones de monóxido de nitrógeno y monóxido de carbono. Como se ha indicado anteriormente, éstas son las razones por las que es necesario realizar un tratamiento de eliminación del azufre en los combustibles fósiles antes de su utilización, ya sea como combustible (para transporte o calefacción) o como materia prima en la industria petroquímica.

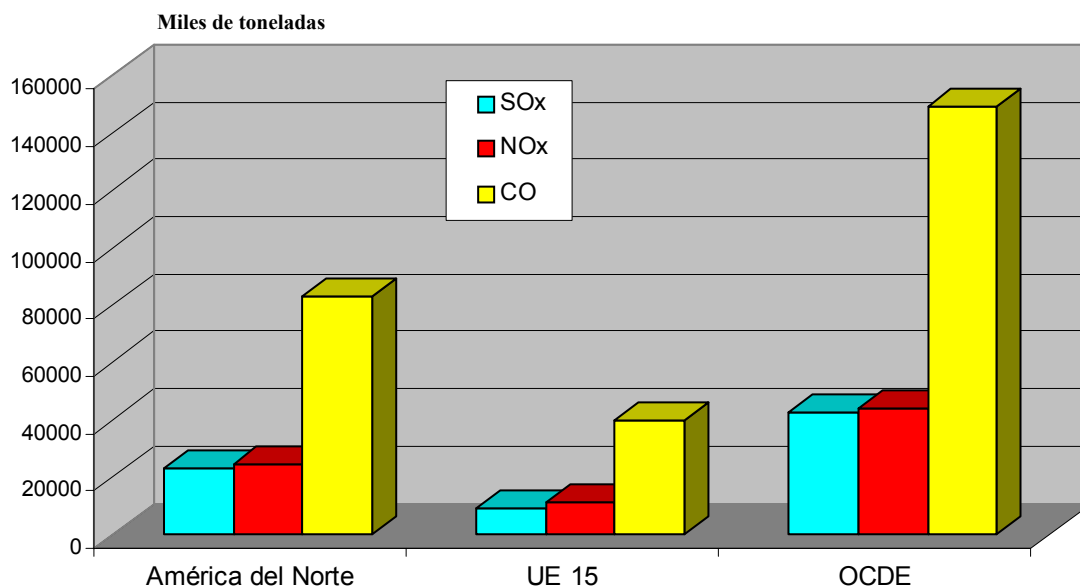
En la Figura 1.8 se muestran los compuestos azufrados que se encuentran en los distintos tipos de combustibles. En la Figura 1.9 se recogen las emisiones totales de óxidos de azufre, de nitrógeno y monóxido de carbono en distintas regiones del mundo.

Además, debido al consumo y quemado de combustibles fósiles, se producen emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, cuya evolución entre los años 1992 y 2001 se muestra en la Figura 1.10. Una gran concentración de este dióxido de carbono en la atmósfera, aunque permite que la radiación solar llegue a la Tierra, impide que gran parte de ella pueda volver al espacio, por lo que es reflejada nuevamente, produciéndose así el efecto invernadero y la posibilidad de un calentamiento, que algunos relacionan con un cambio climático.

<u>TIPO COMBUSTIBLE</u>	<u>COMPUESTO</u>	<u>PUNTO DE EBULLICIÓN EN DESTILACIÓN</u>
GASOLINAS	no tiofénico $R = S$	< 80 °C
	tiofenos 	84 °C
JET	sulfuros butílicos terciarios 	99 °C
	metil-etil sulfuros $C-S-S-C-C$	135 °C
GASÓLEO	benzotiofenos 	219 °C
	dibenzotiofenos 	293 °C
CRUDO DE PETRÓLEO		

**Figura 1.8.** Compuestos azufrados encontrados en los distintos tipos de combustibles.





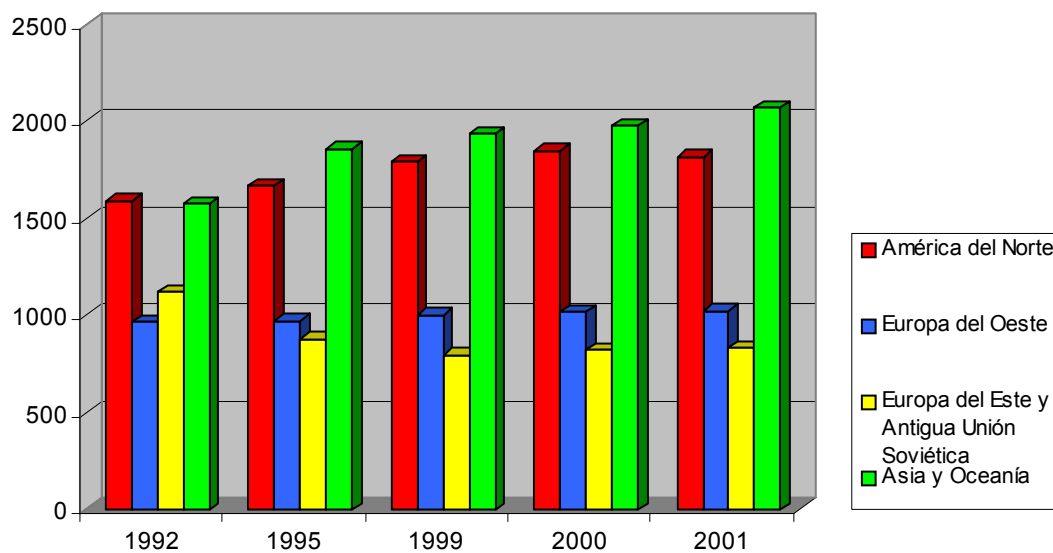
**Figura 1.9.** Emisiones totales de contaminantes del aire. Desglose por regiones.

Para llevar a cabo un control de estas emisiones, se han implantado en todo el mundo regulaciones muy estrictas en cuanto al contenido en azufre de los combustibles. La última propuesta de la EPA (*Environmental Protection Agency*) en EE.UU. ha sido la reducción del contenido de azufre en diesel desde 500 ppm a solamente 15 ppm para el año 2006 (Le Borgne y col., 2003). Estas regulaciones comenzaron a principios de los años 90 y han sido cada vez más severas, como se muestra en la Tabla 1.2.

Los niveles de azufre en el crudo varían entre 1000 y 30000 ppm, y las concentraciones típicas en los gasóleos a menudo exceden los 5000 ppm. En los últimos diez años se ha pasado de aceptar niveles de entre 2000 y 5000 ppm, a menos de 500, y las últimas regulaciones llevan a niveles por debajo de los 350 ppm (Monticello, 2000). Además, cada año se producen unos 60 millones de barriles de petróleo, con un contenido medio en azufre de aproximadamente el 1,1%, ambas cantidades se espera que aumenten durante los próximos años.

**Tabla 1.2.** Regulaciones en cuanto a contenido en azufre en gasóleo y gasolina en distintos países y entre los años 1993 y 2005.

Año	País	Combustible	Nivel de Partida	Nivel Requerido
1993	EEUU	Gasóleo	2500 ppm	500 ppm
1996	Singapur	Gasóleo	5000 ppm	2500 ppm
	India	Gasóleo	8000 ppm	5000 ppm
	UE	Gasóleo	3000 ppm	500 ppm
1997	Japón	Gasóleo	2000 ppm	500 ppm
1998	Taiwan	Gasóleo	5000 ppm	500 ppm
2000	Korea S.	Gasóleo	2000 ppm	500 ppm
	Tailandia	Gasóleo	5000 ppm	500 ppm
	UE	Gasóleo	500 ppm	350 ppm (2003)
	EEUU	Gasolina	400 ppm	50-100 ppm
	UE	Gasolina	500 ppm	350 ppm (2003)
2005	UE	Gasóleo	350 ppm	50 ppm (2007)



**Figura 1.10.** Evolución de las emisiones de CO<sub>2</sub> por el consumo y quemado de combustibles fósiles en el mundo. (Datos en millones de toneladas equivalentes de carbono. Las tec se convierten en toneladas de CO<sub>2</sub> multiplicando por 44/12)

#### 1.4. MÉTODOS de ELIMINACIÓN del AZUFRE

Por todas las razones previamente comentadas (problemas ambientales y técnicos debido al azufre contenido en los combustibles fósiles), debe realizarse una desulfuración de los distintos tipos de combustibles fósiles antes de su uso.

En cuanto a la desulfuración del **carbón**, para llevar a cabo la eliminación de estos compuestos azufrados, se utilizan diferentes métodos:

- A. Tratamiento de los carbones *antes* de la combustión. En este caso, los métodos utilizados pueden ser físicos o químicos. Entre los físicos se encuentran la separación gravimétrica, la separación electrostática y la flotación, y entre los métodos químicos está la oxidación por compuestos químicos, la oxidación por calentamiento y el desplazamiento químico del metaloide.
- B. Métodos de desulfuración *durante* la combustión, que eliminan el dióxido de azufre en el interior de las calderas de combustión.
- C. Métodos de desulfuración *después* de la combustión, que requieren la utilización de una torre de lavado, donde el gas que procede de los hornos se pone en contacto con un absorbente que elimina el dióxido de azufre del flujo gaseoso.

Se ha comprobado que el pretratamiento del carbón puede eliminar sólo de un 5 a un 30% de azufre. El azufre restante está combinado en la estructura del carbón y no puede eliminarse por medio de procesos químicos como el lavado. Los procesos de desulfuración del gas tienen amplia aceptación en centrales térmicas de carbón pulverizado, aunque la inversión y los costes de operación de la planta adicional necesaria aumentan considerablemente el coste de producción de electricidad o de calor. Por tanto, los esfuerzos se han concentrado en procesos en los cuales el azufre se elimina con la ceniza en el sistema de combustión u otro reactor. Existen diversos métodos químicos para extraer el azufre que forma parte de las piritas, de manera más o menos efectiva, pero estos

métodos tienen la desventaja de emplear altas temperaturas, disolventes agresivos, se producen corrientes muy contaminantes y además los requerimientos de energía son elevados. Sin embargo, no existen métodos químicos para la eliminación o reducción del azufre orgánico.

D. La *biodesulfuración* es el proceso en el cual se emplean microorganismos para la desulfuración del carbón. Se basa en la capacidad de ciertos microorganismos de oxidar los compuestos reducidos del azufre que son transformados en compuestos solubles de fácil eliminación.

En los últimos veinte años, se han desarrollado diversos procesos fisicoquímicos para eliminar el azufre de los **crudos pesados de petróleo**, pero sólo el proceso de hidrodesulfuración (HDS) es en la actualidad económicamente viable. En este proceso, una fracción petrolífera se hace reaccionar con hidrógeno gas, en presencia de un catalizador a elevadas temperaturas y presiones, lo que aumenta los costes de operación. La reacción química es reductiva y transforma el azufre en ácido sulfhídrico, un gas fácil de separar. Pero la presencia en el crudo de nitrógeno, oxígeno y metales pesados puede afectar la actividad catalítica del proceso: envenenando el catalizador en el caso del nitrógeno, produciendo gomas en el caso del oxígeno, y cambiando la selectividad del catalizador en el caso de los metales pesados.

El método principal de eliminación de compuestos azufrados en las **fracciones petrolíferas** es la hidrogenación catalítica a presión o hidrotratamiento. Cuando el hidrotratamiento se lleva a cabo con el único propósito de eliminar el azufre, se llama hidrodesulfuración (HDS). Se suele aplicar a todo tipo de fracción petrolífera, y está especialmente indicado para fracciones lubricantes. Actualmente tiende a aplicarse a varios tipos de gasóleos por las restricciones legales que impiden quemar combustibles azufrados en las calefacciones domésticas urbanas y en otras zonas de gran concentración humana. Los demás tratamientos pueden agruparse en refino físico y químico, que se efectúan, sobre todo, en las fracciones más pesadas, el primero de ellos, y a fracciones lubricantes, el segundo.

El refino físico consiste en un *desparafinado* por enfriamiento directo de la fracción y filtración o centrifugación de la parafina cristalizada, recuperando el disolvente por destilación; *extracción con disolventes*, que se aplica a las fracciones pesadas mixtas; y *desasfaltado*, por adición de un disolvente de la fracción hidrocarbonada.

En el refino químico, por otro lado, se efectúan dos tipos de tratamientos: *con ácido sulfúrico*, de forma que muchas de las impurezas precipitan o se disuelven en la fase ácida, y un posterior *lavado con álcali*.

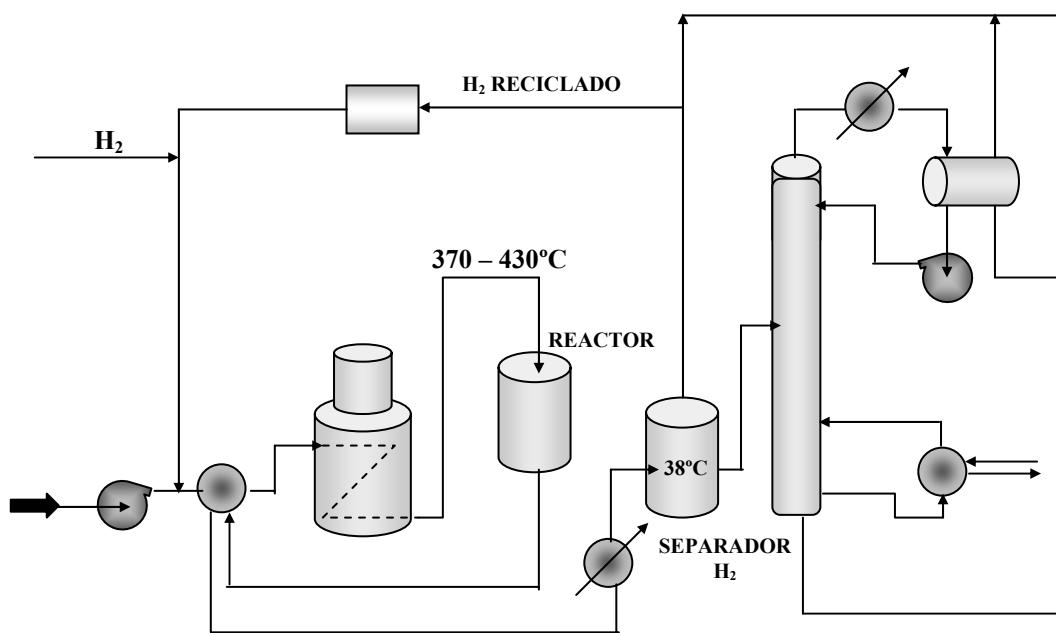
En los tres casos, la eliminación del azufre mediante el empleo de microorganismos está siendo investigada debido a las ventajas económicas que puede presentar frente a estos tratamientos químicos. El proceso de biodesulfuración posee una serie de ventajas entre las que se encuentran: bajos costes de inversión y de operación, ya que se utilizan equipos sencillos y de bajo consumo de reactivos; bajo consumo energético, al poderse trabajar a temperatura ambiente y posibilidad de eliminar tanto el azufre pirítico como parte del orgánico en el caso del carbón. Sin embargo, el procedimiento es lento, siendo necesario buscar nuevos microorganismos que reduzcan los tiempos necesarios y hagan más competitivo el proceso a nivel industrial.

#### **1.4.1. Hidrodesulfuración**

La HDS se empezó a poner en práctica durante la II Guerra Mundial. Es un proceso que implica un tratamiento catalítico con hidrógeno para convertir los compuestos azufrados presentes en ácido sulfhídrico. Después, éste es separado y convertido en azufre elemental a través del proceso *Clauss*. En la Figura 1.11. se muestra un esquema típico del proceso de HDS.

El aceite de alimento se mezcla con gas rico en hidrógeno antes o después de precalentarse a la temperatura adecuada de entrada al reactor. La mayoría de reacciones de tratamiento con hidrógeno se llevan a cabo por debajo de los 425°C

para minimizar el craqueo, así que el alimento se calienta generalmente a temperaturas entre 260°C y 425°C. El aceite de alimento combinado con el gas rico en hidrógeno entra por la parte superior del reactor de lecho fijo. El hidrógeno, en presencia del catalizador de óxidos metálicos ( $\text{Mo}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Co}_2\text{O}_3$ ), reacciona con el aceite para producir sulfuro de hidrógeno, amoníaco, hidrocarburos saturados y metales libres.



**Figura 1.11.** Diagrama de flujo de un proceso de hidrodesulfuración química.

Los metales permanecen en la superficie del catalizador, mientras que los otros productos abandonan el reactor con la corriente de hidrógeno-aceite. El efluente del reactor se enfría antes de entrar en el separador, en el que se obtiene el aceite por fondo y el gas rico en hidrógeno. El aceite se agota de cualquier cantidad remanente de ácido sulfhídrico y de las colas ligeras en una columna de rectificación. El gas se trata para eliminar el sulfuro de hidrógeno y se recicla al reactor.


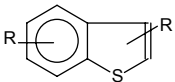
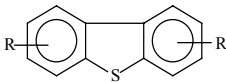
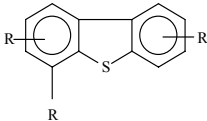
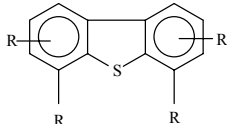
Las principales ventajas de este tratamiento son:

- Escasa selectividad, es decir, que puede eliminar el azufre de numerosos tipos de compuestos, sin que el proceso se vea muy afectado por pequeñas variaciones estructurales presentes en las moléculas organosulfuradas. Este hecho es muy importante si se tiene en cuenta que el azufre en el petróleo está formando parte de estructuras químicas muy variadas.
- Tecnología conocida e implantada en las refinerías y gran experiencia en su manejo.
- Proceso de reducido coste, al menos hasta ciertos niveles de desulfuración

Originalmente, el interés en la HDS fue estimulado por la disponibilidad de hidrógeno de los reformadores catalíticos. Sin embargo, la demanda de hidrógeno para HDS hoy en día es mayor de la que se genera en una refinería, por lo que la mayoría reciclan el hidrógeno en el proceso.

Para destilados de bajo y medio punto de ebullición, las condiciones de reacción típicas son 300-400°C y 0,7-5 MPa de presión de hidrógeno. En general, cuanto más alta es la temperatura de ebullición, mayor es el contenido en azufre y se necesitan condiciones de operación más severas para llevar a cabo la desulfuración. Para cumplir con las regulaciones medioambientales, se requieren temperaturas y presiones cada vez más altas (o bien mayores reactores o mayor número de ellos), lo que conlleva un incremento de los costes y de las emisiones atmosféricas. Por lo tanto, es necesaria una tecnología alternativa o complementaria a la HDS para que las refinerías de petróleo puedan cumplir con estas regulaciones cada vez más estrictas ya que, aunque la HDS elimina fácilmente el azufre inorgánico o los compuestos orgánicos azufrados sencillos, no es efectiva para la eliminación de ciertas moléculas poliaromáticas encontradas en las fracciones más pesadas (Monticello, 1998), como se muestra en la Tabla 1.3. Para ello se están investigando nuevos catalizadores de HDS con eficiencias mejoradas.

**Tabla 1.3.** Dificultad de eliminación en HDS de moléculas azufradas

Compuesto azufrado	Estructura	Dificultad de hidrodesulfuración	Concentración aproximada del compuesto	
			Destilado (ppm)	Destilado craqueado (ppm)
No tiofénico	$R = S$	Fácil	5000	300
Tiofenos		Moderada	0	0
Benzotiofenos		Moderada	1700	7300
Dibenzotiofenos $\beta$ -no sustituidos		Moderada	1000	1900
Dibenzotiofenos $\beta$ -sustituidos		Moderada	1500	2300
Dibenzotiofenos $\beta$ -disustituidos		Difícil	600	900

### 1.4.2. Desulfuración Microbiana

La desulfuración microbiana o biodesulfuración (BDS) es una alternativa en que se aprovecha la ventaja de la especificidad de las enzimas y los bajos costes de las biotransformaciones, que se llevan a cabo en condiciones muy suaves de presión y temperatura, para la eliminación selectiva del azufre en los combustibles fósiles, lo cual resulta en un ahorro energético y un mayor potencial de eliminación del azufre.

Según el catalizador y el proceso empleado, el azufre se separa en forma de sulfito/sulfato o de sulfuro de hidrógeno. Con los procesos de biodesulfuración actuales es posible que la forma de trabajar más rentable sea empleando procesos mixtos en los que se someta al petróleo a un tratamiento previo de HDS que



reduzca los niveles de azufre hasta 200-300 ppm y un posterior tratamiento de BDS que disminuya este contenido hasta 50 ppm, y que sólo debe actuar sobre un reducido número de compuestos de azufre.

## **1.5. BIODESULFURACIÓN**

### **1.5.1. Biodesulfuración de Carbón**

En general, el carbón está contaminado por dos tipos de azufre, el orgánico y el pirítico, que van a requerir de diferentes microorganismos para su eliminación. El azufre orgánico, unido covalentemente a la compleja estructura de la matriz del carbón, aparece en forma de dibenzotiofenos, benzotiofenos y, en menor medida, como disulfuro uniendo ciclos, como sulfuro unido a grupos alquilo y como grupos tioles unidos a anillos aromáticos o a grupos alquilos.

En cuanto al azufre de tipo inorgánico, se conocen microorganismos capaces de obtener la energía de crecimiento a partir de la oxidación de pirita a ácido sulfúrico e hidróxido férrico. Estos microorganismos utilizan la energía obtenida en esta oxidación, para la reducción de dióxido de carbono hasta carbono orgánico, el cual pasa a formar parte de las estructuras celulares. La mayoría de los microorganismos capaces de oxidar la pirita se caracterizan por ser quimioautótrofos, aerobios estrictos y acidófilos, con un pH óptimo de crecimiento de 1,5 a 2,5. La solubilización de la pirita ha sido muy estudiada con *T. ferrooxidans*, que utiliza el hierro (II) o los compuestos de azufre inorgánico reducido como fuente de energía (Lundgten y col., 1984). También se ha estudiado el crecimiento de *Sulfolobus acidocaldarius* en cultivo puro (Kargi y col., 1985); es un microorganismo quimioautótrofo y termófilo, capaz de desarrollarse a temperaturas de más de 80°C .

Hay datos que demuestran que existen microorganismos heterótrofos tolerantes a pH ácido, que sirven para estimular la oxidación de la pirita (Dugan y Apel, 1987). Los cultivos mixtos de heterótrofos y autótrofos son mas eficaces

que los puros, ya que los primeros eliminan metabolitos tóxicos producidos por los segundos, y además proporcionan trazas de nutrientes. Por ejemplo, *Leptosprillum ferrooxidans* solo puede oxidar el hierro pirítico en presencia de una bacteria que oxide el azufre (Balashova y col., 1974).

Se ha demostrado que el rendimiento en la desulfuración aumenta al hacerlo la superficie de contacto entre el microorganismo y los minerales y, por tanto, al disminuir el tamaño de partícula; por ello, estos procesos se realizan con carbón pulverizado hasta el tamaño de micras y en medio acuoso. La temperatura y el pH también son variables que influyen de manera importante en este proceso (Kargi y Weissman, 1984). Los mejores resultados se han obtenido en cultivos mixtos de *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, con un 90% de desulfuración en unos pocos días (Harrison, 1984).

Algunas ventajas de la biodesulfuración del carbón frente a los métodos tradicionales son las siguientes:

- Reducción de la contaminación atmosférica.
- Costes de operación reducidos, por reducido gasto de reactivos y de energía.
- Fácil separación de los subproductos del proceso.

Como se ha comentado anteriormente, no existen métodos químicos para extraer el azufre orgánico del carbón. A este respecto, hay un acuerdo generalizado de que los microorganismos oxidantes del hierro y del azufre, acidófilos y mesófilos, no son efectivos en la liberación del azufre orgánico del carbón. Sin embargo, es diferente la opinión general sobre microorganismos termófilos acidófilos. Se ha demostrado que *S. acidocaldarius* es capaz de eliminar hasta el 44% del azufre orgánico de una muestra de carbón (Kargi y Robinson, 1984). Brierly y col. (1978) reportaron que *Thiobacillus ferrooxidans* THI elimina la piritita y el azufre orgánico de la lignita, y se extrajo entre el 35% y el 63% del azufre orgánico (2,2% del orgánico total) en 25 días a 50°C. Isbister y Kobylinski (1985) aislaron una *Pseudomonas* sp. denominada CB1, capaz de eliminar el 30% del azufre orgánico, tras nueve horas de proceso. Bhattacharyya

y col. (1988) afirman que una misma cepa de la bacteria *Sulfolobus brierleyi* puede metabolizar preferentemente el azufre orgánico o inorgánico del carbón. Estos autores consiguieron eliminar el 45% del azufre orgánico en una muestra de carbón que contenía cantidades iguales de azufre orgánico e inorgánico. Sin embargo, en otras muestras, se eliminó el 90% del azufre inorgánico sin que hubiera reducción del azufre orgánico.

Actualmente se encuentra más desarrollada la biodesulfuración del azufre inorgánico que la del orgánico. En Italia existe una planta piloto de eliminación de azufre inorgánico que procesa 10 Kg de carbón / hora (Finnerty, 1992).

### **1.5.2. Biodesulfuración de Petróleo y Fracciones Petrolíferas**

La BDS de petróleo y fracciones petrolíferas se empezó a investigar en los años 50, en que se encuentra la primera patente (ZoBell, 1953), aunque nunca llegó a funcionar. A finales de los 70 y principios de los 80, el Departamento de Energía de EE.UU. (DOE) y otras organizaciones, patrocinaron muchos trabajos y se hicieron progresos significativos (Lee y col., 1995), sobre todo en cuanto a la clarificación del problema que hacía que los procesos desarrollados no funcionaran: las bacterias que se habían aislado hasta entonces no eran capaces de ser usadas en procesos comerciales porque atacaban a las fracciones hidrocarbonadas de los heterociclos aromáticos y también degradaban muchas de las moléculas poliaromáticas (naftaleno, fenantreno, etc.). Además, el coste era elevado. A finales de los 80, las investigaciones se dirigieron a la identificación de bacterias que pudieran liberar azufre de la molécula modelo dibenzotiofeno (DBT) sin atacar el hidrocarburo. Este desarrollo, y la subsecuente caracterización del sistema, condujo al continuo desarrollo de los estudios de BDS.

A principios de los años 90 se hicieron avances significativos en la investigación de la BDS, cuando se aisló la bacteria aerobia *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, capaz de eliminar selectivamente el azufre de la molécula de DBT sin degradar su esqueleto carbonado (Kilbane, 1992). El valor energético de los combustibles tratados con la cepa IGTS8 no se ve afectado, ya que el DBT no

se degrada, sino que se transforma en 2-hidroxibifenilo (HBP), que se recicla a la fase orgánica formada por el combustible, mientras que el azufre es eliminado en forma de sulfato en la fase acuosa, en contacto con el biocatalizador.

Ha sido general el uso de un molécula modelo en los estudios de BDS, dibenzotiofeno (DBT), compuesto que fue usado durante muchos años en el desarrollo de catalizadores convencionales para la HDS, y es representativo de las moléculas más recalcitrantes en las fracciones tipo gasóleo del petróleo.

### **1.5.3. Degradación y Desulfuración de DBT**

#### ***1.5.3.1. Degradación de DBT con Ruptura de Enlace C-C***

Como ya se ha indicado, la primera patente de desulfuración microbiana es de 1953 (ZoBell, 1953); aunque desde entonces se ha estado trabajando en ello, no se ha desarrollado un proceso viable comercialmente debido a que las rutas bioquímicas utilizadas para la eliminación del azufre eran rutas de *degradación* de hidrocarburos. En la mayoría de estos sistemas, las bacterias funcionan degradando las moléculas azufradas hasta productos solubles en agua, que podían ser extraídos del petróleo. Estas bacterias asimilaban los átomos de carbono del hidrocarburo, lo que conduce a una pérdida del contenido combustible pero sin romper el enlace C-S del compuesto orgánico azufrado.

Se ha demostrado que el DBT es metabolizado aerobia o anaerobiamente por varios microorganismos. *Desulfovivrio desulfuricans* M6, una bacteria reductora de sulfato, degrada DBT anaerobiamente, aislando bifenilo como producto principal (Kim y col., 1990), siendo la degradación típica del 42%. También se ha visto que otras bacterias reductoras de sulfato tienen la capacidad de convertir DBT en bifenilo anaerobiamente (Lizama y col., 1995; Armstrong y col., 1995), pero la desulfuración es muy baja, entre el 0,22 y el 1,14%. Este proceso anaerobio sería atractivo comercialmente porque no libera sulfato, que debe ser retirado del proceso mediante algún tratamiento, pero no se han encontrado microorganismos anaerobios suficientemente efectivos para que la

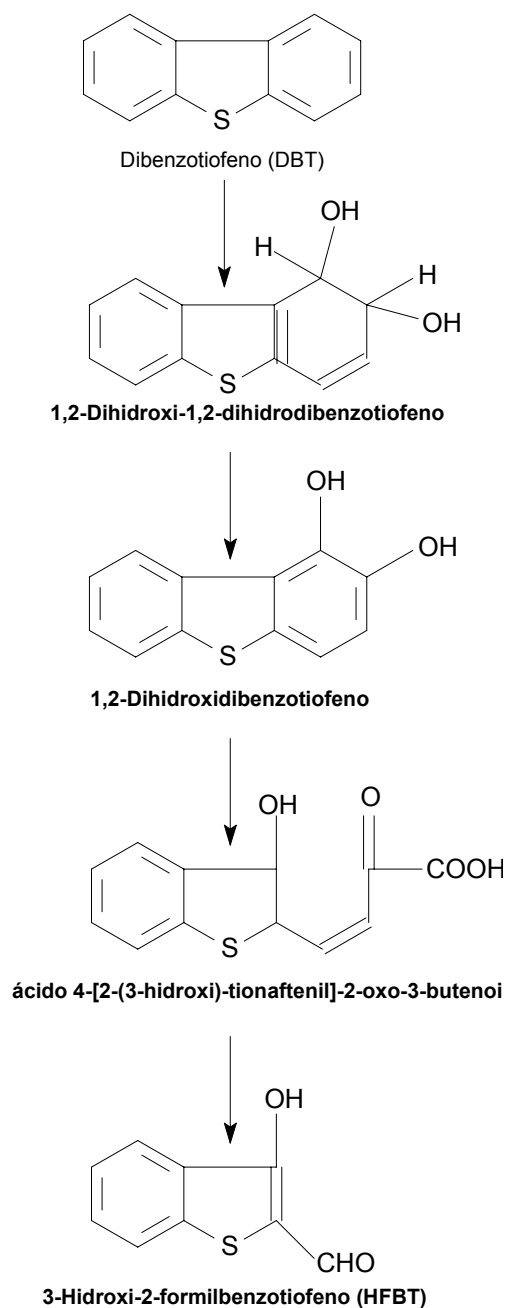
desulfuración del petróleo se lleve a cabo de forma práctica. Hay varios trabajos que tratan del metabolismo aerobio de DBT, aunque están enfocados a la velocidad de degradación y no mencionan los productos que se obtienen (Kilbane y Jackowski, 1992; Constanti y col., 1994 y 1998).

La degradación de DBT por microorganismos aerobios se puede clasificar en dos tipos:

**Tipo I**, donde el esqueleto carbonado del DBT se oxida parcialmente y se rompe, permaneciendo intactos los enlaces C-S, lo que se denomina *degradación* del DBT, para distinguirla de la *desulfuración* de DBT, en que los enlaces C-S se rompen. En 1968 se comprobó que algunas cepas de *Pseudomonas* tenían la capacidad de degradar DBT (Yamada y col., 1968; Nakatani y col., 1968). Después se comprobó que el DBT era metabolizado por hidroxilación, rompiendo el anillo entre los sustituyentes diol, como se muestra en la Figura 1.12 (Kodama y col., 1970; Kodama y col., 1973). Esta ruta se ha observado en muchas otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* ERC-8 (Hou y Laskin, 1976), *Beijerinchia* sp. (Laborde y col., 1985), *Pseudomonas* sp. (Monticello y Finnerty, 1985) y *Rhizobium melioli* (Frassinetti y col., 1998).

El metabolismo del DBT se ha estudiado también en algunos hongos: *Cunninghamella elegans* (Grawford y Gupta, 1990; Schlenk y col., 1994) y *Pleurotus ostreatus* (Bezalel y col., 1996) tienen la capacidad de convertir DBT en dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>).

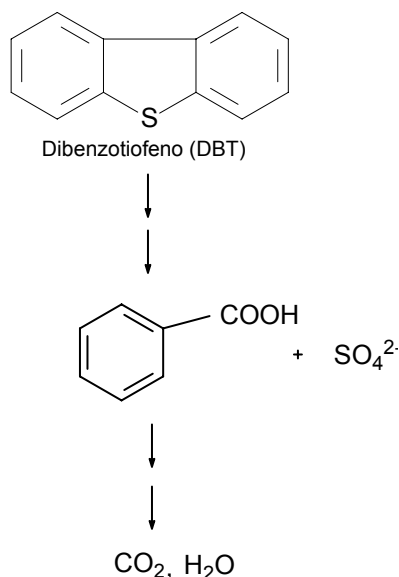
Por otra parte, en el caso del metabolismo de tipo I, se observó que se formaban algunos pigmentos en los cultivos bacterianos durante la degradación del DBT, lo que conlleva problemas en el producto final. Es, además, relevante, que finalmente no se extrae el átomo de azufre de la molécula.



**Figura 1.12.** Ruta de degradación de DBT con rotura de enlaces C-C (metabolismo tipo I).

**Tipo II**, donde el DBT se utiliza como única fuente de carbono, azufre y energía. La cepa *Brevibacterium* sp. (van Afferder y col., 1990) mineraliza DBT, formando dióxido de carbono, sulfato y agua como productos finales. La bacteria *Arthrobacter* DBTS2 oxida DBT a dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO), formando sulfato y benzoato (Sato y Clark, 1995). Estos son los dos únicos microorganismos conocidos con rutas metabólicas como la de la Figura 1.13, ruta en la que el DBT se desulfura, pero también se rompe el esqueleto carbonado del hidrocarburo.

Como se describe anteriormente, el metabolismo del DBT se investigó en un principio con microorganismos capaces de asimilar DBT como fuente de carbono. Sin embargo, estos microorganismos parecen tener inconvenientes en la desulfuración microbiana del petróleo, lo desulfuran pero consumen la mayor parte de éste y producen pigmentos innecesarios.



**Figura 1.13.** Degradación microbiana de DBT con rotura de enlaces C-C (metabolismo tipo II).

### 1.5.3.2. Desulfuración de DBT con Ruptura de Enlace C-S

En la última década se han encontrado ciertos microorganismos que asimilan DBT sólo como fuente de azufre y no de carbono. En este caso se puede hablar de *desulfuración*, no de *degradación* de DBT.

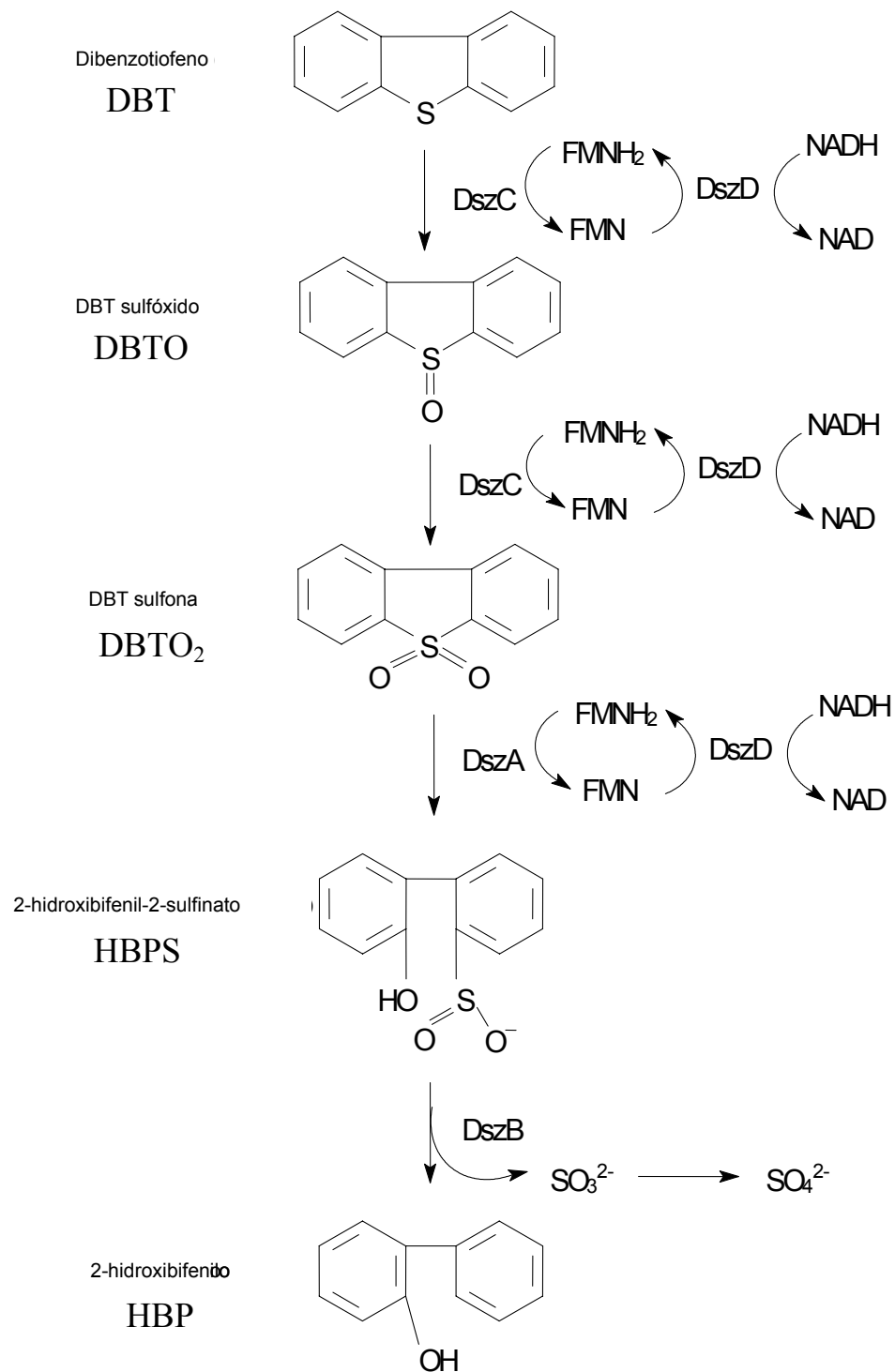
En el metabolismo de este tipo, el DBT se utiliza como fuente de azufre, siendo desulfurado por la rotura selectiva del enlace C-S, lo que lleva a la formación de HBP, como se muestra en la Figura 1.14, después de cuatro reacciones en serie (ruta 4S).

La rotura específica del enlace C-S es preferida a la degradación del compuesto orgánico azufrado porque el azufre es eliminado, pero permanecen intactos los valores caloríficos. Esta ruta es llamada 4S porque consta de cuatro pasos enzimáticos en serie, catalizados por las enzimas DszC, DszA, DszD y DszB, como se muestra en la Figura 1.14.

Desarrollando varias técnicas de *screening*, se han obtenido varias cepas que llevan a cabo esta ruta (Krawiec, 1990; Kilbane y col., 1990). Kilbane y col. (1990) aislaron la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (antiguamente catalogada como *R. rhodochrous*), y desde entonces ha sido la más estudiada. De acuerdo a la ruta de desulfuración de este microorganismo, propuesta en 1993 (Gallagher y col., 1993; Olson y col., 1993), la eliminación del azufre de la molécula de DBT requiere la acción de cuatro enzimas: dos de ellas son monooxigenasas, DBT-monooxigenasa (DszC) y DBTO<sub>2</sub>-monooxigenasa (DszA).

Ambas son flavin-dependientes, requieren de FMNH<sub>2</sub>, proporcionado por una tercera enzima (la flavin-reductasa DszD) para llevar a cabo su actividad. La cuarta enzima, una desulfinasas (DszB) completa la reacción. Así, el DBT es metabolizado a 2-hidroxibifenilo (HBP) vía dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO), dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>) y ácido 2-hidroxibifenil 2-sulfínico (HBPS), liberando sulfito como subproducto (Gray y col., 1996).





**Figura 1.14.** Ruta específica de desulfuración microbiana de DBT sin rotura de enlaces C-C (ruta 4S).

Aunque *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 ha sido la bacteria más estudiada, existen otros microorganismos mesófilos que son también capaces de catalizar la desulfuración oxidativa del DBT; éstos incluyen *Sphingomonas* (Darzins y Mrachko, 2000), *Corynebacterium* (Omori y col., 1992), *Gordona* (Oldfield y col., 1998), *Klebsiella* (Dudley y Frost, 1994) y *Nocardia* (Chang y col., 2000).

En los últimos años se ha reconocido la ventaja que puede suponer el uso de microorganismos termófilos en procesos industriales a gran escala. Las elevadas temperaturas pueden proporcionar las siguientes ventajas: primero, el potencial para obtener mayores velocidades enzimáticas; segundo, una disminución de la contaminación bacteriana, y tercero, mejoras en la estabilidad del biocatalizador. Además, como la desulfuración química requiere altas temperaturas, habría que realizar un enfriamiento antes de llevar a cabo el proceso microbiano.

Se ha comprobado que esta desulfuración termofílica se da en microorganismos como *Paenibacillus sp.* (Ishii y col., 2000; Konishi y col., 2000; Konishi y col., 1997; Osaka y col., 2001), *Mycobacterium phlei* (Kayser y col., 2002; Furuya y col., 2001; Konishi y col., 2000) o *Bacillus subtilis* (Kirimuray col., 2001). Estas cepas siguen la misma ruta metabólica que *R. erythropolis* IGTS8 (Ishii y col., 2000), las correspondientes enzimas presentan una alta homología con las de *R. erythropolis* IGTS8, y sin embargo son activas a altas temperaturas (50-60°C). Los genes de *Mycobacterium phlei* GTIS10, por ejemplo, son idénticos a los de IGTS8, pero la temperatura óptima y la estabilidad de las cepas difieren en 20°C (Furuya y col., 2001). Esto implica que hay otros factores en las reacciones celulares que contribuyen a la termoestabilidad de la ruta.

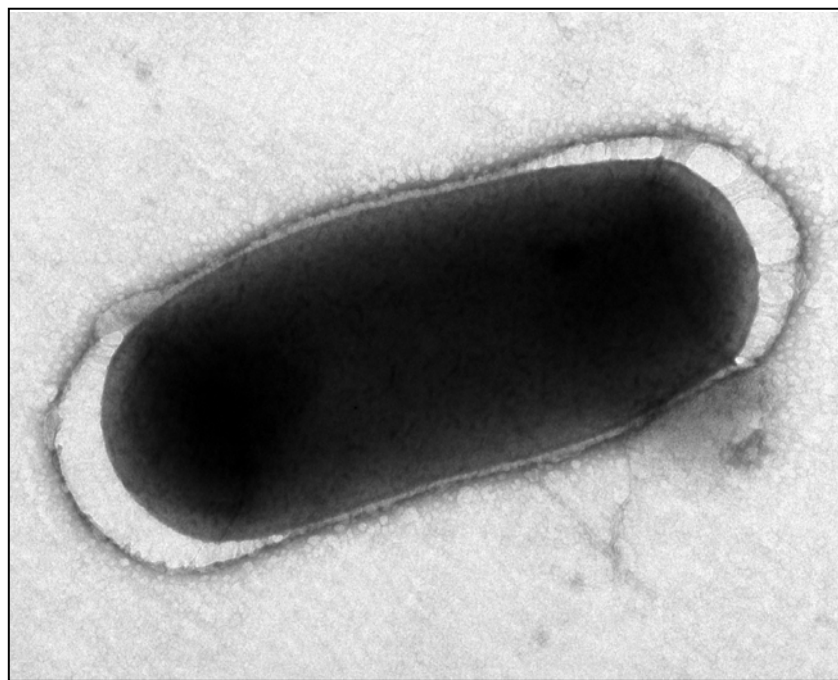
La hidrofobicidad de estas células es además una ventaja para el consumo de compuestos hidrófobos como el DBT y sus derivados, ya que se reducen las limitaciones por transferencia de materia. Las cepas termófilas se pueden utilizar para desarrollar un proceso de biodesulfuración de crudo de petróleo a altas temperaturas, a las que la viscosidad del crudo es más pequeña. Además, de esta

forma no sería necesario el enfriamiento de la corriente y la BDS se podría integrar más fácilmente en el proceso de refino.

#### **1.5.4. La Bacteria *Rhodococcus erythropolis***

Las bacterias del género *Rhodococcus* se encuentran comúnmente en el suelo y son bacterias Gram-positivas, mesófilas y que pueden utilizar distintos compuestos como fuente de carbono y energía. Como se ha comentado anteriormente, una característica fundamental de esta bacteria es que elimina el azufre de la molécula de DBT mediante la ruptura de enlaces C-S, dejando intactos los enlaces C-C. Es decir, la bacteria utiliza la molécula únicamente como fuente de azufre y no como fuente de carbono (Kilbane y Jackowski, 1992). Este hecho tiene gran importancia, ya que la ruptura de enlaces C-C redonda en una pérdida de poder energético del combustible biodesulfurado. En la Figura 1.15 se puede ver una fotografía de esta bacteria.

Los genes implicados en la desulfuración del DBT constituyen el sistema *dsz* y fueron identificados y clonados para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en 1993 (Denome y col., 1993). Después, dos grupos (Denome y col., 1994; Piddington y col., 1995) analizaron la secuencia de DNA simultáneamente. Esta incluye 4 genes, *dszA*, *dszB*, *dszC* y *dszD*, también conocidos como *soxA*, *soxB*, *soxC* y *soxD* (Denis-Larose y col., 1995), que codifican para las enzimas DszA, DszB, DszC y DszD, respectivamente. Los tres primeros genes (*dszA*, *dszB* y *dszC*) están agrupados en un plásmido lineal de 120 kb (Denome y col., 1994) y se transcriben en la misma dirección.



**Figura 1.15.** Fotografía de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 realizada mediante MET (60000 aumentos).

El codon de terminación de *dszA* se superpone con el de iniciación de *dszB* y hay un hueco de 13 pares de bases entre *dszB* y *dszC*. Aunque se expresan en un sólo operón, se ha visto que la concentración enzimática de DszB en el citoplasma de la célula es mucho menor que la de las enzimas DszA y DszC (Gray y col., 1996; Li y col., 1996). El cuarto gen *dszD*, que se encuentra en el cromosoma de la célula, a diferencia de los otros tres que se encuentran en un plásmido, fue clonado y secuenciado en *R. erythropolis* IGTS8 (Matsubara y col., 2001) y codifica para la enzima DszD.

Los tres genes *dszA*, *dszB* y *dszC* están bajo el control de un promotor sencillo (Oldfield y col., 1997). Li y col. (1996) identificaron la región promotor y el lugar de comienzo de la transcripción. La producción de las enzimas de la ruta está inducida por DBT y sus análogos, y está fuertemente reprimida por sulfato o compuestos que contienen azufre en su molécula como los aminoácidos cisteína y metionina (Oldfield y col., 1997; Li y col., 1996), incluso en presencia de DBT (Kayser y col., 1993; Ohshiro y col., 1996). En *R. erythropolis* IGTS8, estos compuestos azufrados reprimen al promotor de la secuencia de genes o la síntesis de las enzimas a nivel transcripcional, pero no existen inhibidores enzimáticos

(Monticello, 1998). Por otra parte, la acumulación de HBP parece inhibir el crecimiento y la desulfuración en algunos microorganismos (Nekodzuka y col., 1997).

La enzima **DszC**, de 45 kDa, es una enzima monooxigenasa que cataliza la conversión de DBT a DBTO y DBTO<sub>2</sub>. Esta enzima es inusual porque cataliza dos reacciones consecutivas y además utiliza FMNH<sub>2</sub> como cosustrato, mientras que las monooxigenasas clásicas catalizan una sola reacción de oxigenación y utilizan FAD para ello. Ha sido purificada y caracterizada por Ohshiro y col. (1997).

La **DszA** es una proteína enzimática de 50 kDa que cataliza la transformación de DBTO<sub>2</sub> a HBPS, utilizando también FMNH<sub>2</sub> como cofactor (Xi y col., 1997) en una reacción entre 5 y 10 veces más rápida que las catalizadas por la DszC (Gray y col., 1996), lo cual explica que no se aprecie acumulación de DBTO<sub>2</sub> cuando se da la ruta de desulfuración de DBT. También ha sido purificada y caracterizada (Ohshiro y col., 1999).

Se ha comprobado que el átomo de oxígeno incorporado en cada uno de estos pasos proviene de moléculas de oxígeno molecular (Oldfield y col., 1997). Como ya se ha comentado, las enzimas DszA y DszC son monooxigenasas que requieren de un cofactor, FMNH<sub>2</sub>, para llevar a cabo la catálisis. Este cofactor lo genera la enzima flavin reductasa **DszD**, de 20 kDa, proceso que depende a su vez de otro cofactor, NADH (Xi y col., 1999). La participación de estos cofactores y la complejidad de la ruta obligan a trabajar con células enteras. Así, la ruta de desulfuración requiere del metabolismo celular para producir equivalentes de reducción en un proceso altamente energético (se requieren 4 moles de NADH por mol de DBT desulfurado) (Oldfield y col., 1997), para activar el oxígeno molecular que se utiliza en la oxidación de DBT hasta HPBS mediante las enzimas DszA y DszC. La enzima DszD acopla la oxidación de NADH con la oxidación del sustrato en cada caso, mediante la reducción de FMN a FMNH<sub>2</sub>, necesario para las enzimas DszA y DszC, a través de una cinética de saturación (Oldfield y col., 1997; Gray y col., 1996). En algunos casos se ha comprobado que

el factor limitante de la velocidad es la actividad de esta enzima flavin-reductasa (Gray y col., 1997; Ohshiro y col., 1995; Gray y col., 1996; Gray y col., 1998).

El último paso de la ruta de desulfuración está catalizado por la enzima desulfinaasa de 40 kDa **DszB**, que rompe el enlace C-S entre el grupo fenilo y el grupo ácido sulfinico, formando HBP y sulfito. Nakayama y col. (2002) clonaron, expresaron y caracterizaron la enzima DszB de *R. erythropolis* KA2-5-1 y estudiaron la inactivación por mutación de un residuo aminoácido cisteína (Cys) a serina (Ser). Esta inactivación ocurre en todos los casos excepto en presencia de HPBS, HBP y 2-hidroxibifenil-2-sulfonato (HPBSO) (Watkins y col., 2003), lo que indica que el residuo de Cys juega un papel muy importante en la reacción enzimática. Esta reacción es inusual porque no se conoce ninguna otra enzima que catalice tal reacción, y parece ser limitante de la velocidad en la ruta, al ser la más lenta de las tres reacciones enzimáticas (McFarland y col., 1998; Ohshiro y col., 1999; Pacheco y col., 1999).

## **1.6. PROCESOS INDUSTRIALES de BIODESULFURACIÓN**

El principal obstáculo a la comercialización de la BDS viene dado por la velocidad a la que las células eliminan el azufre de los compuestos azufrados. Por ello se han llevado a cabo muchos estudios en los que se usan distintas técnicas para mejorar la velocidad y la extensión de la biodesulfuración con especies de *Rhodococcus* (Arensdorf y col., 2002; Coco y col., 2001), o se ha ampliado el rango de microorganismos recombinantes basados en el genoma de *R. erythropolis* IGTS8 (Rambosek y col., 1999; Pacheco, 1999). En algunos casos se han utilizado biocatalizadores a los que se había eliminado la acción de las enzimas DszA o DszB, de forma que se generan productos vendibles en el mercado y además se aumenta la velocidad de la reacción de desulfuración (Pacheco y col., 1999). En otros casos se ha reemplazado alguno de los genes de la ruta (Denis-Larose y col., 1999; Gray, 1996; Gallardo y col., 1997), lo que resulta en velocidades de desulfuración mayores. Entre los años 1999 y 2000 se ha incrementado 200 veces la actividad de los catalizadores recombinantes de biodesulfuración mediante la optimización de la producción del biocatalizador,

aumentando las concentraciones de las enzimas, u optimizando los requerimientos de la enzima DszD (Pacheco y col., 1999).

Existen tres formas de operación que pueden emplearse al llevar a cabo un proceso de BDS:

Uno de los sistemas que pueden emplearse es el de **células en crecimiento** (Omori y col., 1995; Rhee y col., 1998; Konishi y col., 1997; Wang y Krawiec, 1996); que consiste en crecer las células en el medio que se quiere desulfurar; es decir, paralelamente al crecimiento, el microorganismo realiza la desulfuración del compuesto de interés, al ser éste la única fuente de azufre del medio. De esta manera las células crecen en función de su capacidad de extraer el azufre de la fuente orgánica y las enzimas desulfurantes se mantienen en constante actividad; ésta es también la forma habitual para aislar células con capacidad desulfurante.

También se ha estudiado la BDS en sistemas con **extractos libres de células** (Ohshiro y col., 1994; Kevin y col., 1996; Oldfield y col., 1997), aunque en este caso en menor medida, ya que teniendo en cuenta la complejidad de este proceso, que utiliza al menos cuatro enzimas y dos cofactores, es difícil mantenerlas activas y es muy caro el suplemento de los cofactores.

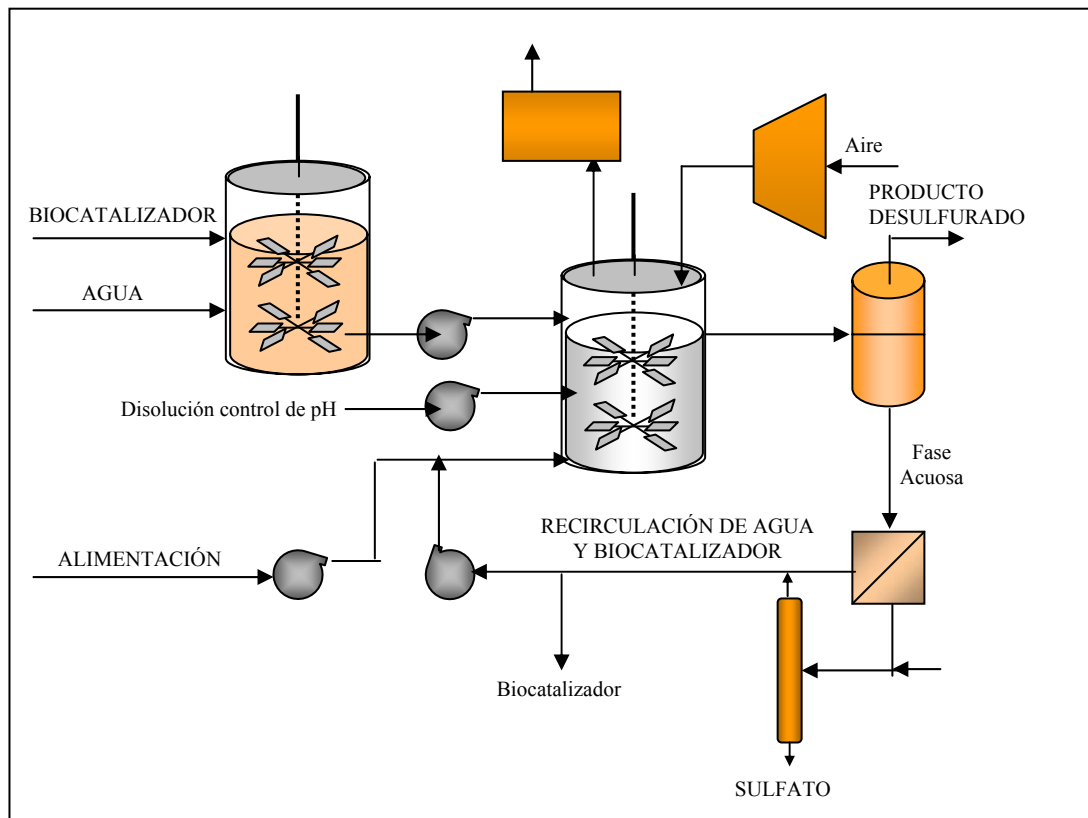
Otro sistema es el de **células en reposo o *resting cells***, a medio camino entre los sistemas de células en crecimiento y los sistemas con extractos libres de células (Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1993; Kayser y col., 1993; Konishi y col., 1997; Oldfield y col., 1997). En este caso, las células se crecen en un medio adecuado, donde se induce la síntesis de las enzimas de la ruta de desulfuración, una vez que alcanzan un punto concreto de su desarrollo, se retiran del medio, se lavan y se pueden almacenar hasta su posterior utilización. Este sistema tiene la característica de que las células tienen en su interior toda la maquinaria necesaria para la BDS, como si se tratase de un sistema de extractos libres de células, pero con la envoltura celular, que protege a las enzimas de la degradación por el ambiente extracelular y al mismo tiempo permite el paso de moléculas a su través.

El uso a gran escala de biocatalizadores presenta muchos retos. Varias empresas privadas y organizaciones públicas, junto con el *Departamento de Energía* de EE.UU. (DOE) y el *Petroleum Energy Center* (PEC) de Japón, han invertido, en los últimos años, 110 millones de dólares en la investigación y el desarrollo de procesos de biodesulfuración (Monticello, 1998). La empresa norteamericana *Enchira Biotechnology Corporation* (ENBC) –antes *Energy Biosystems Corporation*– ha construido y ha puesto en operación dos plantas piloto de biodesulfuración para diesel, una de 5 bdp en 1999 con un diesel refinado de la empresa *Total*, y otra de 5000 bpd en el año 2000, para *PetroStar*. En la Figura 1.16 se muestra un esquema de la planta piloto de 5 bpd puesta en marcha por ENBC.

Como la BDS implica una ruta metabólica de múltiples pasos, es necesario el uso de células con toda la maquinaria enzimática o metabólica. La reacción de biodesulfuración se lleva a cabo con las células enteras en reposo (*resting cells*), no crecen, pero tienen en su interior la mayor parte de las actividades enzimáticas de las células en crecimiento. Con células en reposo, las reacciones se pueden llevar a cabo empleando concentraciones celulares más altas que con células en crecimiento. La reacción tiene lugar en presencia de una fase acuosa que contiene al biocatalizador y la fuente de energía necesaria para asegurar el aporte fisiológico de electrones. En este sistema, el biocatalizador se introduce en un reactor tipo tanque agitado, al que también se alimenta petróleo (o una fracción), aire y una pequeña cantidad de agua. En el reactor, los compuestos aromáticos azufrados policíclicos se oxidan a productos solubles en agua y el azufre se segrega a la fase acuosa. Tras abandonar el reactor, la emulsión petróleo-agua-biocatalizador-azufre-coproducto se separa en dos corrientes: petróleo (que luego se procesa y se devuelve a la refinería) y la corriente agua-biocatalizador-azufre-coproducto. Es necesaria una segunda separación para permitir que la mayor parte del agua y del biocatalizador vuelvan al reactor para su reutilización. En esta planta se evaluaron varios esquemas de separación (Monticello, 1998), incluyendo tanques de sedimentación, membranas o centrífugas de baja velocidad. Se concluyó que la mejor opción era una combinación de todas estas tecnologías, viniendo determinada la configuración final por las condiciones en la refinería y



las propiedades físicas de la corriente de combustible. Sin embargo, el cambio de escala de este proceso ha sido bastante problemático (Pacheco y col., 1999). Los aspectos críticos del proceso incluyen el diseño del reactor, la recuperación del producto y la separación petróleo-agua.



**Figura 1.16.** Esquema del proceso de biodesulfuración de 5 bpd desarrollado por ENBC a nivel de planta piloto.

Las investigaciones que se han realizado en el área del diseño del biorreactor han usado reactores tipo tanque agitado, airlift, reactores de contacto en fase emulsionada y también de lecho fluidizado con células inmovilizadas (Pacheco y col., 1999; McFarland y col., 1998), aunque la mayoría de los estudios se han realizado en reactores tipo tanque agitado. El reactor de contacto en fase emulsionada se diseñó para crear gotas muy pequeñas y aumentar la superficie de contacto del biocatalizador con el producto a desulfurar (McFarland y col., 1998),

y el lecho fluidizado, por otro lado, tiene la ventaja de la inmovilización del biocatalizador en una matriz, lo que permite una operación en continuo y una fácil separación del producto. El problema de este tipo de reactor es que el biocatalizador requiere un mayor desarrollo para conseguir que esta técnica sea competitiva.

Por otra parte, la separación del combustible desulfurado del biocatalizador no es fácil. En el caso de biocatalizadores de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se forma una emulsión de gotas de 2-50  $\mu\text{m}$  muy estable entre el petróleo y las células (Borole y col., 2002). La naturaleza hidrófoba de *R. erythropolis* IGTS8 hace que las células se adhieran a la interfase petróleo-agua. Esto es una ventaja en cuanto a la velocidad de desulfuración porque se evitan las limitaciones por transferencia de materia, pero esta propiedad también hace que se dificulte la separación del combustible desulfurado del biocatalizador. La dificultad de romper estas emulsiones por centrifugación conduce a la invención de nuevos métodos de separación basados en membranas o hidrociclones (Chen y col., 1996; Yu y col., 1998).

Una barrera a la aceptación comercial de la BDS implica el manejo, envío, almacenamiento y uso de bacterias vivas en el campo de la producción. La comercialización del proceso de BDS de combustibles fósiles se encuentra en las primeras fases de desarrollo; se necesitarán varios años para que la economía del proceso sea competitiva con el hidrotreamiento convencional que se encuentra implantado en la mayoría de las refinerías. La HDS es una tecnología comprobada y con un coste aceptable, y la BDS debería ser vista como una tecnología complementaria (no reemplazante) a la HDS para la eliminación de las moléculas más recalcitrantes.

Este trabajo se va a centrar en la biodesulfuración de un compuesto modelo (DBT) en fase acuosa. Una vez conocidas las condiciones de producción del biocatalizador *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y de biodesulfuración de DBT en fase acuosa, sería necesario realizar un estudio en fase orgánica, la cual se asemeja más a la corriente a biodesulfurar en el proceso industrial.

### **1.6.1. Desarrollo del Proceso de BDS**

Para poder llevar a cabo un proceso que utilice microorganismos como catalizadores a nivel industrial, es necesario realizar un estudio de una serie de aspectos normalmente no considerados a nivel microbiológico, es decir, en el desarrollo del proceso a escala de laboratorio, como son los siguientes, y que se recogen de forma esquemática en la Figura 1.17. Hay que considerar que cada proceso presenta unas características específicas, que pueden influir tanto en el orden de realización de las etapas propuestas como en el desarrollo de las mismas.

- **Elección del Microorganismo:** en esta primera etapa se parte de microorganismos proporcionados por Microbiólogos o Biólogos Moleculares de los cuales se tiene, por tanto, una información preliminar, consistente en aspectos relativos tanto al crecimiento del mismo como a la generación y desarrollo de la capacidad metabólica de interés -formación del producto de interés o a la degradación del residuo-. Esta información se basa en el contenido genético del microorganismo, que puede ser tratarse de una cepa *salvaje*, o puede haber sido construido mediante modificación genética.

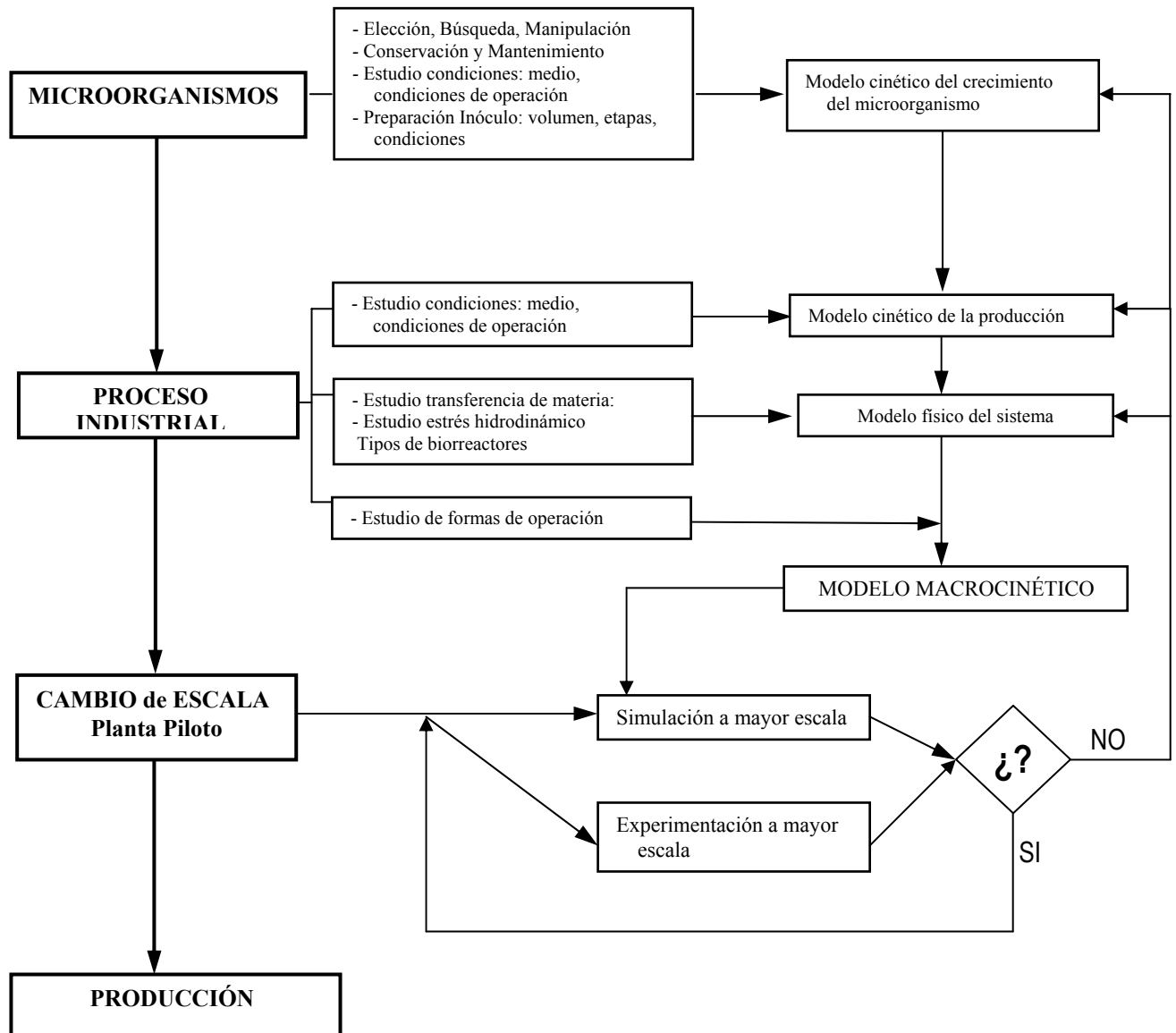
- **Métodos de Conservación:** es necesario desarrollar una metodología para mantener el microorganismo, de forma que los experimentos realizados con el mismo sean repetitivos y no dependan del método y tiempo de conservación y manipulación en el laboratorio. Aunque esta metodología está estandarizada en Microbiología, debido a que el planteamiento de los estudios en ese campo presenta un mayor componente cualitativo, la reproducibilidad experimental desde el punto de vista cuantitativo no se encuentra recogida en los métodos generales. Es absolutamente necesario emplear para cada caso el procedimiento más adecuado y acoplarlo en su forma óptima para el microorganismo con el que se trabaja. Esta etapa es especialmente delicada en el caso de microorganismos modificados genéticamente (GMO) que presentan mayor inestabilidad.

Esta etapa se realiza experimentalmente mediante siembra del microorganismo, por la técnica de agotamiento de asa, en medios de cultivo sólidos en placas Petri de características en principio generales –en el caso de

GMO se deben tener precauciones especiales en su preparación-, incubación en estufa de cultivo en condiciones preestablecidas (composición del medio sólido, temperatura) y durante un tiempo determinado hasta la aparición de colonias aisladas del microorganismo. Posteriormente, se procede a la conservación a 4°C durante tiempos generalmente no superiores a quince días.

Dentro de los métodos de conservación hay que incluir una etapa de preparación del inóculo en las diferentes escalas. Esta etapa se suele realizar pasando el microorganismo desde el medio sólido en que se encuentra conservado, a un medio líquido rico en nutrientes; el cultivo está estandarizado para ser utilizado como inóculo en experimentos de estudio del crecimiento microbiano y obtener así resultados reproducibles.

- **Crecimiento del Microorganismo:** esta etapa consiste en la determinación de las condiciones óptimas para la obtención del biocatalizador que realiza la transformación. En general se trata de minimizar la fase de latencia del crecimiento microbiano y maximizar la velocidad específica del mismo, siendo importante la cantidad de células obtenidas al finalizar la fase de crecimiento exponencial –concentración máxima de biomasa-. Para llevar a cabo esta etapa, se plantea el estudio de variables, tales como: composición del medio de crecimiento a emplear, optimización de las condiciones de operación (temperatura, pH, necesidad de oxígeno disuelto), grado de afectación de las células por el estrés hidrodinámico, etc. Con todo ello, se consigue un conocimiento bastante completo del crecimiento del microorganismo, siendo destacable la necesidad de realizar todo el proceso de forma sistemática para eliminar el componente “aleatorio” que presentan estos sistemas por el hecho de emplear seres vivos.



**Figura 1.17.** Esquema del procedimiento de I+D de procesos que emplean microorganismos como biocatalizadores.

- **Estudio de la Producción:** la etapa que se denomina de producción puede ser realmente la producción en sí de un metabolito (primario o secundario, lo que plantea diferencias en el modo de operación) o la utilización de una ruta específica metabólica del microorganismo para eliminar de forma selectiva algún compuesto contaminante o algún elemento químico indeseable de ciertas moléculas. En algunas ocasiones, el producto buscado es el propio microorganismo, o un producto que es necesario extraer de las células; en este caso, la producción

coincide con el crecimiento. Aunque el conocimiento previo o la información acerca de lo comentado anteriormente (normalmente aportada por microbiólogos o biólogos celulares) es de gran utilidad, en esta etapa se requiere el estudio sistemático de las variables que, en cada caso, se consideren necesarias, garantizando la reproducibilidad en la experimentación, como se ha comentado previamente. Esta cuestión no es trivial en los sistemas que emplean seres vivos como catalizadores.

Una vez conocidas o estudiadas las etapas anteriores, que se pueden denominar genéricamente *desarrollo del proceso*, es decir, determinadas unas condiciones en que el proceso transcurre a velocidad razonable, es necesario abordar el *estudio cinético* de los diferentes fenómenos o etapas que sean típicas en cada caso. Este estudio cinético puede esquematizarse como:

- **Descripción de la Velocidad de Crecimiento:** con el objeto de conocer con más profundidad la fenomenología del mismo, se debe plantear un modelo cinético del crecimiento del microorganismo capaz de describir de la forma más exacta posible y siempre que se considere necesario, que será una herramienta muy útil a la hora de describir o predecir el comportamiento del mismo en etapas posteriores. El tipo de modelo empleado estará en función de las necesidades de profundización que se requieran en la descripción cuantitativa del sistema en estudio. En general, se comienza con descripciones sencillas empleando modelos no estructurados, pero si la descripción requiere de mayor profundidad en la descripción de influencias de variables se recurre a modelos más complejos denominados estructurados y/o segregados. Si el metabolismo que se emplea en la producción del compuesto que interesa está relacionado con el crecimiento, esta etapa se realiza con mayor profundidad cuando se describe junto a la producción y al consumo de los sustratos principales implicados en la misma.

- **Descripción de la Velocidad de Producción:** una vez optimizadas las variables que influyen en el proceso de producción, se debe llevar a cabo la obtención del modelo cinético, integrado o no en el modelo anterior, que describa el sistema estudiado con la precisión que sea requerida, es decir, que sea capaz de incorporar las variables adecuadas o, lo que es lo mismo, de predecir el comportamiento del

sistema cuando se producen cambios en las principales variables de operación que afectan al proceso. Generalmente, se realiza inicialmente el planteamiento de modelos cinéticos sencillos (no estructurados), aumentando de forma paulatina la complejidad de los mismos según la capacidad de predicción que éstos presenten. Una vez conocido el modelo cinético que describe el sistema, se dispone de una de las herramientas básicas para el diseño del biorreactor.

- **Descripción de las Etapas de Transporte:** en general, de forma paralela al estudio de la producción correspondiente al punto comentado previamente, se realiza el estudio de los fenómenos de transferencia de materia importantes en cada tipo de sistema microbiano. Debido a que los citados sistemas son isotermos, la transmisión de calor no se suele abordar hasta que se requiere el diseño del sistema de intercambio de calor que se empleará en el reactor industrial, ya que generalmente a escala de laboratorio y varios estadíos de planta piloto los biorreactores presentan sistemas estándar de intercambio de calor para eliminar la generalmente escasa energía generada por el metabolismo microbiano que no es utilizada por las propias células.

En cuanto a la transferencia de materia, en general, debido a que la mayoría de los procesos microbianos necesitan oxígeno para realizarse, puesto que los microorganismos son mayoritariamente aerobios, se suele estudiar la transferencia de oxígeno en los diferentes dispositivos experimentales que se emplean, realizando experimentalmente la determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno en cada uno de ellos.

Según el proceso de que se trate, pueden ser necesarios otros estudios, una vez definidas los mejores valores de las variables experimentales y la influencia en la transformación realizada por el microorganismo. Estos estudios pueden referirse a la reutilización de las células, su inmovilización, interesante especialmente en el caso de que el metabolismo microbiano necesario para la transformación pueda realizarse en absoluta ausencia de crecimiento, es decir, cuando se emplea la forma de operación denominada como *resting cells*, por ejemplo. Finalmente, estos estudios se completarían con el estudio del proceso de

*downstream*, de aislamiento y purificación del producto deseado. Esta etapa es específica de cada sistema microbiano, ya que depende de factores tales como: tipo de microorganismo (unicelular o filamentoso), características del producto obtenido, concentración en el caldo (en la mayoría de los procesos, los compuestos obtenidos pueden no superar el 5% de concentración, y habitualmente es mucho menor), especificaciones o requisitos de pureza dependiendo de las aplicaciones del mismo, naturaleza y características de los subproductos o metabolitos presentes en el caldo, etc. Esta etapa de aislamiento y purificación, en general, se suele abordar experimentalmente de forma paralela a la producción; una vez determinadas las condiciones óptimas para llevarla a cabo, se han de determinar los mejores métodos de obtención del producto purificado, siendo necesario posteriormente un estudio pormenorizado del mismo. La etapa de cambio de escala requiere inicialmente un trabajo de predicción mediante simulación por ordenador, empleando los modelos previamente determinados y aplicando los criterios que por las características del sistema que se estudia parezcan los más apropiados. Esta etapa requiere experimentación en biorreactores, en principio comerciales, en los que se trata de comprobar experimentalmente la validez de los modelos obtenidos al emplear mayores tamaños. Una vez realizada la comprobación experimental, que puede servir para determinar cuál es la mejor regla a aplicar para el cambio de escala, la experimentación, previa simulación con los modelos en los que se habrán realizado las modificaciones pertinentes, se debe llevar a cabo en reactores de mayor tamaño, incluso reactores diseñados especialmente para llevar a cabo este proceso de aumento de tamaño en la transformación.

En el proceso de que trata esta Memoria, la biodesulfuración de DBT con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, no se conocen la mayoría de estos aspectos. Así, se ha llevado a cabo un estudio bibliográfico de la situación de los puntos anteriormente comentados:

En cuanto al **método de trabajo**, la mayoría de los autores trabajan en incubadora, empleando volúmenes de trabajo muy diferentes: desde tubo de ensayo con 5 mL de medio (Izumi y col., 1994, Omori y col., 1995; Ohshiro y col., 1996), Erlenmeyers de 100 mL con 50 mL de medio (Gilbert y col., 1998);



de 500 mL con 100 mL de medio (Omori y col., 1995); de 2 L con 250 mL de medio (Oldfield y col., 1997) o con 500 mL de medio (Izumi y col., 1994, Ohshiro y col., 1996). Hay muy pocos trabajos hechos en biorreactor, el equipo de Wang (Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1995) realiza pruebas en discontinuo, fed-batch y continuo en este tipo de equipos. Recientemente, el equipo de Folsom (Folsom y col., 1999) ha trabajado con productos de hidrodesulfuración en tanque agitado discontinuo. Kaufman y su equipo (Kaufman y col., 1999) han analizado la desulfuración de dos crudos también en reactor agitado discontinuo.

Debido a que el oxígeno disuelto tiene gran importancia en el proceso (tanto en el crecimiento, por ser microorganismos aerobios estrictos, como en la desulfuración, ya que la ruta 4S necesita oxígeno para realizar la degradación) no es trivial el método experimental empleado y los recipientes y volúmenes utilizados para llevar a cabo tanto el crecimiento como la desulfuración. En el caso de la utilización de matraces Erlenmeyer, la agitación es orbital (vaivén), mientras que los biorreactores son agitados mecánicamente. La etapa de desulfuración (*resting cells*) la realizan generalmente también en volúmenes pequeños, normalmente en tubo de ensayo (van Afferden y col., 1990; Izumi y col., 1994; Omori y col., 1995; Ohshiro y col., 1996), aunque también en Erlenmeyers de 2L (Oldfield y col., 1997).

Durante el **proceso de crecimiento** se puede comprobar también la influencia en la capacidad desulfurante desarrollada frente a otros factores, como son la composición del medio, las condiciones de operación y la fase o edad celular.

La composición del medio, en general no suele variar mucho en microelementos, pero se puede observar lo siguiente: En cuanto a la fuente de azufre a emplear durante el crecimiento, parece que existe bastante acuerdo respecto que el azufre inorgánico reprime la expresión de los genes responsables de la ruta 4S (Wang y Krawiec, 1996; Oldfield y col., 1997), por lo que generalmente emplean medios libres de azufre, usando en algunos casos agua

desionizada (Gallagher y col., 1993; Olfield y col., 1997). Posteriormente, se introduce una fuente de azufre que no reprima la ruta de biodesulfuración.

Kayser y col. (1993) realizaron un estudio del efecto de diferentes fuentes de azufre sobre el crecimiento y el poder desulfurante del microorganismo. Observaron que hay ciertas fuentes que no pueden ser empleadas para el crecimiento; otras que aunque son empleadas para el crecimiento (aminoácidos azufrados) no inducen la desulfuración, y otras que inhiben la desulfuración y no sirven como fuente de azufre.

En general, la mayoría de trabajos se decantan por el empleo de DBT, como compuesto modelo, y derivados de la ruta 4S (Pudy y col., 1993; Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1994; Wang y Krawiec, 1994 y 1996; Oldfield y col., 1997; Gilbert y col., 1998). La cepa debe emplear unos compuestos mejor que otros, ya que las conclusiones que se obtienen son variadas: en general, en todos los trabajos, el DBT soporta el crecimiento. En cuanto al empleo de dimetilsulfóxido (DMSO), únicamente existen tres referencias en la literatura que lo describan (Omori y col., 1995; Oldfield y col., 1997; Kayser y col., 1993), que afirman que no interfiere en la posterior desulfuración, ya que la expresión de la actividad desulfurante en presencia de DMSO es debida a la desrepresión del operón *dsz* en ausencia de otras fuentes que sí lo reprimen, tales como sulfuro, sulfato, metionina y cisteína (Li y col., 1996). Además, Omori y col. (1995) comentan que la etapa inicial de degradación de DMSO la cataliza el mismo sistema enzimático que para el DBT.

En lo referente a la fuente de carbono, no parece existir gran variedad, generalmente se emplea glicerol (Kayser y col., 1993; Gallagher y col., 1993; Gilbert y col., 1998) o glucosa (Omori y col., 1992; Izumi y col., 1994; Lee y col., 1995; Oldfield y col., 1997). Otros autores emplean otras fuentes como fructosa (Gilbert y col., 1998), etanol (Omori y col., 1992), succinato sódico (Omori y col., 1995) o acetato sódico (Lee y col., 1995). Pero en ningún caso se encuentra ningún estudio comparativo de la bondad de emplear unas fuentes u otras.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, en general, se emplea cloruro amónico (Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1994, Ohshiro y col., 1994 y 1996; Oldfield

y col., 1997; Gilbert y col., 1998) en concentración de 2 g/L, aunque hay autores que emplean nitrato amónico (Omori y col., 1995).

Sobre las **condiciones de operación** durante el crecimiento, las principales variables en los estudios de crecimiento del microorganismo son la temperatura y el pH, ya que, como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de los trabajos se han realizado en incubadora, no prestando atención a la concentración de oxígeno disuelto. En el caso del trabajo en biorreactor (Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1996) las variables que influyen en el transporte de oxígeno se fijan en 300 rpm y 1,5 L/L/min, empleando volúmenes de trabajo de 0,355 L y 1,5 L.

La temperatura empleada es, la mayoría de las veces, 30°C (Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1994; Omori y col., 1995; Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1996; Ohshiro y col., 1994 y 1996; Oldfield y col., 1997; Gilbert y col., 1998), sólo en algún caso se emplea 25°C (Wang y Krawiec, 1994 y 1996). Estos últimos autores, que son de los pocos que emplean biorreactor, hay que destacar que emplean temperaturas diferentes en crecimiento en incubadora (25°C) que cuando lo realizan en fermentador (30°C).

Otra variable que podría influir en el proceso es el pH, sin embargo no hay muchos autores que hagan referencia a ello: Ohshiro y col. (1996) observan un descenso en el valor del pH durante el crecimiento, que llega hasta valores entre 4 y 5,6, dependiendo de la fuente de azufre empleada (DBT y derivados), siendo la fuente de carbono utilizada por estos autores la glucosa. En el caso de emplear DBT, el valor de pH alcanzado es 4. El equipo de Wang (Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1996) estudia la influencia del pH a nivel de incubadora, tanto en el crecimiento como en la desulfuración (tomado como consumo de DBT durante el crecimiento), empleando tampón fosfato, ajustando el pH a valores entre 5 y 7, haciendo experimentos cada 0,5 unidades de pH. Llegan a la conclusión de que el valor óptimo es ligeramente diferente en cada caso: mientras que para el crecimiento parece óptimo el valor de 6,5, para la desulfuración proponen un valor de 6; sin embargo, debido a la pequeña diferencia en los resultados, deciden dejarlo fijo en un valor de 6, de forma que cuando trabajan en biorreactor controlan esta variable en dicho valor. Es de destacar que afirman que la bajada

de pH va unida a la aparición de HBP. No obstante, no hay acuerdo en cuanto al valor inicial del pH en el medio de crecimiento. Izumi y col. (1994) y Oshiro y col. (1996) emplean un medio con pH 7,5; Gallagher y col. (1993) emplea un medio con pH 6,5; Oldfield y col. (1997) y Omori y col. (1995) parten de un pH de 7,2.

En cuanto al estudio del transporte y consumo de oxígeno disuelto, no existe ningún trabajo en que se haya realizado tal estudio. Incluso, la mayoría de los autores trabajan en incubadora, por lo que no conocen la concentración de oxígeno disuelto durante el crecimiento del microorganismo, ni durante la etapa de desulfuración.

También hay que tener en cuenta la influencia de la fase de crecimiento del microorganismo cuando lo que se realiza es desulfuración en *resting cells*. Es decir, cómo se ve afectado el rendimiento en la desulfuración en función de la fase y el estado en el que se encuentran las células que son utilizadas en el ensayo. Hay autores que realizan *resting cells* con células que se encuentran en el final de la fase exponencial (Oldfield y col., 1997; Konishi y col., 1997), otros realizan el ensayo con células crecidas durante tres días (Omori y col., 1995) o durante dos días (Izumi y col., 1993) Sin embargo, no hay ningún estudio que analice la variación del rendimiento en la desulfuración a lo largo de las fases de crecimiento del microorganismo (que debe cambiar, en principio, debido a la actividad enzimática que se irá acumulando).

En cuanto al **proceso de biodesulfuración**, no ha sido estudiado ni optimizado como tal proceso, sino que se ha utilizado siempre como test de desulfuración o para llevar a cabo el estudio de la ruta 4S (determinación de compuestos). Por otra parte, hay autores que estudian a la vez el crecimiento del microorganismo y su capacidad desulfurante, es decir, realizan el crecimiento en DBT y miden la desulfuración durante el crecimiento (Omori y col., 1992; Kilbane y col., 1992; Wang y Krawiec, 1994 y 1996; Omori y col., 1995; Ohshiro y col., 1996; Honda y col., 1998; Setti y col., 1999; Folsom y col., 1999; Yan y col., 2000), mientras que otros realizan ambos procesos –el de crecimiento y la

desulfuración- por separado, llevando a cabo la desulfuración en condiciones de *resting cells* (Olson y col., 1993; Gallagher y col., 1993; Oldfield y col., 1997; Konishi y col., 1997; Kaufman y col., 1999; Kishimoto y col., 2000; Onaka y col., 2000; Maghsoudi y col., 2001; Kobayashi y col., 2001; Matsui y col., 2001). Otros, por el contrario, llevan a cabo el proceso de desulfuración en sistemas libres de células (Gray y col., 1996; Xi y col., 1997; Ohshiro y col., 1999; Nakayama y col., 2002), con extractos celulares, para realizar estudios de actividades enzimáticas.

Respecto al desarrollo de modelos cinéticos, la mayoría de los autores no realizan un estudio cinético de las velocidades de crecimiento y de producción. Solamente Wang y Krawiec (1996) obtuvieron un modelo de crecimiento para *R. erythropolis* N1-36, basado en la ecuación de Monod, empleando un sistema continuo; y determinaron los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento de las células, la constante de afinidad por el sustrato y el coeficiente de rendimiento en biomasa) en el caso en que la fuente de azufre (DBTO<sub>2</sub>) era limitante. Por otro lado, Gray y col. (1996) realizaron un estudio cinético de la ruta de desulfuración y supusieron un modelo de reacción en dos etapas consecutivas para las dos primeras reacciones. Ajustaron los datos experimentales a este modelo y obtuvieron que los valores de las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  eran 0,06 y 0,5 min<sup>-1</sup>, respectivamente, lo que indicaba que la segunda etapa era unas 10 veces más rápida que la primera. Nakayama y col. (2002) y Watkins y col. (2003) suponen también un modelo cinético de producción, obteniendo así parámetros cinéticos para ese modelo.

## ***2. MATERIALES y MÉTODOS***

## **2. MATERIALES y MÉTODOS**

El trabajo descrito en esta Memoria ha precisado de la utilización y puesta a punto de diversas técnicas, tanto de experimentación como de análisis; a continuación se detallan cada una de ellas, así como los equipos y los materiales que han sido empleados.

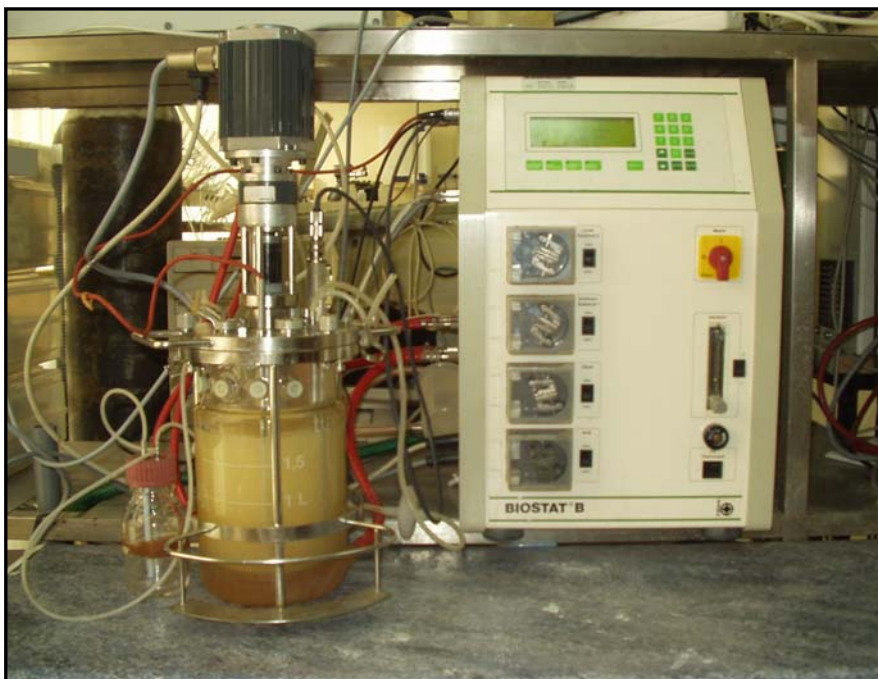
### **2.1. EQUIPOS**

En este apartado se describen los equipos e instalaciones necesarios para llevar a cabo la experimentación realizada en este trabajo.

Para obtener datos experimentales se han realizado experimentos en fermentadores comerciales, empleando incubadoras orbitales para la preparación de inóculos y para la realización de ensayos de biodesulfuración (test de biodesulfuración). Además ha sido necesaria la utilización de otros equipos y se ha dispuesto de gran número de aparatos de medida para analizar la evolución de los diferentes componentes del sistema objeto de estudio.

### **Fermentador Comercial**

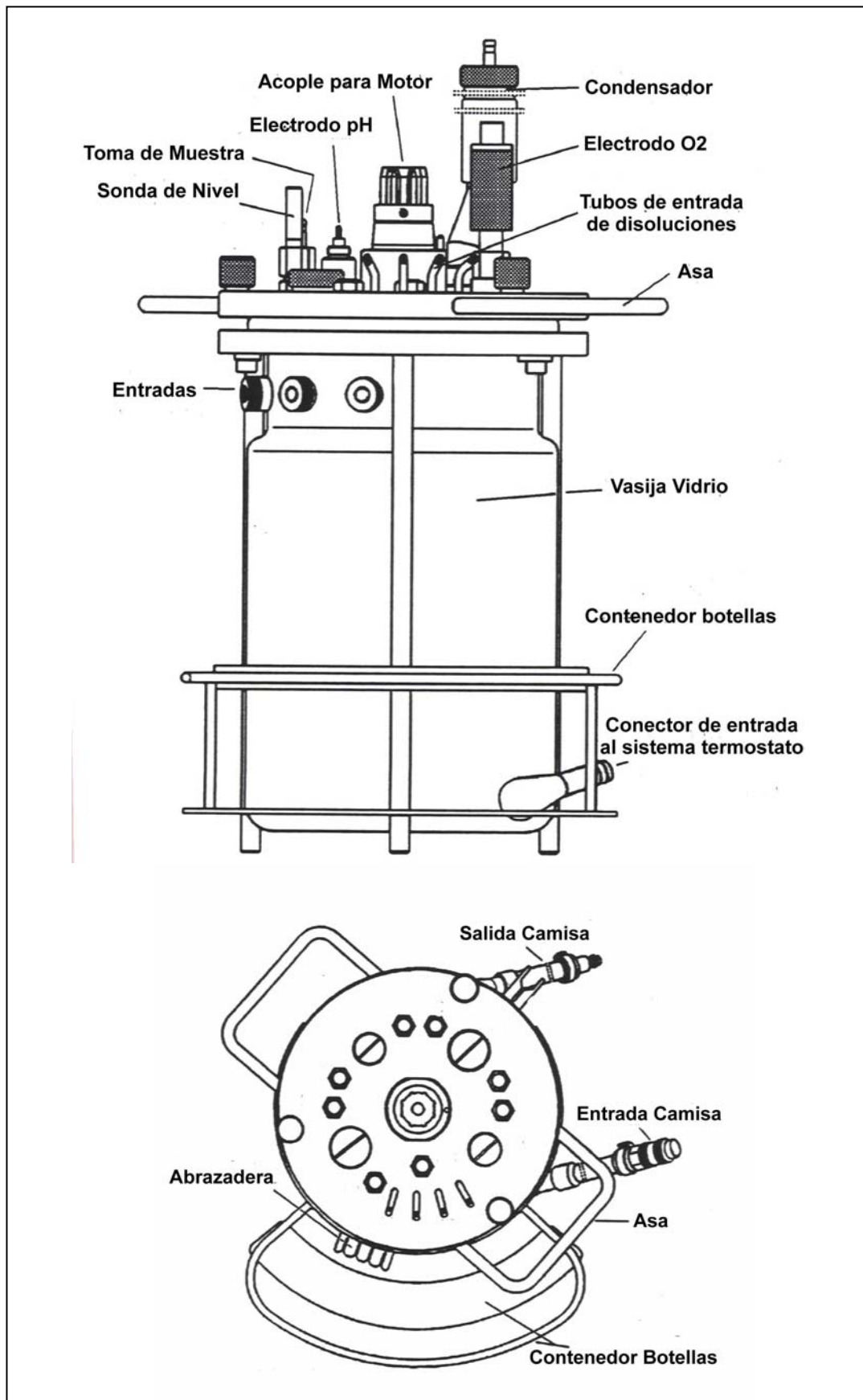
El proceso de fermentación con el microorganismo se ha llevado a cabo en un biorreactor BIOSTAT® B de tipo tanque agitado, diseñado y comercializado por B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL. Está constituido por un tanque de cultivo y una unidad con sistema de medida, control y regulación de pH, temperatura, velocidad de agitación y concentración de oxígeno disuelto. En la Figura 2.1 se muestra un esquema del biorreactor empleado.



**Figura 2.1.** Fotografía del biorreactor empleado y de la unidad de suministro.

*Tanque de Cultivo:* Está realizado en vidrio de borosilicato, con un volumen total de 3L y un volumen máximo de trabajo de 2L. Está constituido por una doble pared de vidrio y una tapa de acero inoxidable provista de 2 orificios de 19 mm de diámetro, 2 orificios de 12 mm de diámetro y 8 orificios de 6 mm de diámetro, como se detalla en la Figura 2.2.





**Figura 2.2.** Esquema del tanque de cultivo empleado y vista superior de la tapa metálica con sus orificios.

*Sistema de Medida y Control de la Temperatura:* El fermentador BIOSTAT® B está equipado con un controlador digital PID. La temperatura del medio de cultivo, medida con un sensor de Pt-100 actúa como consigna por el control de temperatura, actuando sobre la válvula de refrigeración y la resistencia eléctrica de 600W. La temperatura de operación es seleccionada y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0,1°C. El intervalo de medida se encuentra entre 0 y 100°C.

*Sistema de Medida y Control de la Agitación:* La velocidad de agitación del fermentador BIOSTAT® B se controla mediante un controlador digital PID ajustando la velocidad a través de un motor de 180W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de seis palas planas. La velocidad de agitación se mide con un tacómetro ajustable entre 0 y 1200 rpm, con una resolución de 10 rpm.

La aireación del caldo se consigue suministrando aire, por burbujeo, mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0,2 µm, para conseguir la esterilización del aire que se introduce en el reactor. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal. El caudal de aire es ajustado mediante una válvula y medido por un rotámetro; se puede regular automáticamente, cuando se trata de controlar la concentración de oxígeno en el líquido.

*Sistema de Medida y Control del pH:* Se realiza también con un controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base en función de la señal de medida, previamente amplificada. Se utiliza un electrodo INGOLD, cuyo rango de medida varía entre 2 a 12 unidades de pH. La calibración se realiza con un sensor digital.

*Sistema de Medida y Control del Oxígeno Disuelto:* Hay dos tipos de controlador, dependiendo del proceso. Se pueden seguir las siguientes estrategias de control:

- control digital PID del oxígeno disuelto en cascada, actuando directamente sobre la velocidad de agitación, es decir, sobre la velocidad de giro del agitador.
- controlador *Gasmix*, en cuyo caso el sistema de medida y control puede controlar la presión de oxígeno disuelto actuando sobre la válvula de

entrada de una mezcla de N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, cambiando la composición del “aire alimentado”.

La medida de la concentración de oxígeno disuelto se realiza con un electrodo esterilizable INGOLD, cuyo rango de medida varía entre 0 y 100%. La calibración se realiza con un sensor digital.

### **Balanza de precisión**

Para la cuantificación del peso de los diferentes compuestos empleados se ha utilizado una balanza digital marca SARTORIUS, modelo Handy. Esta balanza permite obtener pesadas del orden de miligramos con una fiabilidad de  $\pm 0,1$  mg.

### **Cámara de flujo**

La manipulación de la bacteria se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad empleando una cámara de flujo laminar vertical marca TELSTAR, modelo Micro-V, capaz de alcanzar una velocidad de impulsión de 0,45 m/ s.

### **Estufa de cultivo**

Se ha utilizado una estufa bacteriológica de convección natural de la casa SELECTA, modelo 2000207. Su estabilidad es de  $\pm 0,5\%$  y tiene una homogeneidad de  $\pm 2,5\%$ . Permite regular la temperatura en un intervalo de 5 a 60°C.

### **Autoclave**

La esterilización de todos los materiales y medios empleados se ha realizado en un autoclave de la marca RAYPA, serie “Sterilmatic-C”, modelo AE-110, de 100 L de capacidad.

### **Incubadora orbital**

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

- Intervalo de temperatura: 5°C a 70°C.
- Fluctuación de temperatura en su interior:  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ .
- Variación máxima de temperatura:  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ .
- Intervalo de velocidad de agitación: 0-400 rpm.
- Radio orbital: 32 mm.
- Capacidad: 30 Erlenmeyers de 250 mL.

### **Estufa de secado y esterilización**

La estufa es de la firma SELECTA, modelo S-202 y cuenta con termómetro de referencia, termostato de regulación de la temperatura y termostato de seguridad. La temperatura se puede regular en un intervalo de temperatura de 40-200 °C, con una estabilidad del 0,5%

### **pH-metro**

Se ha utilizado un pH-metro de la casa ORION, modelo 720 A, con electrodo de cuerpo de cristal y de aplicación general, con intervalo de medida de 0 a 14 unidades de pH.

### **Electrodo de amonio**

Para la medida de la concentración del nutriente nitrogenado disuelto se ha utilizado un analizador electro-químico marca ORION, modelo 720 A. La medida se realiza por desplazamiento del amonio contenido en las muestra al aumentar el pH. Las moléculas de amonio en disolución pasan a amoniaco y éste atraviesa la membrana selectiva del electrodo. El amoniaco que se introduce en el electrodo es capaz de producir una señal eléctrica que, una vez analizada y comparada con la

curva de calibrado, proporciona la medida de la concentración de amonio. El intervalo de la concentración puede variar entre  $5 \cdot 10^{-7}$  M y 1 M.

### **Espectrofotómetro de absorción en el ultravioleta y en el visible**

La medida de absorbancia de las muestras se ha realizado en un espectrofotómetro UV/ VIS de la firma SHIMADZU, modelo UV 1603. Las características técnicas que reúne son las descritas a continuación:

- Intervalo de medida de la longitud de onda: 190-1100 nm.
- Anchura de banda espectral: 2 nm.
- Lámpara de Deuterio (lámpara D2), la fuente de la luz está en el intervalo del ultravioleta.
- Lámpara Halógena de Tungsteno (lámpara WI), la fuente de luz está en el intervalo del visible y el infrarrojo próximo.

### **Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución ( HPLC )**

Se han empleado dos equipos con diferentes tipos de detector, el primero de ellos es de la marca KONTRON, modelo SEDEX 45, con detector de dispersión de luz. El equipo consta de los siguientes elementos:

- La *bomba* es de la firma KONTRON INSTRUMENTS (325 System). Puede trabajar tanto en régimen isocrático como en gradiente, tanto de caudal como de composición, ya que está dotado de un mezclador de tres canales. Tiene un caudal de 0,1 a 5 mL/min y puede trabajar a una presión entre 1 y 450 bar.
- El *inyector automático* es de KONTRON INSTRUMENTS-360, se caracteriza por la capacidad para 60 viales de 2 mL. Además, ofrece la posibilidad de termostatar las muestras y variar la cantidad de muestra inyectada.

- El *horno* (PERKIN-ELMER, LC-100) mantiene la temperatura 5°C por encima de la ambiental hasta 99°C, con una precisión de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Está diseñado para poder introducir dos columnas de cromatografía de una longitud máxima de 350 mm. La transferencia de calor dentro del horno se realiza por convección forzada de aire caliente.
- Se utilizó un *detector de dispersión de luz* (light scattering) de la marca SEDEX 45, basado en la dispersión de luz que se produce cuando incide un rayo sobre un nebulizado que contiene la muestra a analizar.

El segundo equipo empleado es de la marca Hewlett-Packard serie 1100 con detector UV que incorpora *diode array*. Este aparato consta de varias partes:

- Una *bomba* que permite introducir automáticamente el caudal del eluyente que se desee que atraviese la columna. En el presente estudio, los eluyentes utilizados han sido agua milli-Q y acetonitrilo puro.
- El *sistema de inyección* de trazador que consta de un portaviales en el que se introducen los viales con la muestra de trazador a la concentración deseada. En el momento en que se desee realizar la inyección, el aparato toma el vial y lo desplaza hasta donde se encuentra la jeringa, que toma la cantidad indicada de muestra y la introduce en una válvula de seis vías. Mediante un giro en la posición de ésta, la inyección de trazador es arrastrada por el eluyente e introducida en la columna.
- El *horno* en el que se introduce la columna y que permite mantener una temperatura constante.
- El *detector* utilizado es un detector UV-*diode array*. Consta de una lámpara de ultravioleta que ha de estabilizarse antes de comenzar el análisis. Por la diferencia entre la intensidad de luz emitida por la lámpara y la intensidad de luz recibida por el detector, se calcula la absorbancia de la muestra y la relaciona con su concentración. El detector resta la señal del eluyente (si éste produce alguna), por lo que la línea de base es

mantenida en el valor cero. Este equipo permite obtener el espectro de una muestra en todo el intervalo del UV.

### **Centrífuga**

Para la centrifugación de muestras se ha empleado una centrífuga de mesa refrigerada programable de la marca SIGMA, modelo 4K15. El intervalo de temperatura es de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $+40^{\circ}\text{C}$ . Esta centrífuga dispone de los siguientes rotores intercambiables:

- Rotor de botes 6x250 mL, con aceleración máxima de 13130 g.
- Rotor de tubos 20x10 mL, con aceleración máxima de 21480 g.
- Rotor de Eppendorf 30x1,5-2,2 mL, con aceleración máxima de 25160 g.

### **Ultrasonidos**

Para favorecer la disolución de ciertos reactivos así como para desgasificar los disolventes para HPLC se ha empleado una unidad de ultrasonidos, de la firma SELECTA, dotada de un baño termostatzado con control de temperatura.

## **2.1. MATERIALES EMPLEADOS**

### **2.2.1. Microorganismo**

El microorganismo utilizado ha sido *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, suministrado por el Dr. José Luis García López, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid).

### **2.2.2. Reactivos utilizados**

En la Tabla 2.1 se muestran los reactivos empleados para la conservación, mantenimiento y crecimiento del microorganismo. En la Tabla 2.2 aparecen los reactivos empleados en el análisis de la fuente de nitrógeno, de azufre y de

carbono. En la Tabla 2.3 se recogen los reactivos utilizados en la medida del poder desulfurante en los ensayos de resting cells.

**Tabla 2.1.** Reactivos empleados para formular los medios de crecimiento y mantenimiento del microorganismo.

COMPUESTO	MARCA	PUREZA	CÓDIGO
Agar-agar	FLUKA	-	05039
Extracto de levadura	FLUKA	-	70171
Tryptona	FLUKA	-	70194
NaCl	FLUKA	> 99,5%	71379
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	MERCK	> 99,5%	A125790908
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	PANREAC	Puro	141512
NH <sub>4</sub> Cl	PROBUS	Puro	020210
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	PROBUS	> 95%	120410
CaCl <sub>2</sub>	RIEDEL-DE HAËN	> 95%	12018
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	RIEDEL-DE HAËN	> 99%	31232
Tris Hidroximetil aminometano	PANREAC	Puro	33742
Ácido L-Glutámico	MERCK	99,5%	1.03090.1000
Ácido cítrico anhidro	PANREAC	Puro	141808
D(+)-Glucosa	RIEDEL-DE HAËN	Puro	16325
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	PROBUS	Puro	121310
Dibenzotiofeno	ALDRICH	Puro	34,783-3
Dimetilsulfóxido	SIGMA	Puro	D-8511
Glicerol	PANREAC	Puro	211339



**Tabla 2.2.** Reactivos empleados para el análisis de la fuente de nitrógeno, carbono y azufre.

COMPUESTO	MARCA	PUREZA	CÓDIGO
NaOH	RIEDEL-DE HAËN	99%	30620
di-Sodio EDTA	RIEDEL-DE HAËN	-	64073
Electrolito de amonio	METTLER TOLEDO	-	152231000
Metanol	RIEDEL-DE HAËN	99,8%	32213
Acetonitrilo	RIEDEL-DE HAËN	> 99,8	34881
D(+)-Glucosa	RIEDEL-DE HAËN	Puro	16325
Dibenzotiofeno	ALDRICH	99%	34,783-3
Dimetilsulfóxido	SIGMA	Puro	D-8511

**Tabla 2.3.** Reactivos utilizados en la medida del poder desulfurante en resting cells.

COMPUESTO	MARCA	PUREZA	CÓDIGO
Dibenzotiofeno (DBT)	ALDRICH	99%	34,783-3
Dibenzotiofeno Sulfóxido (DBTO)	Sintetizado por el Grupo de Investigación		
Dibenzotiofeno Sulfona (DBTO <sub>2</sub> )	ALDRICH	99%	43,256-5
2-hidroxibifenil (HBP)	ALDRICH	99%	P2,826-3
2-isopropanol	PANREAC	99,8%	131090
Acetonitrilo	RIEDEL-DE HAËN	> 99,8%	34881

### **2.2.2.1. Síntesis de Reactivos no Comerciales**

Debido a que el compuesto DBTO no es comercial, ha sido necesario realizar la síntesis de dicho compuesto en nuestro laboratorio.

#### *Dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO)*

Se introduce una disolución de DBT (5 g, 27.17 mmoles) en 60 ml de metanol en un matraz de tres bocas equipado con un condensador de reflujo, un embudo de goteo y tubos de entrada y salida de nitrógeno. Este matraz se mantiene a 64°C en un baño de cloroformo/nitrógeno líquido. Se añaden 3g de hipoclorito de t-butilo (27,65 mmoles), que se prepara, a su vez, por reacción del alcohol t-butílico a 0°C con 1 equivalente de una disolución comercial de hipoclorito de sodio y 1 equivalente de ácido acético. Tras esto, 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. Después, se añade carbonato de sodio anhidro (3g, preparado por secado a 210°C durante 12 h) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente, con agitación. La disolución se filtra y se elimina el metanol en un rotavapor. El sólido blanco obtenido (5,16 g, rdto.: 95 %) se recristaliza con metanol. Este producto se analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, detector MSD 5973), para lo cual se utiliza una columna HP-INNOWAX (Crosslinked PEG) 30 m x 0,25 mm con partículas de 0.25 µm de diámetro, en las siguientes condiciones: Gas portador Helio 1,8 mL/min, T<sub>i</sub>=250°C, T<sub>d</sub>=230°C, Horno (T<sub>0</sub>=200 °C, 1 min, velocidad=25 °C/min, T<sub>1</sub>=220°C, 3 min, velocidad=3°C/min, T<sub>2</sub>=250°C, 20 min, tiempo total=34,8 min), relación de split=40:1. El análisis por GC-MS del producto indicó DBT-sulfóxido con una pureza mayor del 90%.

### **2.2.3. Composición de los Medios Empleados**

Para la obtención del inóculo, se ha empleado un medio complejo: LB (Luria-Bertani). Para el medio de crecimiento, se ha cultivado *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en un medio estándar (BSM). Para estudiar la capacidad de

desulfuración desarrollada por el microorganismos durante el crecimiento se ha empleado tampón Hepes al que se le adiciona el compuesto modelo DBT (25  $\mu$ M).

Estos medios tienen la siguiente composición:

- Disoluciones Tampón

<b>Tampón TRIS-EDTA</b>	{	Tris Hidroximetil Aminometano .....0,1 M
		NaCl.....0,1 M
		pH ajustado a 7,5 con HCl

<b>Tampón HEPES</b>	{	[N-2-Hidroxietil]piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico) 50 mM
		pH ajustado a 8 con NaOH

- Medio complejo de crecimiento

<b>LB</b>	{	Extracto de levadura.....5 g/L
		Triptona.....10 g/L
		NaCl.....10 g/L

- Medio sintético de crecimiento

<b>BSM</b>	{	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O.....4 g/L
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....3,053 g/L
		MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O.....0,0245 g/L
		CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O..... 0,001 g/L
		Glicerol.....2 g/L
		FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O.....0,001 g/L

## **2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

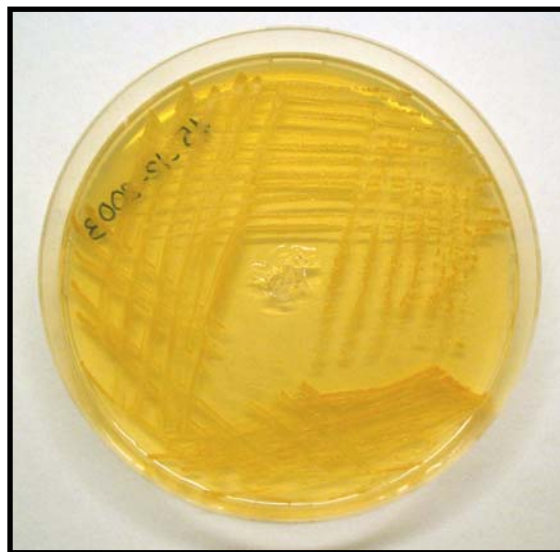
La primera etapa para poder abordar el estudio de cualquier proceso microbiano es desarrollar un procedimiento para el manejo del microorganismo a emplear (conservación y mantenimiento) y desarrollar métodos experimentales estandarizados (preparación de inóculos, forma de realizar experimentos a nivel de incubadora, de fermentador, etc.), para realizar posteriormente experimentos que sean repetitivos, disminuyendo, en la medida de lo posible, el error experimental que conlleva el trabajo con células vivas.

Para ello, ha sido necesario aprender a manipular el microorganismo empleado en este trabajo, *Rhodococcus erythropolis*, desarrollando procedimientos (protocolos) de conservación, manipulación, crecimiento y biodesulfuración en *resting cells*. En cuanto al protocolo de conservación, éste es necesario debido a que el microorganismo utilizado sufre procesos de envejecimiento durante su mantenimiento, y este proceso puede afectar a la fase posterior de crecimiento del mismo. Por esta razón se debe desarrollar un método que permita dar reproducibilidad a los experimentos realizados. Con respecto a la manipulación del microorganismo, ésta se debe realizar siempre bajo condiciones estériles (en cámara de flujo) para evitar contaminaciones en los cultivos. Y en cuanto a las etapas de crecimiento y biodesulfuración, se deben llevar a cabo también según los protocolos descritos para evitar errores experimentales que darían lugar a resultados erróneos. Además, se debe tener en cuenta que, en este trabajo, el proceso global se lleva a cabo en dos etapas: crecimiento y biodesulfuración, por lo que hay que estandarizar también el método de conservación del microorganismo obtenido en la etapa de crecimiento y que va a ser utilizado después como biocatalizador en la etapa de biodesulfuración. Todos estos procedimientos que se han comentado, se describen a continuación.

### **2.3.1. Conservación y Mantenimiento**

Para conservar el microorganismo se han utilizado dos métodos, según se desee mantenerlo durante un plazo de tiempo corto o relativamente largo.

- **A largo plazo**: se conserva el microorganismo por congelación en stocks concentrados. Para ello, se crece al microorganismo en medio LB a 30 °C y, cuando se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, se separa por centrifugación, el caldo de las células. Después, las células se resuspenden en glicerina al 0,99% y se congelan a una temperatura de -25°C. De esta forma, el microorganismo se conserva durante unos 3 meses; transcurrido ese plazo se renueva el cultivo creciendo de nuevo el microorganismo en medio LB y repitiendo el mismo procedimiento.
- **A corto plazo**: se transfiere un loop de un cultivo de *Rhodococcus sp.* con un asa de siembra a placas con medio LB-Agar, como la que se muestra en el Figura 2.3, que son incubadas durante un periodo de 48 a 72 horas en estufa de incubación a 30° C, manteniendo posteriormente la placa a 4° C durante un período de 14 días como máximo. Tras ese tiempo, se renueva el cultivo trasasándolo a otra placa con medio LB-agar fresco.



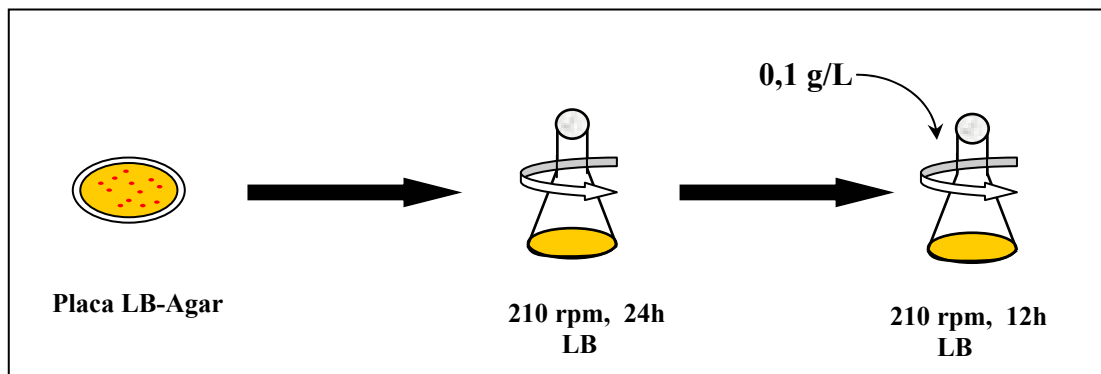
**Figura 2.3.** Fotografía de una placa con medio LB-Agar en la que se ha cultivado *Rhodococcus erythropolis*.

### **2.3.2. Preparación del Inóculo**

Como ya se ha indicado, se ha partido de placas con medio LB-Agar, en las que se ha conservado el microorganismo a corto plazo.

El preinóculo se prepara inoculando matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio LB de la siguiente manera: con un asa de siembra, y en un ambiente estéril producido por la llama de un mechero *Bunsen*, se traspasa al matraz Erlenmeyer un *loop* del microorganismo procedente de una placa de LB-Agar y se incuba en incubadora orbital a 30°C y 210 rpm durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se mide la concentración de células en el matraz, y en base a ello, se inocula en otro matraz Erlenmeyer con 50 mL de LB, una concentración inicial de microorganismo de 0,1 g/L. Este segundo matraz Erlenmeyer se incuba durante 12 horas a 30°C y 210 rpm en la misma incubadora orbital.

Este cultivo es luego empleado como inóculo para los experimentos de crecimiento llevados a cabo en biorreactor, según se esquematiza en la Figura 2.4.

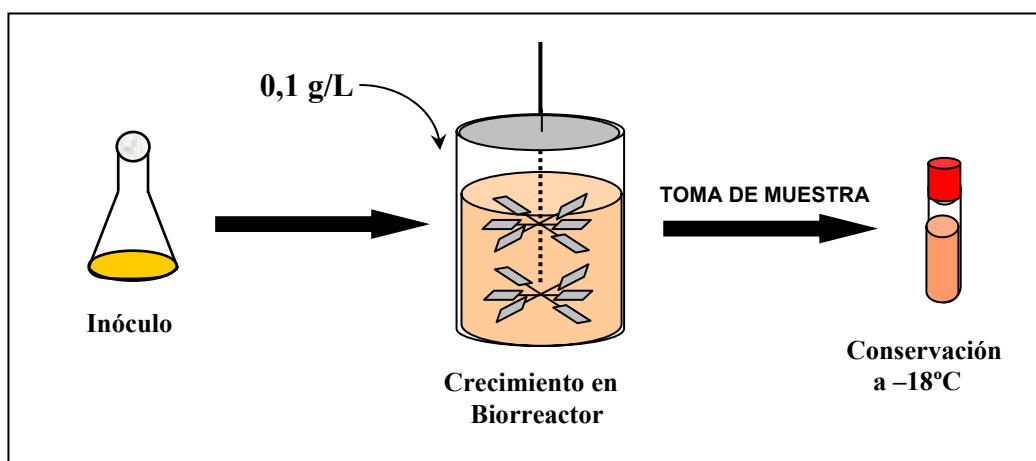


**Figura 2.4.** Esquema del procedimiento experimental para el proceso de preparación del inóculo.

### 2.3.3. Proceso de Crecimiento

Para los estudios sobre la influencia de los diferentes nutrientes en el crecimiento, se ha utilizado el medio mínimo, denominado BSM, como medio de cultivo. Los experimentos se han llevado a cabo en un Biorreactor comercial (Braun BIOSTAT® B, Biotech) de 2L de volumen de trabajo con control de temperatura, de pH y de oxígeno disuelto, al cual se inocula el volumen necesario de microorganismo en medio LB, procedente del inóculo preparado en el paso anterior. En todos los experimentos se fija una concentración inicial de 0,1 g/L.

Las condiciones de operación utilizadas han sido las siguientes: temperatura de 30°C, cuando se estudia la influencia de los distintos sustratos, del pH y de oxígeno disuelto, caudal de oxígeno de 1 L/Lmin (cuando se estudian los distintos sustratos, pH y temperatura), porcentaje de saturación de oxígeno inicial 100%, y velocidad de agitación de 100 rpm inicial (cuando se estudia la influencia de los sustratos, pH y temperatura); esta agitación se ha ido aumentando para compensar la bajada de oxígeno, cuando se llegaba a un 10 % de saturación en oxígeno disuelto. A distintos tiempos, durante el crecimiento, se toman muestras de 50 mL del cultivo del biorreactor para análisis posteriores. Este volumen de muestra se centrifuga en botes de 250 mL, con el fin de separar el caldo de las células. Éstas se resuspenden en una disolución de glicerol al 50% y se conservan a -18°C. El procedimiento se resume en la Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Esquema del procedimiento experimental para el crecimiento del microorganismo.

### 2.3.4. Anál isis de la Capacidad de Desulfuración

Para medir la capacidad desulfurante desarrollada por el microorganismo a lo largo del crecimiento, se ha utilizado un ensayo estándar, basado en poner en contacto las bacterias, en forma de células en reposo (*resting cells*), con una disolución de DBT 25 µM en tampón Hepes. Para llevarlo a cabo, se parte de una muestra cuyas células han sido tomadas durante el crecimiento en el medio BSM y conservadas en glicerol al 50%, a una temperatura de -18°C. Se fija, en todos los experimentos, una concentración de biomasa de 0,7 g/L, para obtener resultados comparables.

Todos los ensayos se han realizado en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contienen 40 mL de tampón Hepes a pH 8 y con una concentración inicial de DBT de 25 µM, como se ha indicado previamente. Se inocula el microorganismo en el Erlenmeyer, alcanzando la concentración antes fijada de biomasa y se realiza el seguimiento de la desulfuración; para ello, se toman 0,5 mL de muestra cada 60 min durante 3 h en tubos Eppendorf, que contienen 0,5 mL de acetonitrilo para parar la reacción y que ésta no evolucione. De estas muestras se analiza posteriormente, mediante HPLC, la concentración de dibenzotiofeno (DBT) consumido, así como la concentración de 2-hidroxibifenilo (HBP) producidos a lo largo del ensayo, como se presenta en la Figura 2.6. De esta manera se puede obtener la capacidad desulfurante que han desarrollado las células obtenidas durante el crecimiento. Esta capacidad desulfurante se calcula como:

$$X_{BDS} = 100 \cdot \frac{C_{HBP,3h}}{C_{DBT_0}} \quad [2.1]$$



**Figura 2.6.** Esquema del procedimiento experimental para el análisis de la capacidad de desulfuración.



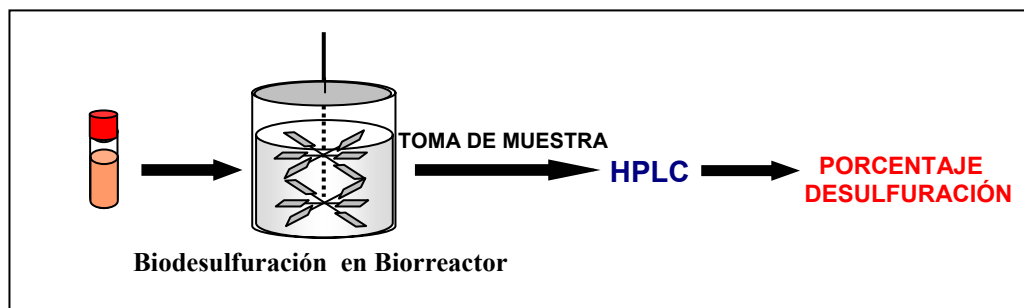
### 2.3.5. Proceso de Bidesulfuración

Este proceso se ha llevado a cabo en Biorreactor comercial (Braun BIOSTAT® B, Biotech) de 3L de capacidad y 1 L de volumen de trabajo, con control de temperatura, de pH y de oxígeno disuelto. Al biorreactor se alimenta una disolución de tampón Hepes y una concentración de DBT de 25 $\mu$ M, como se ha descrito anteriormente. A continuación, se inocula el volumen necesario de suspensión de células que han sido tomadas durante el crecimiento en el medio BSM y conservadas en glicerol al 50% a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Se fija, en todos los experimentos, una concentración de biomasa de 0,7 g/L. Las condiciones de operación utilizadas en todos los experimentos, han sido las siguientes: temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , caudal de oxígeno de 1 L/Lmin, porcentaje de saturación de oxígeno inicial 100%, y velocidad de agitación entre 100 y 500 rpm. Un esquema del procedimiento seguido se muestra en la Figura 2.7.

El seguimiento de la desulfuración se realiza tomando 0,5 mL de muestra cada 30 min durante 3 h en tubos Eppendorf, que contienen 0,5 mL de acetonitrilo para parar la reacción y que la mezcla no evolucione. De estas muestras se analiza posteriormente, mediante HPLC, la concentración de DBT consumido, así como las concentraciones de los intermedios de la ruta 4S: DBTO, DBTO<sub>2</sub>, HBPS y HBP, formados a lo largo del experimento. De esta forma, se podrá conocer la conversión de cada uno de los compuestos de la ruta durante el experimento, que se calcula de la siguiente manera:

$$x_i = 100 \cdot \frac{\Delta C_j}{C_{DBT,0}} \quad [2.2]$$

siendo  $\Delta C_j = C_{DBT,0} - C_{DBT}$  para DBT, y para el resto de los compuestos:  $\Delta C_j = C_j - C_{j,0}$ .



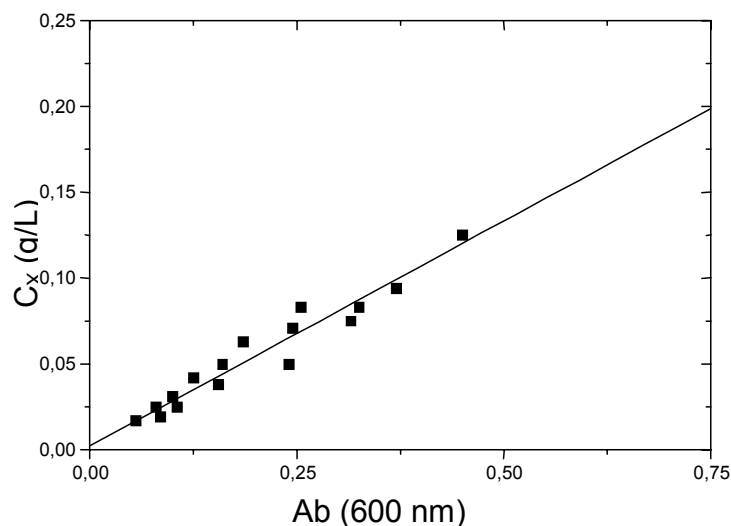
**Figura 2.7.** Esquema del procedimiento experimental para la desulfuración de DBT.

## 2.4. MÉTODOS de ANÁLISIS

### 2.4.1. Análisis de Biomasa

Para realizar el seguimiento del crecimiento del microorganismo se ha utilizado un método de análisis de la concentración de biomasa basado en la medida de la turbidez del caldo. Se llevó a cabo con un espectrofotómetro de absorción UV/VIS (modelo UV-1603) a una longitud de onda de 600 nm. El calibrado del método se realizó creciendo el microorganismo en un medio de crecimiento complejo, medio LB; los cultivos se incuban en incubadora orbital a 250 rpm y 30°C hasta que el cultivo alcanza una densidad óptica elevada. Las muestras se centrifugan y la biomasa se lleva a peso seco hasta pesada constante. Paralelamente, se realizan diluciones del caldo con el fin de medir la absorbancia de cada una de las muestras. Se obtienen pares de valores concentración de biomasa (por peso seco)-absorbancia, obteniéndose los resultados recogidos en la Figura 2.8. Se relaciona el valor de absorbancia con el peso seco de la biomasa mediante ajuste de los datos experimentales, obteniéndose la ecuación [2.3]:

$$C_X = 0,26 \cdot Ab_{600nm} \quad [2.3]$$



**Figura 2.8.-** Recta de calibrado para la relación de absorbancia a 600 nm de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 con el peso seco.

En cuanto al seguimiento de la biomasa durante los experimentos, las muestras obtenidas durante el crecimiento en el medio de cultivo eran tratadas según el siguiente protocolo experimental:

Se toma una muestra del biorreactor y se diluye con agua destilada, de modo que la absorbancia medida entre en la región lineal de la curva de calibrado. El valor de absorbancia obtenido a 600 nm es convertido en concentración mediante la ecuación [2.3]; dicha concentración es luego corregida de acuerdo a la dilución realizada previamente.

#### **2.4.2. Medida de la Concentración de Glucosa**

Para el seguimiento del consumo de glucosa durante el crecimiento se ha empleado cromatografía de líquidos de alta resolución, usando un cromatógrafo con detector de dispersión de luz (marca KONTRON, modelo SEDEX 45). La columna empleada es del tipo Nucleosil NH<sub>2</sub> de 5 μm (250 x 4,6 mm); como eluyente se ha usado una mezcla acetonitrilo/agua Mili Q (75:25), con un caudal de 1 ml/min y a 25°C de temperatura. Previamente, es necesario separar el caldo de las células mediante centrifugación a 14000 rpm, durante 3 minutos. El caldo es diluido apropiadamente con el fin de que los valores de área entren dentro del intervalo de calibrado, dado por la siguiente ecuación:

$$C_G = 0,34 + 0,014 \cdot A \quad [2.4]$$

siendo  $A$  el área del pico en el cromatograma, calculada electrónicamente.

En la Figura 2.9 se muestra un cromatograma en el que se puede observar el pico correspondiente a la glucosa, a un tiempo de elución de 5,3 min. En la Figura 2.10 se muestra la gráfica correspondiente a la recta de calibrado que relaciona la concentración de glucosa con el área del cromatograma, dada por la ecuación [2.4]

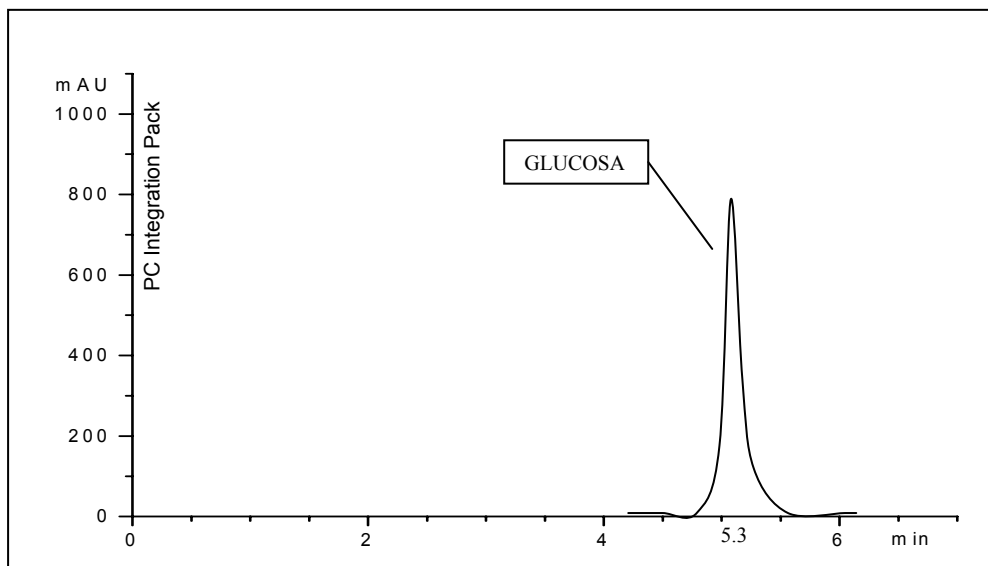


Figura 2.9.- Cromatograma obtenido por HPLC para el análisis de glucosa.

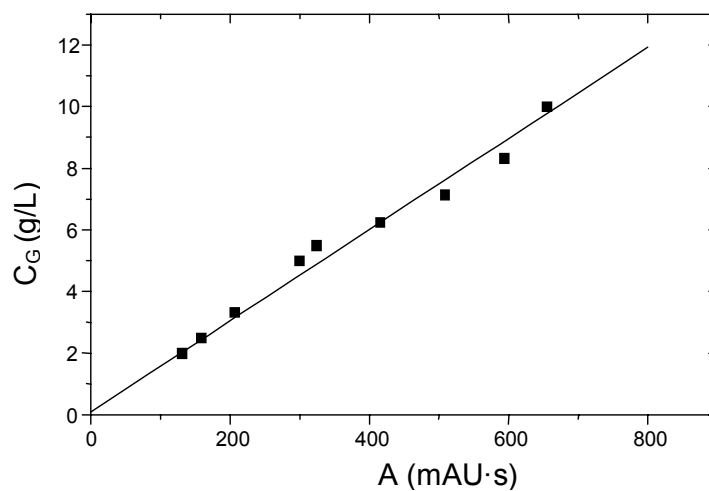


Figura 2.10. Recta de calibrado que muestra la relación de concentración de glucosa con el área de pico del cromatograma de la Figura 2.9.

### 2.4.3. Medida de la Concentración de Ácido Cítrico

Para observar la evolución de esta fuente de carbono se ha empleado un kit enzimático (Boehringer-Mannheim, nº de catálogo 139084). Para ello, las muestras son centrifugadas a 14000 rpm, durante 3 minutos, con el fin de separar el caldo

de las células y a continuación el caldo es diluido de forma que pueda ser analizado con el kit enzimático.

Una vez preparada la muestra, se siguen los pasos especificados en las instrucciones, dados en el kit comercial, y se mide la absorbancia a 340 nm. Los valores de dicha absorbancia son relacionados con la concentración de la fuente de carbono objeto de análisis.

El protocolo para analizar el ácido cítrico, consumido durante el proceso, es el siguiente:

A la cubeta de análisis se añade 1 mL del reactivo con la enzima Citrato liasa (CL), que cataliza la conversión del citrato en oxalacetato más acetato. A esta se añaden 1,8 mL de agua destilada y 0,2 mL de la muestra a valorar. Se agita y tras 5 minutos de incubación se mide la absorbancia a 340 nm (A1). A continuación se añade 0,02 mL de la solución que contiene las enzimas malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH). Tras 5 minutos de incubación se lee nuevamente la absorbancia a 340 nm (A2). Estas enzimas convierten el oxalacetato en malato (MDH) y éste último en lactato (MDH). La cantidad de NADH empleada en estas reacciones es equivalente a la cantidad de ácido cítrico presente en la muestra. El NADH es el parámetro de medida y se determina por su absorción a 340 nm.

El cálculo de la cantidad de ácido cítrico presente en la muestra se realiza primero sustrayendo de la lectura de la absorbancia de la muestra la obtenida para el blanco:

$$\Delta A_{340} = (A1-A2)_{muestra\ 340} - (A1-A2)_{blanco\ 340} \quad [2.5]$$

La concentración de ácido cítrico, se determina por la siguiente ecuación:

$$C_{AC} = \frac{V \cdot M}{\delta \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A_{340} \quad [2.6]$$

siendo:  $V$  el volumen final (3,020 mL),  $v$  el volumen de la muestra (0,200 mL),  $M$  el peso molecular de la sustancia analizada (192,1 g/mol),  $d$  el paso óptico de la cubeta (1 cm) y  $\delta$  el coeficiente de extinción molar del NADH (6,3 L/mmol·cm).

#### **2.4.4. Medida de la Concentración de Ácido Glutámico**

Para determinar la concentración de ácido glutámico en las muestras, se ha empleado también un kit enzimático (Boehringer-Mannheim, nº de catálogo 139092 ). Como en el caso anterior, se centrifugan las muestras a 14000 rpm, durante 3 minutos, de forma que se separa el caldo de las células, y posteriormente, el caldo es diluido de forma que pueda ser analizado con el kit enzimático. De igual forma que en el caso del ácido cítrico, antes de aplicar el kit de medida a las muestras, es necesario someterlas a un determinado tratamiento térmico, para detener las reacciones enzimáticas de las células bacterianas que puedan interferir en la medida. Una vez preparada la muestra, se siguen los pasos especificados en las instrucciones, dadas en el kit comercial y se mide la absorbancia a 492 nm. Los valores de dicha absorbancia son relacionados con la concentración de glutamato. El protocolo para analizar el ácido glutámico, consumido durante el proceso, es el siguiente:

A la cubeta de análisis, además 1,8 mL de agua destilada, se añaden 0,6 mL del reactivo con el buffer fosfato, 0,2 mL de la enzima diaforasa y  $\text{NAD}^+$ . Esta enzima cataliza la conversión del  $\text{NADH}$  en  $\text{NAD}^+$  y formazán. Se añaden 0,2 mL del reactivo de cloruro de idonitrotetrazolium. Se mide la absorbancia a 492 nm (A1). A continuación se añaden 0,03 mL de la solución que contiene la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Tras 15 minutos de incubación se lee nuevamente la absorbancia a 492 nm (A2). Esta enzima convierte el glutamato en 2-oxoglutarato, con liberación de  $\text{NADH}$  y amonio.

El cálculo de la cantidad de ácido glutámico presente en la muestra se realiza primero sustrayendo de la lectura de la absorbancia de la muestra la obtenida para el blanco:

$$\Delta A = (A1-A2)_{\text{muestra } 490} - (A1-A2)_{\text{blanco } 490} \quad [2.7]$$

La concentración de ácido glutámico, se calcula por la ecuación [2.8], similar a la ecuación [2.6]:

$$C_{AG} = \frac{V \cdot M}{\delta \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A_{490} \quad [2.8]$$

donde  $V$  es el volumen final (2,030 mL),  $v$  el volumen de la muestra (0,200 mL),  $M$  el peso molecular de la sustancia analizada (147,1 g/mol),  $d$  el paso óptico de la cubeta (1 cm) y  $\delta$  el coeficiente de extinción molar del NADH (6,3 L/mmol·cm).

#### **2.4.5. Medida de la Concentración de Amonio**

La concentración de nitrógeno (en forma de sal de amonio) ha sido medida empleando un electrodo específico, de membrana semipermeable, de la casa ORION, modelo 720A. El procedimiento seguido para el análisis del amonio ha sido el siguiente:

Se toma una muestra de 10 mL y se adiciona una disolución de NaOH, hasta alcanzar valores de pH superiores a 10 (momento en el que el indicador suministrado por el fabricante, azul de timol, vira de incoloro a azulado); a pH alcalino se libera el nitrógeno amónico presente en la muestra, pasando a amoniaco gaseoso. El amoniaco generado atraviesa la membrana semipermeable del electrodo y produce una señal en el detector. Esta señal se compara con los datos del calibrado y, automáticamente, aparece en la pantalla del aparato la concentración de nitrógeno presente en la muestra. El calibrado se realiza introduciendo dos patrones de concentración conocida (10 y 100 ppm). El intervalo de concentración de calibrado es de 0 a 100 ppm. Los patrones son analizados del modo indicado y la pendiente es calculada y almacenada por el aparato de modo que, una vez realizado el calibrado, la concentración es leída directamente.

#### **2.4.6. Medida de la Concentración de dimetil sulfóxido (DMSO)**

La evolución del consumo de DMSO se midió mediante cromatografía de HPLC (un cromatógrafo marca HEWLETT PACKARD, serie 1100), con detector *diode array*. La columna empleada es del tipo C-8 de 3  $\mu$ m (150 x 4,6 mm); como eluyente se ha usado una mezcla acetonitrilo/agua Mili Q (25:75), con un caudal de 0,25 ml/min y a 45° C de temperatura, midiendo en el detector a una longitud de onda de 220 nm. El tiempo de elución al cual se obtiene el pico del cromatograma correspondiente al DMSO es de 10,8 min, como muestra la Figura 2.11. Previamente es necesario eliminar las células del caldo mediante

centrifugación a 14000 rpm, durante 3 minutos. El caldo es diluido apropiadamente con el fin de que los valores de área entren dentro del intervalo de calibrado, dado ahora por la ecuación [2.9], obtenida por ajuste de la recta de calibrado que muestra la Figura 2.12:

$$C_{DMSO} = 0,01 + 9 \cdot 10^{-5} \cdot A \quad [2.9]$$

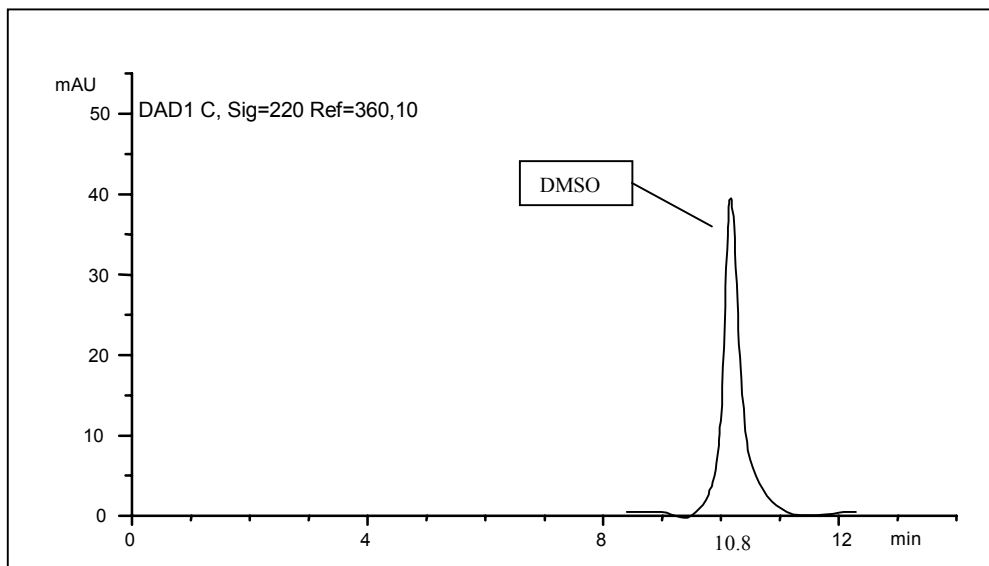


Figura 2.11.- Cromatograma obtenido por HPLC para el análisis de DMSO.

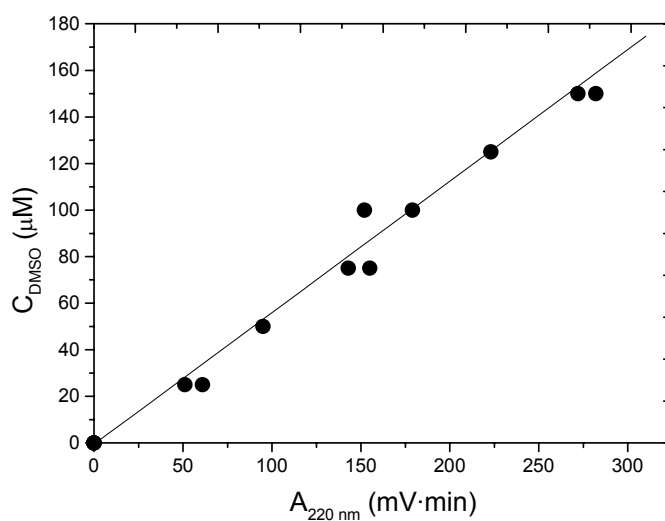
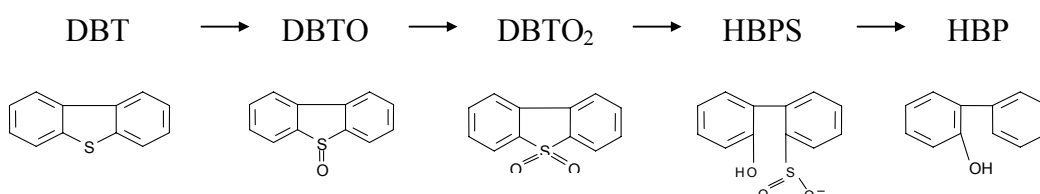


Figura 2.12.- Recta de calibrado que relaciona la concentración de DMSO con el área del pico del cromatograma de la Figura 2.11.



### 2.4.7. Medida de los Compuestos de la Ruta 4S por HPLC

Como se ha explicado anteriormente, la ruta 4S de desulfuración parte de dibenzotiofeno (DBT), del cual se forman, con la acción de las enzimas de la ruta, los compuestos intermedios dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO), dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>), hidroxibifenilbencenosulfinato (HBPS), y el producto final, 2-hidroxibifenil (HBP):



El seguimiento de estos compuestos, excepto el de HBPS, se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución, y el cromatógrafo empleado para este fin es de la marca HEWLETT PACKARD, serie 1100, con detector *diode array*. La columna empleada para el análisis de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP es del tipo C-8 de 3 μm (150 x 4,6 mm); como eluyente se ha usado una mezcla acetonitrilo/agua Mili Q (50:50), con un caudal de 1 L /min y a 25° C de temperatura, midiendo en el detector a una longitud de onda de 240 nm. En estas condiciones se identifican los siguientes compuestos: DBT, a un tiempo de elución de 14,9 minutos, DBTO, a tiempo de elución 2,7 min, DBTO<sub>2</sub> a tiempo de elución 3,9 min, y HBP, a 5,9 minutos, como se muestra en la Figura 2.13.

Las ecuaciones de calibrado obtenidas a partir de las rectas de calibrado que muestran las Figuras 2.14, 2.15, 2.16 y 2.17, respectivamente, son las siguientes:

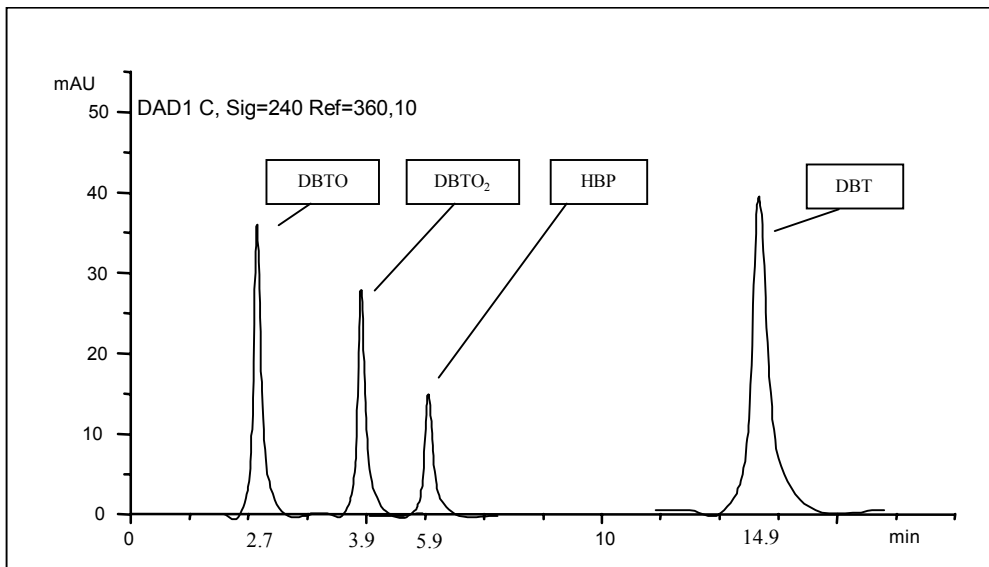
$$C_{DBT} = 1,9 + 1,2 \cdot 10^{-2} \cdot A \quad [2.10]$$

$$C_{DBTO} = 0,06 + 0,03 \cdot A \quad [2.11]$$

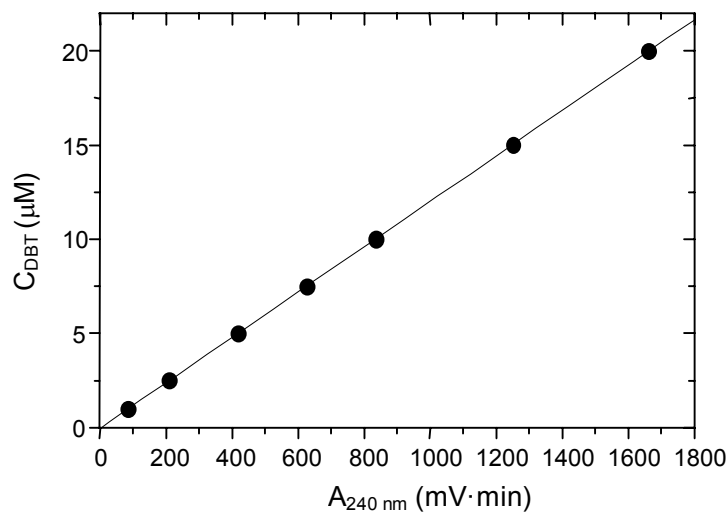
$$C_{DBTO_2} = -0,02 + 2,7 \cdot 10^{-2} \cdot A \quad [2.12]$$

$$C_{HBP} = 0,45 + 5,2 \cdot 10^{-2} \cdot A \quad [2.13]$$

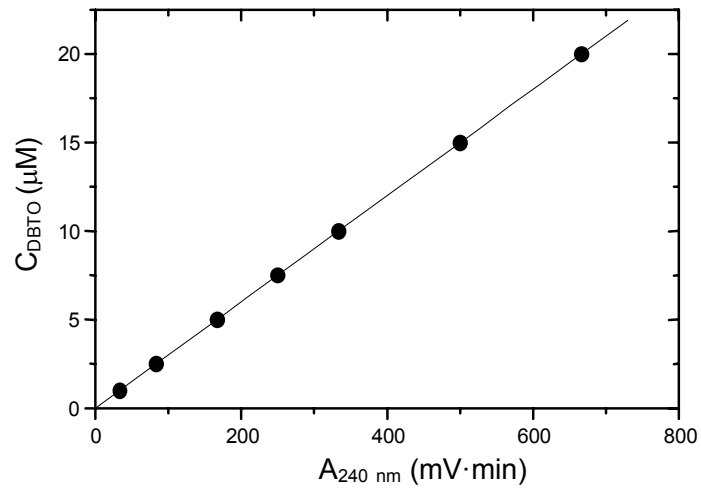
siendo  $A$  el área de cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma, como se muestra en la Figura 2.13 para DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP.



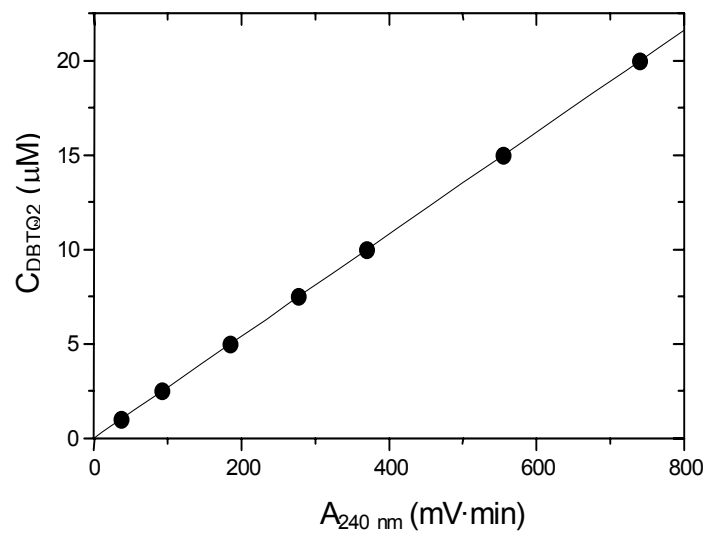
**Figura 2.13.-** Cromatograma obtenido por HPLC para el análisis de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP.



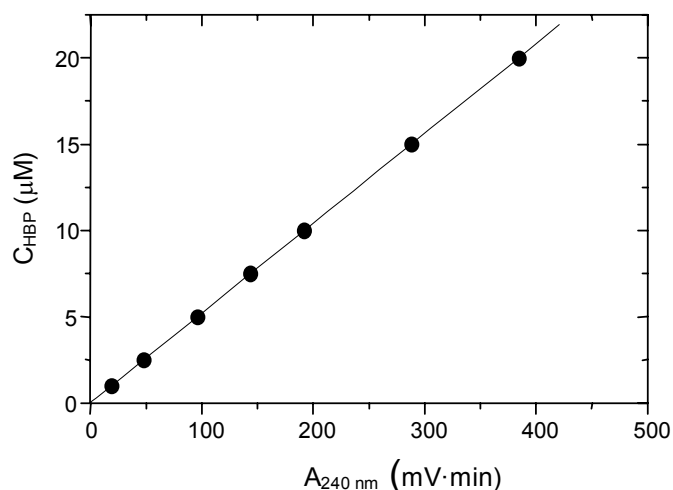
**Figura 2.14.** Recta de calibrado que relaciona la concentración de DBT y el área de pico del cromatograma de la Figura 2.13.



**Figura 2.15.** Recta de calibrado que relaciona la concentración de DBTO y el área de pico del cromatograma de la Figura 2.13.



**Figura 2.16.** Recta de calibrado que relaciona la concentración de  $DBTO_2$  y el área de pico del cromatograma de la Figura 2.13.



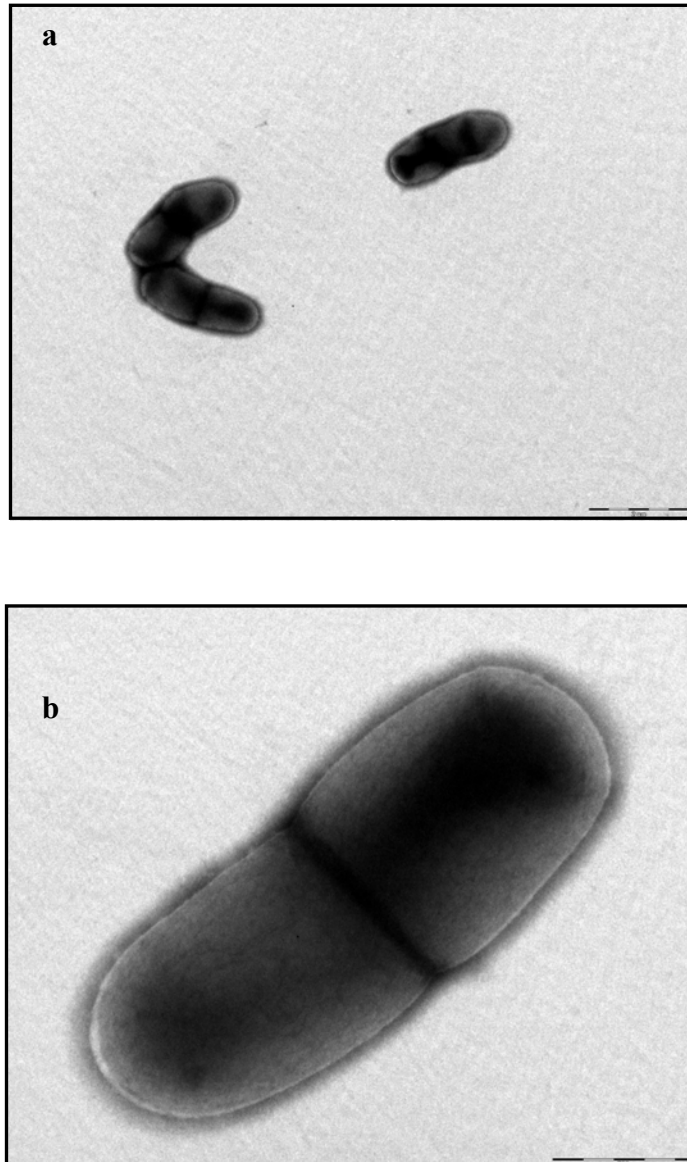
**Figura 2.17.** Recta de calibrado que relaciona la concentración de HBP y el área de pico del cromatograma de la Figura 2.13.

#### **2.4.8. Análisis de la Morfología de las Células por Microscopía Electrónica**

Para el análisis de la morfología celular se utilizó la técnica de Microscopía e Electrónica de Transmisión (MET), en el Centro de Microscopía Electrónica “Luis Bru” perteneciente a la Universidad Complutense de Madrid. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se lavan las muestras dos veces con tampón Hepes (50 mM; pH = 8,0) centrifugando a 14000 rpm durante 2 minutos con el fin de separar las células de caldo de cultivo y, posteriormente, se guardan a 4°C un máximo de 7 días, resuspendidas en el mismo tampón Hepes. A continuación, se realiza una tinción negativa de las células, para lo cual se toma una gota de la muestra con una pipeta Pasteur, sobre ella se depositan dos rejillas de cobre, para que las bacterias queden adheridas a las mismas. Por último, se procede a la tinción de las rejillas FORBAR CARBONO (200 mess/rejilla) con acetato de uranilo al 2% -cuyas moléculas, densas a los electrones, no penetran en las estructuras celulares, sino que forman depósitos espesos en las hendiduras-, dejando actuar al colorante durante 10 segundos. Una vez teñidas las células, se colocan en el portarejillas y se disponen para ser vistas y fotografiadas con el microscopio electrónico.

El microscopio electrónico de transmisión utilizado es un JEOL JEM-1010, con un potencial de 100 kV y un potencial de trabajo de 80 kV. Las fotografías fueron adquiridas con una cámara CCD y el programa de adquisición de datos utilizado fue el *Soft Imaging Viewer*. En la Figura 2.18 se muestran algunas de las fotografías obtenidas mediante esta técnica utilizando distintos aumentos:



**Figura 2.18.** Fotografías de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 tomadas utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 a 10.000 aumentos (a) y 60.000 aumentos (b).

## **2.5. MÉTODOS MATEMÁTICOS de CÁLCULO**

Debido a que, para la realización del trabajo que se describe en la presente Memoria, ha sido necesaria la aplicación de diferentes métodos matemáticos de cálculo, se va a dedicar este apartado a realizar una breve descripción de los mismos. Todos los programas de cálculo empleados se han desarrollado para llevar a cabo este trabajo, y han sido realizados en FORTRAN 77.

Para realizar el cálculo de los parámetros de los modelos cinéticos propuestos, se ha utilizado el método integral en forma de velocidades de producción, debido a que los datos obtenidos en la experimentación realizada son integrales y al considerable error que se introduce en el cálculo si se emplea el método diferencial con este tipo de datos (García-Ochoa y col., 1993).

La integración de las funciones que componen los modelos cinéticos (recogidas en la subrutina TWCFUN) ha sido llevada a cabo analíticamente (cuando era posible) o numéricamente, siendo, en este último caso, el método numérico de integración empleado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden. Por lo tanto, ha sido necesario acoplar este algoritmo en forma de subrutinas (RUNGKN, RUNGFN) a los programas desarrollados, como se esquematiza en la Figura 2.19.

El ajuste de datos experimentales a determinadas ecuaciones, mediante técnicas de regresión, ha sido empleado tanto en la obtención de las ecuaciones de calibrado como en la obtención de los parámetros cinéticos en los modelos propuestos en la presente Memoria.

Para la obtención de las ecuaciones de calibrado se ha utilizado un método de regresión lineal, siendo la función de ajuste del tipo:

$$y = a + b \cdot x \quad [2.14]$$

El criterio de optimización empleado en este caso ha sido el de los mínimos cuadrados, expresado por la ecuación:

$$\sum_{i=1}^N (y_{exp} - y_{teor})^2 \longrightarrow \text{mínimo} \quad [2.15]$$

En los casos en que se ha empleado este tipo de regresión, para describir el grado de ajuste se ha utilizado el coeficiente de regresión,  $r$ .

El ajuste de los datos experimentales para obtener los parámetros cinéticos de los modelos planteados, sin embargo, se lleva a cabo mediante regresión no lineal; para ello, se ha empleado el algoritmo de Marquardt (1963). Dependiendo del modelo a aplicar, se ha llevado a cabo el ajuste en simple o en múltiple respuesta (subrutinas TWMARS o TWMARM, respectivamente), es decir, se ha ajustado la evolución de un solo componente o de varios componentes a la vez. El algoritmo de regresión, en este caso, minimiza la suma de los residuos al cuadrado. De esta forma, si se hace necesario igualar los residuos de los diferentes componentes en múltiple respuesta, en caso de que los valores de unos componentes respecto a otros presenten diferencias significativas en órdenes de magnitud, se pueden “pesar los residuos”, para que todos los valores presenten la misma significación en el criterio de regresión, empleando un factor de pesada ( $w_j$ ). La expresión optimizada por el algoritmo en el caso de regresión múltiple-respuesta es la recogida en la ecuación [2.17], siendo simplificada ( $NC=1$ ) en el caso de regresión en simple-respuesta.

$$SRC_j = \frac{\sum_{j=1}^{NC} \sum_{i=1}^N w_j \cdot (C_{X_{exp}} - C_{X_{te_i}})_j^2}{NC \cdot N} \quad [2.16]$$

En todas las regresiones no lineales llevadas a cabo, se han considerado como indicativos de la bondad del ajuste obtenido los siguientes parámetros estadísticos:  $F$  de *Fischer*, indicativo del grado global de ajuste;  $t$  de *Student*, indicativo del grado de significación de cada parámetro (relacionado con el intervalo de confianza de los parámetros: valores mínimo y máximo proporcionados por el algoritmo de regresión); y  $SRC$  (ec. [2.16]) o suma de

residuos al cuadrado, indicativo de la calidad en la reproducción de los datos experimentales. La comprobación de la bondad del ajuste, en lo referente a los parámetros estadísticos comentados, se realiza a partir de la comparación con los valores de los mismos tabulados para el 95% de confianza, según el número de parámetros a calcular y el número de datos que se emplean en cada ajuste.

Las ecuaciones a las que se aplica la regresión no lineal son las que se recogen a continuación, en las ecuaciones [2.17] a [2.19], para el método de las velocidades de reacción.

$$r_i = \sum v_{ij}^{-1} R_j \quad [2.17]$$

$$r_i = \sum v_{ij}^{-1} \frac{dC_j}{dt} \quad [2.18]$$

$$\int_0^t r_i dt = \sum v_{ij}^{-1} \cdot C_j \quad i = 1, NR \quad [2.19]$$

Cuando se aplica el método de las velocidades de producción, las ecuaciones equivalentes son:

$$R_j = \sum v_{ij} r_i \quad [2.20]$$

$$\frac{dC_j}{dt} R_j = \sum v_{ij} r_i = \sum v_{ij} \cdot f(C_k) \quad [2.21]$$

$$C_j = \sum v_{ij} \cdot \int_0^t f(C_k), \quad i = 1, NR \quad [2.22]$$

todas ellas para  $j = 1, NC$ , y siendo  $R_j$  la velocidad de producción del compuesto  $j$ ,  $v_{ij}$  el coeficiente estequiométrico del compuesto  $j$  en la reacción  $i$ ,  $r_i$  la velocidad de la reacción  $i$ ,  $C_j$  la concentración del compuesto  $j$ , y  $t$  el tiempo.



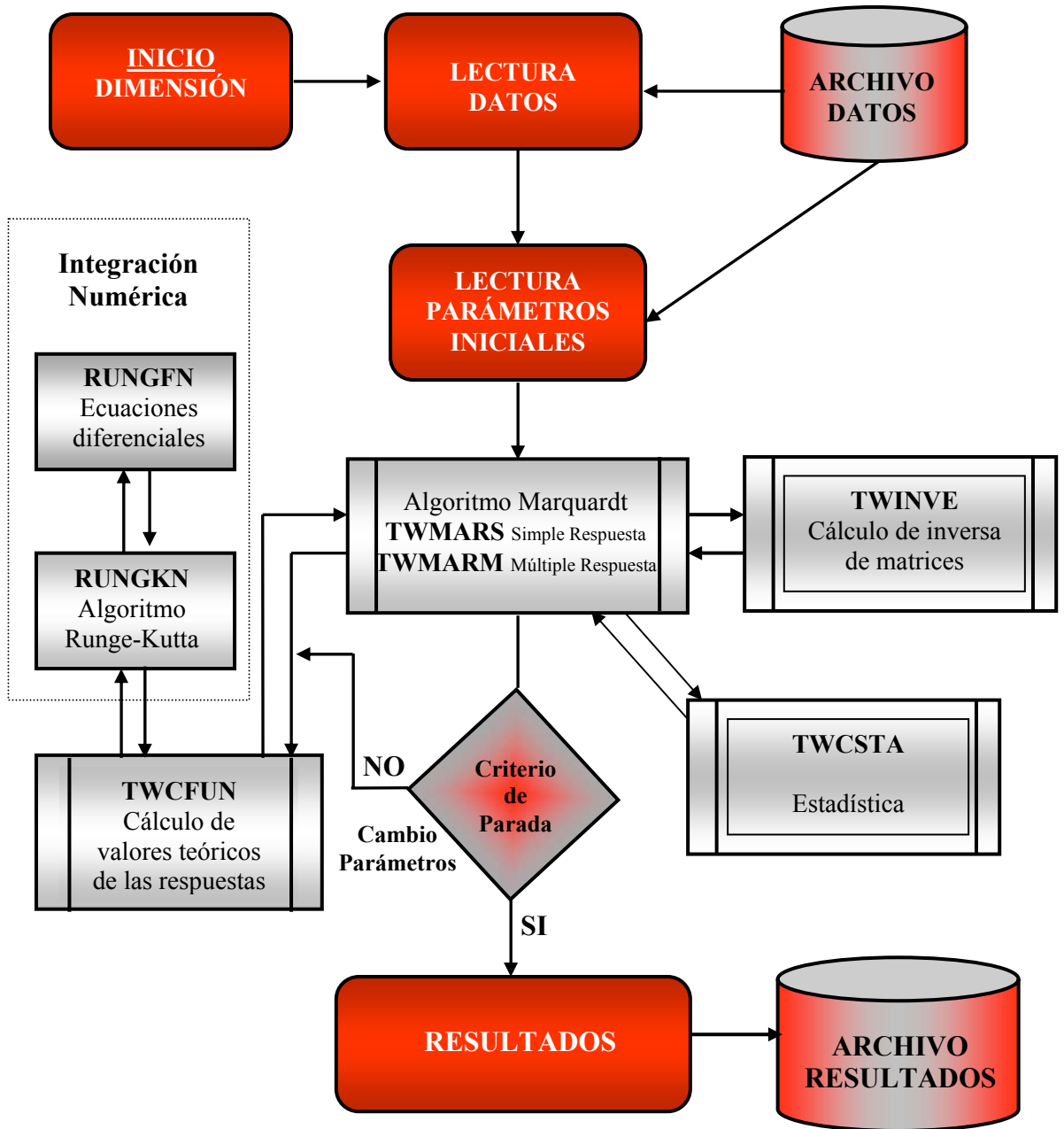


Figura 2.19. Diagrama de flujo del programa de regresión no lineal en simple o múltiple respuesta empleado basado en el algoritmo de Marquardt (1963).

***3. ESTUDIO del CRECIMIENTO  
del MICROORGANISMO***

### **3. ESTUDIO del CRECIMIENTO del MICROORGANISMO**

El desarrollo del proceso de biodesulfuración estudiado en este trabajo comprende dos etapas principales: la primera es la producción del biocatalizador o crecimiento del microorganismo que va a ser utilizado más adelante como catalizador, y la segunda es la biodesulfuración de DBT, que se ha utilizado como compuesto modelo, por parte de ese microorganismo. La producción del biocatalizador es una de las etapas más importantes, ya que es la etapa que debe proporcionar el catalizador, y su estudio conducirá a la obtención del mismo en las condiciones óptimas, es decir, obtener la mayor cantidad, con la mayor capacidad desulfurante en el menor tiempo posible, según un proceso repetitivo y controlable.

Como ya se ha indicado en la Introducción de esta Memoria, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 es el microorganismo más estudiado y utilizado para la biodesulfuración de DBT. Sin embargo, no se han encontrado precedentes en la literatura en que se realicen estudios comparativos sistematizados sobre la influencia del medio de crecimiento utilizado y de las condiciones de operación, tanto en la velocidad de crecimiento del microorganismo como en el desarrollo de la capacidad desulfurante en las células. En este apartado se aborda dicho estudio. Para ello, se va a estudiar el crecimiento del microorganismo empleando diferentes sustratos en el medio y diferentes condiciones de operación, con el fin de observar su influencia en el crecimiento y en la capacidad desulfurante de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

No obstante, hay que realizar primero unos estudios previos del microorganismo que garanticen la obtención de unos resultados experimentales comparativos al estudiar distintas composiciones del medio y condiciones de operación durante el crecimiento, con el objetivo de llegar a fijar las mejores variables durante la etapa de producción del biocatalizador. En cuanto a estos estudios previos, tampoco se ha encontrado en la literatura ningún precedente en que se estudie la preparación del inóculo que se utiliza después para llevar a cabo el crecimiento de la bacteria. Por eso, en este apartado se ha estudiado la influencia de distintas variables que influyen en la preparación del inóculo, tales como el número de etapas en que se realiza el mismo, la concentración inicial de biomasa durante su preparación, y el lavado del inóculo antes de llevar a cabo el crecimiento para eliminar el sulfato presente en el medio. Tras este estudio, se pretende conseguir un inóculo estándar para todos los experimentos que se lleven a cabo más adelante.

Una vez determinado el procedimiento experimental adecuado, se ha estudiado la composición del medio de crecimiento del microorganismo que, como ya se ha comentado, es una etapa muy importante dentro del proceso de biodesulfuración de DBT. Para ello se ha probado el uso de distintas fuentes de azufre, carbono y nitrógeno, y se ha estudiado la influencia de su utilización en el crecimiento de la bacteria y en el desarrollo de su capacidad desulfurante. En cuanto a la fuente de azufre, la mayoría de los autores emplean dibenzotiofeno

(DBT) y, en menor medida, dimetilsulfóxido (DMSO). En este trabajo se describe, además, el uso de  $Mg_2SO_4$  como fuente de azufre, a pesar de ser un represor de la expresión de los genes de la ruta 4S. Y por otra parte, se ha estudiado la influencia de la utilización de diferentes concentraciones iniciales de DMSO. Respecto a la fuente de carbono, se suele emplear, en la mayor parte de los casos, glucosa o glicerol; en este estudio se han probado tres tipos distintos de fuente de carbono: glucosa, ácido glutámico y ácido cítrico. Finalmente, en cuanto a la fuente de nitrógeno, en los trabajos encontrados en la literatura se emplea casi siempre cloruro de amonio, por lo que se ha estudiado la influencia de su adición o no como suplemento en el caso de utilizar ácido glutámico como fuente de carbono.

El estudio de la composición del medio se ha completado con el de las condiciones de operación durante el crecimiento del microorganismo, tales como temperatura, pH y concentración de oxígeno disuelto en el medio. Se ha estudiado la influencia de estas variables en la velocidad de crecimiento y en la concentración de biomasa alcanzada, así como en el desarrollo de la capacidad desulfurante de las células obtenidas. En cuanto a la temperatura empleada por los distintos autores en trabajos previos descritos en la literatura, en casi todos los casos es de 30°C; en este trabajo se ha estudiado un intervalo de 26 a 36°C. Respecto al pH, se emplean en la literatura medios de crecimiento con valores de pH aproximadamente neutro, entre 5 y 7, por lo que en este trabajo se ha estudiado el crecimiento utilizando tres valores iniciales de pH: ácido (5,5), neutro (6,7) y básico (8,1), manteniendo además este valor constante durante el crecimiento en el caso de usar un pH neutro de 6,7, utilizando dos procedimientos, el uso de un tampón Tris-HCl, y o bien, por adición de NaOH.

Durante estos experimentos que han sido realizados para llevar a cabo el estudio de la producción del biocatalizador o, lo que es lo mismo, el crecimiento del microorganismo, se han tomado datos experimentales a diferentes tiempos a lo largo de los diferentes experimentos, para comparar las distintas variables empleadas. Para ello, se ha atendido a las siguientes respuestas experimentales: en todos los experimentos se han tomado datos de concentración de biomasa ( $C_X$ ) y se ha tomado muestra de las células a lo largo del tiempo para realizar más

adelante el ensayo de desulfuración o *resting cells* y medir así la capacidad desulfurante de esas células. Para cuantificar la capacidad desulfurante del microorganismo, se han definido o utilizado dos parámetros: porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) y grado de desulfuración ( $D_{BDS}$ ), que se definen más adelante. Además, en los experimentos en que se ha estudiado la composición del medio de crecimiento, se ha medido como respuesta también la concentración del sustrato que estaba siendo estudiado, es decir, la concentración de fuente de azufre, de carbono y de nitrógeno ( $C_S$ ,  $C_C$  y  $C_N$ ) en cada caso. Por otra parte, se ha obtenido como respuesta experimental la evolución del pH a lo largo de los experimentos en que se estudiaba esta variable, así como la concentración de oxígeno disuelto ( $C_{O_2}$ ) a lo largo de los experimentos en que se estudiaba la influencia de esta variable.

El porcentaje de desulfuración, medido como conversión final de HBP en el ensayo de desulfuración, se ha calculado según la ecuación previamente planteada:

$$X_{BDS} = \frac{C_{HBP,3h}}{C_{DBT_0}} \cdot 100 \quad [3.1]$$

Hay que llamar la atención sobre el hecho de calcular la conversión lograda midiendo la concentración del último de los compuestos de la ruta 4S, HBP, el único de todos ellos que no contiene ningún átomo de azufre en su molécula. Algunos autores cometen el error de calcular la conversión a través de la desaparición del compuesto modelo del medio, DBT, pero en ese caso, la cantidad de azufre contenida en el medio, ya sea el crudo de petróleo o una fracción, permanece constante, a no ser que éste azufre sea eliminado del medio a través de otra molécula como es en forma de sulfato, lo cual sólo se consigue cuando la ruta 4S se completa hasta la formación del último compuesto, HBP. Es en ese caso cuando se produce la desulfuración, y por tanto la conversión debe ser calculada en base a ese último compuesto de la ruta 4S.

El grado de desulfuración durante el crecimiento, se ha definido para cuantificar la capacidad desulfurante del microorganismo, teniendo en cuenta todas las variables que influyen en la capacidad desulfurante, como el porcentaje

de desulfuración, la concentración de biomasa, y el tiempo que ha sido necesario para alcanzar esa concentración de biomasa y ese porcentaje de desulfuración, y se ha calculado como:

$$D_{BDS} = \frac{X_{BDS} \cdot C_X}{t_c} \quad [3.2]$$

donde  $X_{BDS}$  es la capacidad desulfurante en el ensayo de desulfuración según la ecuación [3.1],  $C_X$  es la concentración de biomasa, y  $t_G$  el tiempo de crecimiento al que se obtiene esa concentración de biomasa.

Finalmente, se ha propuesto un modelo cinético que sea capaz de describir el crecimiento del microorganismo y la velocidad de desarrollo de la capacidad desulfurante. En la literatura hay muy pocos ejemplos de autores que hagan uso de modelos cinéticos para realizar la descripción del crecimiento, solamente en un caso (Wang y Krawiec, 1996) se utiliza la ecuación de Monod para describir la evolución de la concentración de biomasa. En este estudio, sin embargo, se ha ajustado, además de la concentración de biomasa, el porcentaje de desulfuración de las células, obteniendo así un modelo cinético de cuatro parámetros. Posteriormente, se creyó necesario incluir también la descripción de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto, debido a la importancia de esta variable dentro del proceso de crecimiento del microorganismo, por tratarse de una fermentación aerobia y, por tanto, de un sistema en que el oxígeno juega un papel de mucha importancia. Para ello, se han realizado una serie de experimentos en los que la concentración de oxígeno disuelto es modificada a través de un cambio en la velocidad de agitación, que permanece constante durante todo el experimento, así como el caudal de aire introducido, mientras que el oxígeno disuelto en el medio varía a lo largo del crecimiento según las necesidades del microorganismo. De esta manera, se ha estudiado la influencia de dicha concentración de oxígeno disuelto en la velocidad de crecimiento y en la capacidad desulfurante desarrollada por el microorganismo. Durante estos experimentos se ha obtenido, además, de forma experimental, el consumo de oxígeno por parte del microorganismo: tanto la velocidad de consumo ( $OUR$ ) como el consumo específico ( $q_{O_2}$ ). Por otra parte, hay que tener en cuenta que el

oxígeno es un gas, y antes de llegar al microorganismo debe atravesar el medio líquido en que el microorganismo se encuentra en crecimiento, por lo que también ha sido necesario realizar estudios de transferencia de oxígeno en el medio de crecimiento utilizado. Así, se ha estudiado el transporte de oxígeno a través del coeficiente de transferencia volumétrico de materia,  $k_La$ , y se ha calculado también un factor de aumento,  $E$ , de la transferencia de oxígeno debido a la presencia del microorganismo.

### **3.1. ESTUDIOS PREVIOS**

Antes de llevar a cabo los estudios comparativos sobre la composición del medio y las condiciones de operación durante el crecimiento, es necesario estandarizar el procedimiento experimental. Esto permitirá obtener un método para la realización de todos los experimentos que garantice la repetitividad de los resultados en los experimentos que se llevan a cabo en este trabajo, y así obtener resultados reproducibles y comparativos cuando se estudian diversas variables.

#### **3.1.1. Preparación del Inóculo**

Una vez establecidos los métodos de conservación y mantenimiento del microorganismo en estado viable, que han sido comentados en el apartado 2.3.2 del presente trabajo, se estudió el crecimiento del microorganismo en medio LB complejo, empleado en la preparación del inóculo, para establecer un procedimiento experimental estándar y obtener resultados comparativos en el estudio del crecimiento del microorganismo.

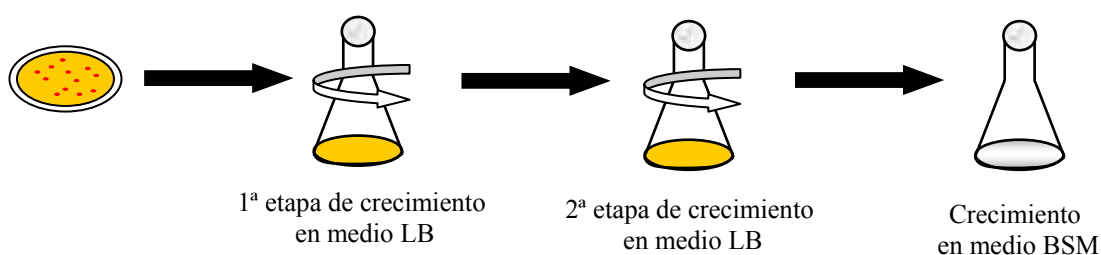
En la literatura no se encuentra ningún trabajo que estudie el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 en medio LB. No existen trabajos donde se muestren estudios realizados acerca del inóculo. Por ello, en este trabajo se ha estudiado la diferencia entre procedimientos que emplean una o dos etapas de crecimiento en medio LB, la influencia de la concentración inicial de biomasa en el medio BSM, y también la influencia del lavado del inóculo antes de su introducción en el medio BSM para realizar los estudios de crecimiento.



### **3.1.1.1. Influencia de las etapas de crecimiento en medio LB**

Como ya se ha comentado en el apartado 2.3.2, es necesario preparar el inóculo en dos etapas en el medio LB, como se esquematiza en la Figura 3.1. Esto se debe a que de esta forma se evita la influencia del estado metabólico del microorganismo con el que se inocula el medio BSM, en el que se realizan los estudios posteriores de crecimiento, ya que en la segunda etapa de crecimiento se elimina toda posible influencia de la concentración inicial de microorganismo que se introduce para la fabricación del inóculo.

Para estudiar esta influencia se han realizado cuatro experimentos, dos de ellos en medio LB, y otros dos en medio BSM, utilizando como inóculo microorganismo obtenido en medio LB. En el caso de llevar a cabo el crecimiento en medio LB, se probó a realizar el inóculo en una sola etapa, o en dos etapas en serie, utilizando el microorganismo procedente de la primera etapa para así eliminar la influencia del estado del microorganismo en la placa Petri. Y por otra parte, se estudió el crecimiento de la bacteria en medio BSM analizando la influencia de utilizar como inóculo el microorganismo crecido en una etapa o en dos etapas. Este procedimiento se recoge, de forma esquemática, en la Figura 3.1, y en la Tabla 3.1 se indican los experimentos realizados.



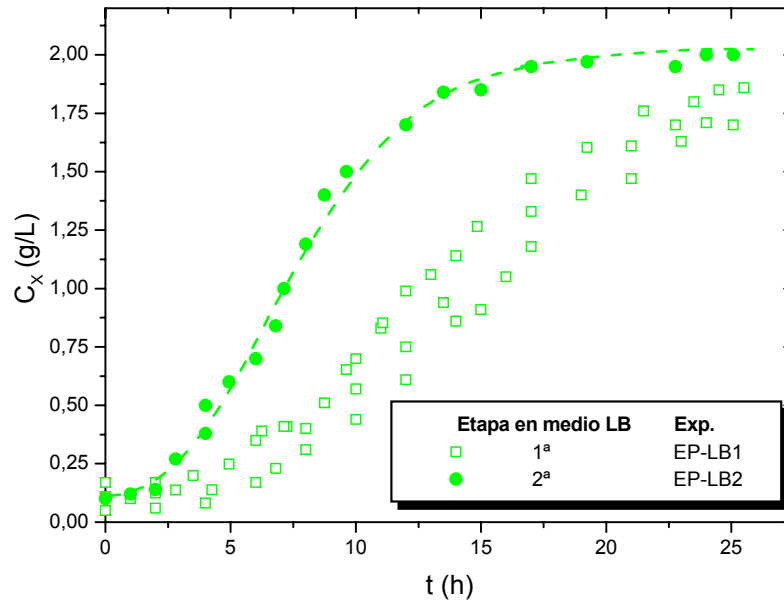
**Figura 3.1** Esquema de la preparación del inóculo antes de llevar a cabo el crecimiento en medio BSM.

**Tabla 3.1** Experimentos realizados para estudiar la influencia de las etapas de crecimiento en medio LB durante la preparación del inóculo.

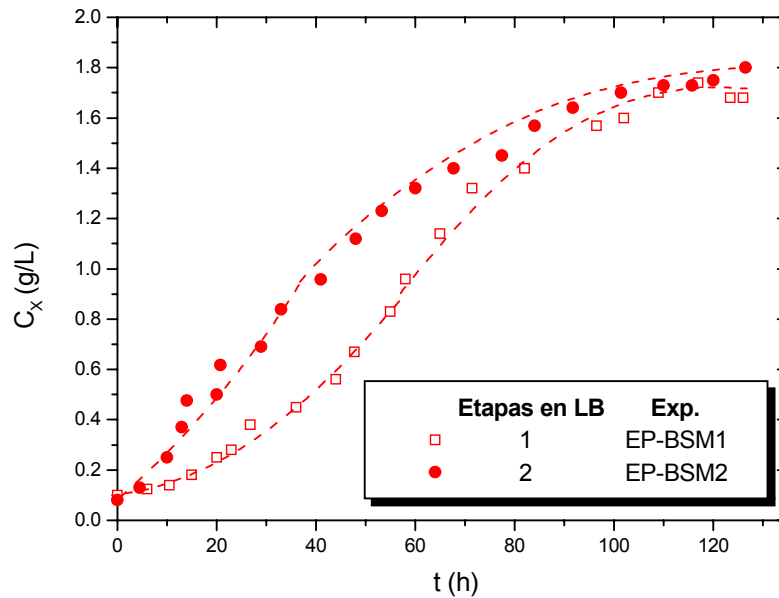
<b>Experimento</b>	<b>Medio de Crecimiento</b>	<b>Nº etapas de crecimiento en el medio LB</b>
EP-LB1	LB	1
EP-LB2	LB	2
EP-BSM1	BSM	1
EP-BSM2	BSM	2

La Figura 3.2 muestra la concentración de biomasa durante el crecimiento del microorganismo en medio LB durante la 1ª etapa y durante la 2ª etapa (en la que se utiliza como preinóculo el microorganismo obtenido en la primera etapa).

Como puede observarse, al realizar el experimento varias veces, la biomasa alcanzada con el tiempo en la primera etapa varía dependiendo de la concentración de microorganismo introducida con el asa de siembra a partir de la placa Petri, y del estado metabólico en el que se realiza dicha siembra en cada uno de esos experimentos. Por lo tanto, a un mismo tiempo de crecimiento en medio LB, las condiciones en que se encuentra el microorganismo en los diferentes experimentos no serían las mismas, así que si se empleara esta forma de realizar el inóculo, no se obtendrían resultados reproducibles. Esto se puede evitar si se realiza una segunda etapa de crecimiento en medio LB. En este caso, la biomasa alcanzada con el tiempo es siempre la misma, y dicha biomasa puede ser utilizada como inóculo para llevar a cabo el crecimiento en medio BSM, obteniendo resultados reproducibles y, por tanto, comparativos. Esto queda patente en la Figura 3.3, observando la diferencia en el crecimiento del microorganismo en medio BSM según se realice una o dos etapas de crecimiento en medio LB.



**Figura 3.2.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medio LB en la 1ª etapa (EP-LB1) y en la 2ª etapa (EP-LB2).



**Figura 3.3.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medio BSM utilizando un inóculo crecido en una etapa (EP-BSM1) y en dos etapas (EP-BSM2).

Se observa una clara influencia en la velocidad de crecimiento en ambos experimentos, mientras que la concentración de biomasa final alcanzada es similar, la diferencia radica en la velocidad a la que se alcanza esa concentración de biomasa, es decir, el tiempo que tarda el microorganismo en alcanzar la fase estacionaria. Cuando se realiza una sola etapa de crecimiento en medio LB, la fase de latencia se alarga más, debido al estado metabólico en que se encuentra la bacteria al inocular al medio BSM. Sin embargo, si se realiza una segunda etapa, a un determinado tiempo de crecimiento, el microorganismo se encuentra siempre en la fase exponencial en el momento de inocular al medio BSM, y esto se traduce en una disminución de la fase de latencia y por tanto una mayor velocidad de crecimiento. En consecuencia, un procedimiento experimental estándar debe comprender la realización de una segunda etapa de crecimiento en medio LB durante la preparación del inóculo.

### ***3.1.1.2. Influencia de la concentración inicial de biomasa en medio LB***

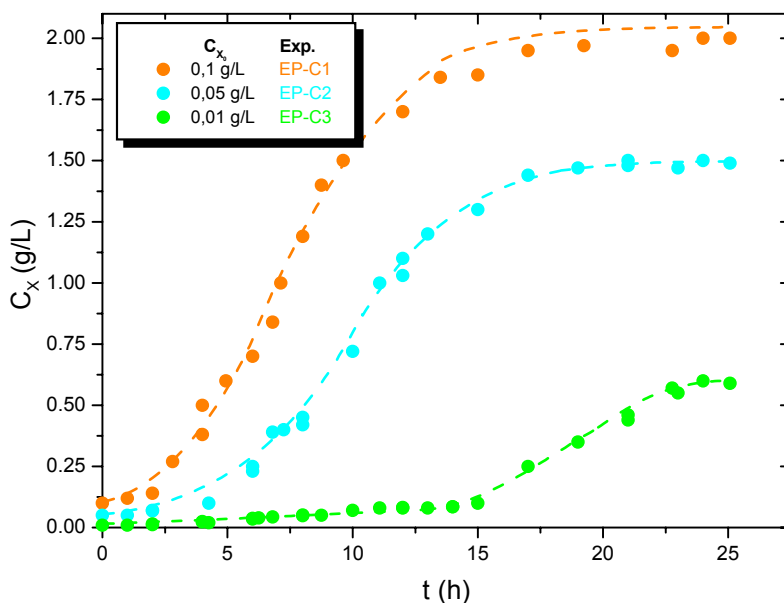
Para llevar a cabo el estudio de la influencia de la concentración inicial de biomasa en la segunda etapa de crecimiento en medio LB para la preparación del inóculo, se han realizado tres experimentos utilizando diferentes valores de concentración inicial de biomasa: 0,1 g/L, 0,05 g/L y 0,01 g/L, como se recoge en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Experimentos realizados para estudiar la influencia de la concentración inicial de biomasa en la segunda etapa de crecimiento en medio LB para la preparación del inóculo.

<b>Experimento</b>	<b><math>C_{X_0}</math> (g/L)</b>
EP-C1	0,1
EP-C2	0,05
EP-C3	0,01

Los resultados experimentales alcanzados se muestran, como evolución de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo de crecimiento en la segunda etapa de crecimiento en medio LB, en la Figura 3.4.

De acuerdo a estos resultados, cuanto mayor es la concentración inicial, más corta es la fase de latencia y mayor es la concentración final de biomasa alcanzada. Cuando la concentración inicial es 0,1 g/L, la biomasa final es superior a 2 g/L, mientras que cuando es 0,05 y 0,01 g/L, las concentraciones finales alcanzadas son 1,5 y 0,6 g/L, respectivamente. Por esta razón, la estandarización del procedimiento experimental lleva a fijar una concentración inicial de 0,1 g/L, de forma que se obtiene más concentración de microorganismo en menos tiempo.



**Figura 3.4.** Crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medio LB durante la segunda etapa a diferentes concentraciones iniciales de biomasa: 0,1g/L (EP-C1), 0,05 g/L (EP-C2) y 0,01 g/L (EP-C3).

### 3.1.1.3. Influencia del lavado del inóculo

Ya ha sido comentado que existen determinadas fuentes de azufre (sulfato, sulfuro, metionina, cisteína) que reprimen la expresión de los genes *dsz* implicados en la ruta 4S de desulfuración de DBT (Kayser y col., 1993; Oldfield y col., 1997).

Aunque en los distintos experimentos llevados a cabo a lo largo de este trabajo, la fuente de azufre empleada en el medio de crecimiento BSM ha sido dimetilsulfóxido (DMSO), que no reprime la expresión de los genes *dsz* (Kayser y col., 1993; Omori y col., 1995; Oldfield y col., 1997), el sulfato está presente en el

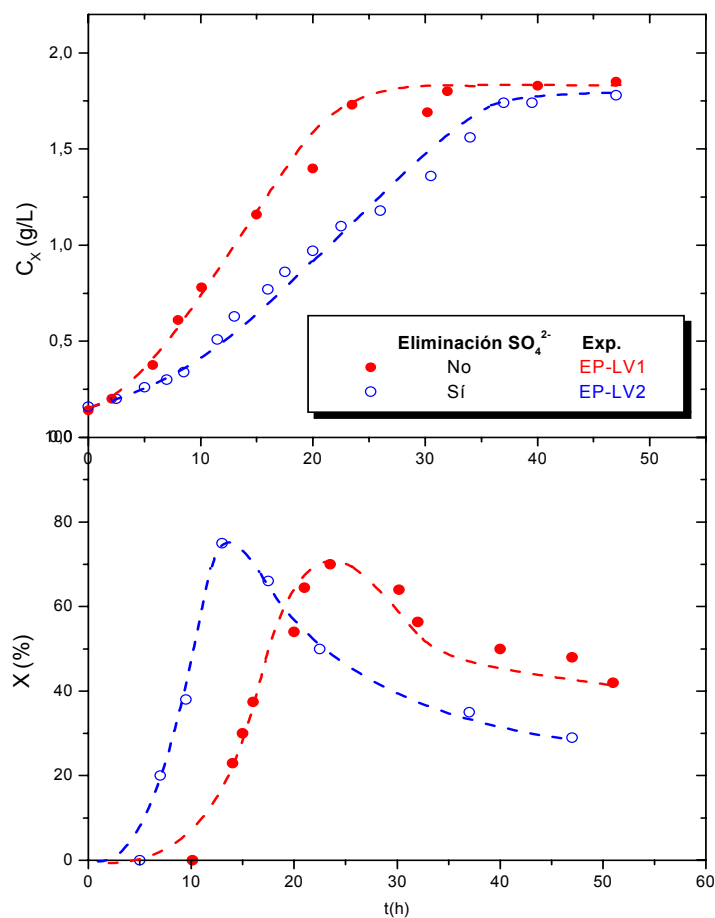
inóculo (en el medio LB). Por esta razón, se planteó la necesidad de lavar las células del inóculo antes de ser introducidas en el medio BSM, en el que se lleva a cabo el crecimiento del microorganismo. Este lavado se realiza mediante dos centrifugaciones del cultivo crecido en medio LB, a 9000 rpm, 4°C durante 5 min, resuspendiendo las células en suero salino tras cada centrifugación.

En la Tabla 3.3 se recogen, de forma esquemática, los experimentos llevados a cabo para realizar el estudio de la influencia del lavado de las células, mostrando, más adelante, la Figura 3.5, las diferentes curvas de crecimiento en medio BSM obtenidas cuando se someten o no a lavado (eliminación o no del sulfato), y el porcentaje de desulfuración de esas células obtenido en los ensayos de *resting cells*.

**Tabla 3.3.** Experimentos realizados para estudiar la influencia del lavado del inóculo antes de ser introducido en el medio BSM de crecimiento.

<b>Experimento</b>	<b>Lavado del inóculo (eliminación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>
EP-LV1	No
EP-LV2	Sí

Se puede observar que, a pesar de la presencia de sulfato en el inóculo, cuando las células no son lavadas, el crecimiento es más rápido, aunque el mismo porcentaje de desulfuración de DBT se alcance más tarde (a un  $t_G$  mayor), debido al efecto represor del sulfato durante las primeras horas de crecimiento (hasta que se consume totalmente). Por lo tanto, se ha optado finalmente por no realizar el lavado del inóculo, debido principalmente a dos razones: se obtiene más rápidamente la misma concentración de biomasa en el caso de no lavar, y además se acelera y simplifica el proceso de preparación del inóculo por la eliminación de dicha etapa de lavado.



**Figura 3.5.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medio BSM realizando o no el lavado del inóculo.

### **3.1.2. Procedimiento Experimental Estándar**

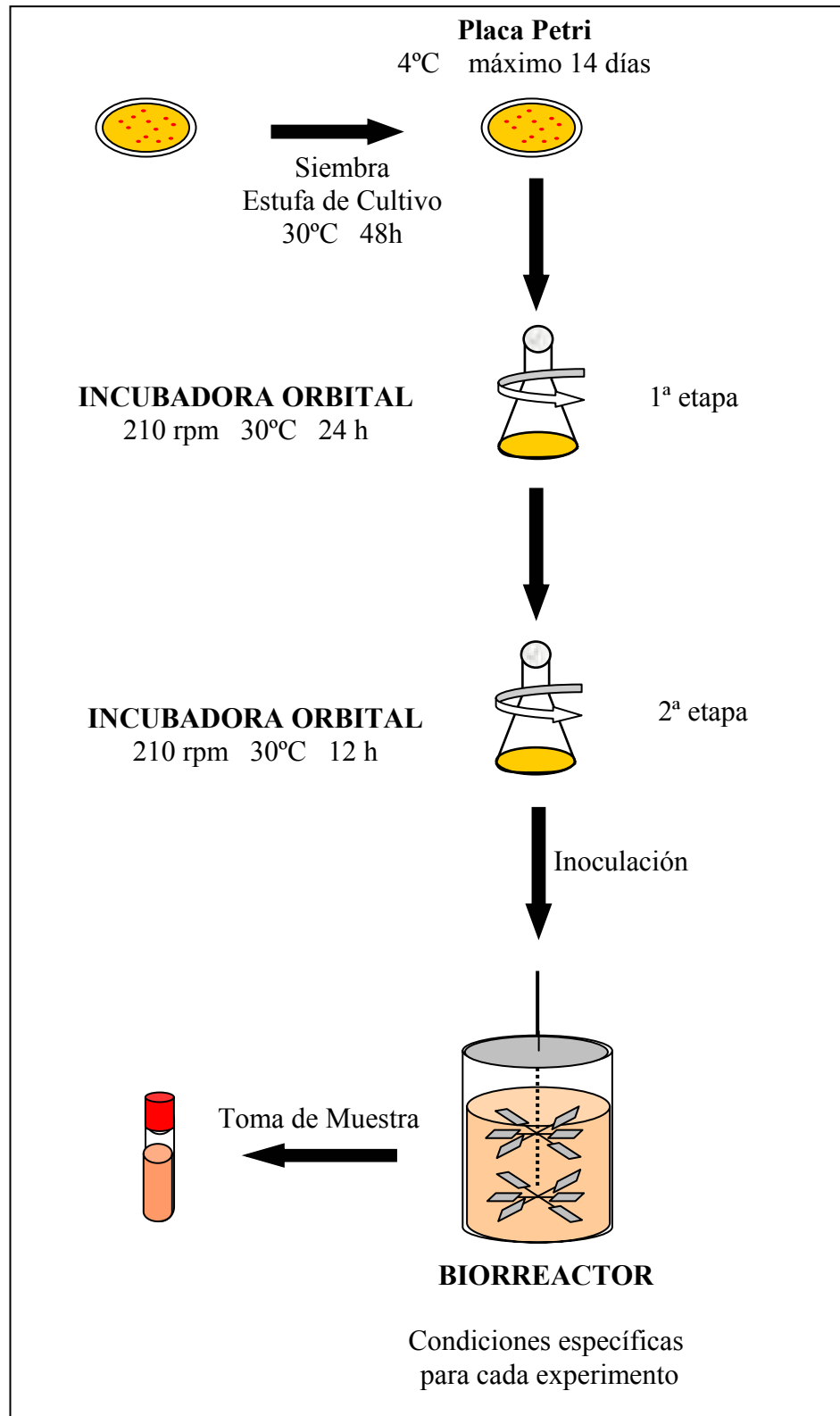
Tras los estudios previos realizados, es posible proponer un procedimiento experimental estándar para la realización de los experimentos descritos en este trabajo, que garanticen la reproducibilidad de los datos obtenidos.

A continuación se muestra un resumen de este procedimiento experimental estándar, que también se puede ver en forma de esquema en la Figura 3.6. De esta manera, los datos experimentales que se obtienen en los experimentos que siguen, en que se estudian la composición del medio y las condiciones de operación en el

crecimiento del microorganismo, podrán compararse y así discriminar entre ellos para llegar a saber cuáles son las mejores condiciones de trabajo. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- El microorganismo se mantiene a 4°C, tras realizar siembra en placa Petri por la técnica de agotamiento de asa, cada 14 días. Transcurrido ese tiempo, se considera que el microorganismo *envejece* y hay que renovarlo.
- Para preparar el inóculo, se introduce, con el asa de siembra, un *loop* de microorganismo en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio LB para llevar a cabo la primera etapa de preparación del inóculo. Tras 24 h de cultivo en incubadora orbital, a 210 rpm y 30°C, se utilizan estas células como preinóculo, para realizar la segunda etapa de crecimiento en medio LB, en las mismas condiciones que la primera, pero en este caso, solamente durante 12 h y fijando una concentración inicial de biomasa de 0,1 g/L.
- El crecimiento del microorganismo en medio BSM se lleva a cabo utilizando el inóculo obtenido en el paso anterior. Los experimentos de crecimiento que se realizan en fermentador comercial (de 2 L de volumen de trabajo), en las condiciones específicas para cada experimento, se hacen fijando una concentración inicial de 0,15 g/L en todos los experimentos, para que los resultados obtenidos puedan ser comparativos. A distintos tiempos, durante el crecimiento, se toman muestras para análisis posteriores.

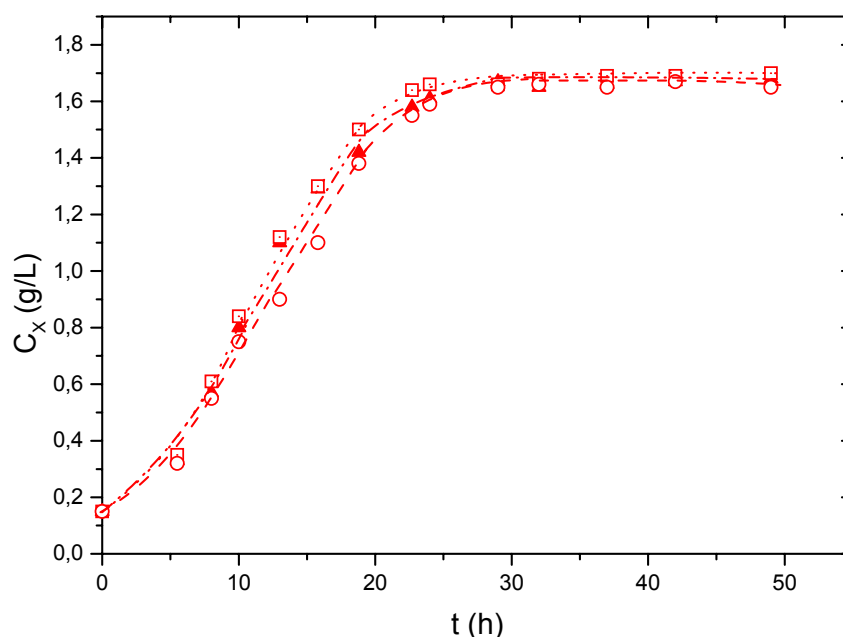




**Figura 3.6.** Procedimiento experimental estándar para la realización de los experimentos en que se estudia el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Para comprobar la reproducibilidad del procedimiento experimental estándar obtenido en este apartado, se han realizado tres experimentos en las mismas condiciones de crecimiento y se han comparado los resultados obtenidos. Las condiciones utilizadas en estos experimentos han sido: glucosa (20g/L) como fuente de carbono, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (670 ppm) como fuente de nitrógeno, temperatura de 30°C, pH 6,7 (Tris-HCl), velocidad de agitación de 400 rpm y aireación 1L/min. Los tres experimentos han sido realizados en fermentador comercial de 2L de capacidad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.7, en la que se representa la evolución de la concentración de biomasa con el tiempo de crecimiento. Como se puede observar, los tres experimentos siguen la misma evolución.



**Figura 3.7.** Experimentos realizados en fermentador comercial para comprobar la reproducibilidad del método experimental estándar. Las condiciones de operación utilizadas durante el crecimiento han sido: glucosa (20g/L) como fuente de carbono, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (670 ppm) como fuente de nitrógeno, temperatura de 30°C, pH 6,7 (Tris-HCl), velocidad de agitación de 400 rpm y aireación 1L/min.

En la Tabla 3.4 se muestran los valores obtenidos en cada uno de los experimentos, junto con el valor medio y la desviación estándar observada. De los valores indicados, se deduce que existe reproducibilidad en la medida. Por lo tanto, el método experimental estándar propuesto a lo largo de este apartado es un buen método de estandarización para llevar a cabo el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 sin ninguna pérdida de reproducibilidad.

**Tabla 3.4.** Valores experimentales de concentración de biomasa obtenidos en los experimentos realizados para comprobar la reproducibilidad del método experimental estándar.

t (h)	C <sub>x</sub> (g/L)			Valor Medio	Desviación Estándar
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0
5,5	0,33	0,35	0,32	0,33	0,015
8	0,57	0,61	0,55	0,57	0,030
10	0,80	0,84	0,75	0,79	0,045
13	1,10	1,12	0,90	1,04	0,121
15,8	1,29	1,30	1,10	1,23	0,112
18,8	1,42	1,50	1,38	1,43	0,061
22,7	1,58	1,64	1,55	1,59	0,045
24	1,61	1,66	1,59	1,62	0,036
29	1,67	1,66	1,65	1,66	0,010
32	1,65	1,68	1,66	1,66	0,015
37	1,66	1,69	1,65	1,66	0,020
42	1,67	1,69	1,67	1,67	0,011
49	1,68	1,70	1,65	1,67	0,025

### 3.2. ESTUDIO del MEDIO de CRECIMIENTO

Como se ha comentado, la etapa de crecimiento del microorganismo es una de las principales fases en el proceso global de biodesulfuración de DBT, ya que es la etapa que proporciona el catalizador (microorganismo) que va a ser utilizado más adelante para eliminar los compuestos indeseables del medio. Como en la literatura no se han encontrado estudios en los que se comparen distintos medios de crecimiento para la etapa de producción de ese biocatalizador, en este apartado se ha realizado un estudio de la composición de dicho medio de crecimiento, con el fin de determinar cuáles son las fuentes que proporcionan unas mejores resultados en la preparación del biocatalizador o crecimiento del microorganismo utilizado para realizar la biodesulfuración de DBT.

En lo referente a lo encontrado en la literatura, en cuanto a la composición del medio y, respecto a la fuente de azufre a emplear durante el crecimiento, se suelen utilizar alguna de las que no inhiben la expresión de los genes de desulfuración de la ruta 4S (Wang y Krawiec, 1996; Oldfield y col., 1997), es decir, DBT y sus derivados, o DMSO, como muestra la Tabla 3.5. En lo referente a la fuente de carbono, se emplea una gran variedad, como se puede ver recogido en la Tabla 3.6. Y como fuente de nitrógeno, en el medio de crecimiento se emplea siempre cloruro amónico, en concentración de 2 g/L, con una sola excepción, en que se emplea nitrato amónico, como se muestra en la Tabla 3.7.

Para poder llevar a cabo el estudio de la influencia de la **composición del medio de crecimiento** de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se han realizado experimentos, variando, según el caso, el tipo de fuente (de azufre, de carbono y de nitrógeno) y/o la concentración de la misma. El estudio de la **fente de azufre** se ha abordado, en primer lugar, realizando una comparación entre tres distintas fuentes de azufre: DBT, DMSO y sulfato magnésico. Las dos primeras son las más utilizadas en la literatura. La última, dado el efecto represor del sulfato sobre los genes de la ruta 4S, no se suele utilizar. No obstante, se ha considerado de interés emplearla para comparar el crecimiento del microorganismo sobre esa fuente respecto a las otras dos. En segundo lugar, se ha abordado también el estudio del efecto de la **concentración de DMSO**. En este caso, se ha empleado

una fuente que no reprime los genes de la ruta 4S (DMSO) y que, además, el microorganismo es capaz de metabolizar como fuente de azufre sin emplear durante el crecimiento la maquinaria enzimática de la desulfuración. De esta forma se ensayará esta actividad desulfurante en el ensayo posterior de *resting cells*.

En cuanto a la **fente de carbono**, se han estudiado 3 tipos de fuente: un azúcar (glucosa), un aminoácido (ácido glutámico) y un intermedio metabólico (ácido cítrico). Todas estas fuentes de carbono fueron ensayadas en una concentración de 20 g/L, con el fin de que no fuese el sustrato limitante del crecimiento de la bacteria. Así mismo, todos estos experimentos se han realizado empleando DMSO como fuente de azufre (1300 µM) y cloruro amónico como fuente de nitrógeno (2 g/L).

**Tabla 3.5.** Tipos de fuente de azufre empleadas por los distintos autores en la literatura.

<b>Fuente de Azufre</b>	<b>Autores que la emplean</b>
DBT y derivados	Purdy y col., 1993
DBT y derivados	Gallagher y col., 1993
DBT y derivados	Izumi y col., 1994
DBT y derivados	Wang y Krawiec, 1994 y 1996
DBT y derivados	Oldfield y col., 1997
DBT y derivados	Gilbert y col., 1998
DMSO	Omori y col., 1995
DMSO	Oldfield y col., 1997
DMSO	Kayser y col., 1993

**Tabla 3.6.** Tipos de fuente de carbono empleadas por los distintos autores en la literatura.

<b>Fuente de Carbono</b>	<b>Autores que la emplean</b>
Glicerol	Kayser y col., 1993
Glicerol	Gallagher y col., 1993
Glicerol	Gilbert y col., 1998
Glucosa	Omori y col., 1992
Glucosa	Oldfield y col., 1997
Glucosa	Izumi y col., 1994
Glucosa	Lee y col., 1995
Fructosa	Gilbert y col., 1998
Etanol	Omori y col., 1992
Succinato sódico	Omori y col., 1995
Acetato sódico	Lee y col., 1995

**Tabla 3.7.** Tipos de fuente de nitrógeno empleadas por los distintos autores en la literatura.

<b>Fuente de Nitrógeno</b>	<b>Autores que la emplean</b>
NH <sub>4</sub> Cl	Izumi y col., 1994
NH <sub>4</sub> Cl	Ohshiro y col., 1994 y 1996
NH <sub>4</sub> Cl	Gallagher y col., 1993
NH <sub>4</sub> Cl	Oldfield y col., 1997
NH <sub>4</sub> Cl	Gilbert y col., 1998
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Omori y col., 1995

Respecto al estudio de **fuentes de nitrógeno**, ya se ha comentado que la fuente habitualmente empleada es el cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), por lo que no parece oportuno estudiar otros tipos de fuentes nitrogenadas inorgánicas. Por otro lado, debido a que una de las fuentes de carbono antes comentadas (ácido glutámico) podría actuar no solo de fuente de carbono sino también de fuente de nitrógeno, tras ser catabolizado por el microorganismo, se planteó el estudio de las posibilidades de adicionar únicamente el aminoácido, o suplementar el medio con cloruro amónico para comparar así los resultados obtenidos. De esta forma, se comprobó si la utilización de ácido glutámico puede suponer alguna ventaja con respecto a la utilización de glucosa, al poder utilizar el microorganismo el ácido glutámico como fuente de carbono y de nitrógeno.

### **3.2.1. Estudio de la Fuente de Azufre**

Como ya se comentó anteriormente, para el estudio de la fuente de azufre, se han realizado experimentos con sustratos azufrados de distinto tipo: DBT, DMSO y sulfato magnésico, empleando una concentración de 250  $\mu\text{M}$  (experimentos M-S1, M-S2 y M-S3), como se recoge de forma esquemática en la Tabla 3.8. Los dos primeros compuestos son los más utilizados en la literatura, y el sulfato se ha considerado para comprobar su efecto inhibitor de la capacidad desulfurante en el microorganismo. Durante estos experimentos, se utilizó glucosa (20g/L) como fuente de carbono, y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno. La temperatura durante todos los experimentos se fijó en 30°C, mientras que el valor del pH se mantuvo constante en 6,7 mediante la utilización de un tampón Tris-HCl. En cuanto a la velocidad de agitación, se varió durante los experimentos entre 100 y 400 rpm, y el caudal de aire fue de 2L/Lmin durante los experimentos, saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

**Tabla 3.8.** Experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia del tipo de fuente de azufre utilizado en el medio de crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

<b>Exp.</b>	<b>Fuente Carbono</b>	<b>Conc (g/L)</b>	<b>Fuente Azufre</b>	<b>Conc (μM)</b>	<b>Fuente Amonio</b>	<b>Conc (g/L)</b>
M-S1	Glucosa	20	DBT	250	NH <sub>4</sub> Cl	2
M-S2	Glucosa	20	DMSO	250	NH <sub>4</sub> Cl	2
M-S3	Glucosa	20	MgSO <sub>4</sub>	250	NH <sub>4</sub> Cl	2

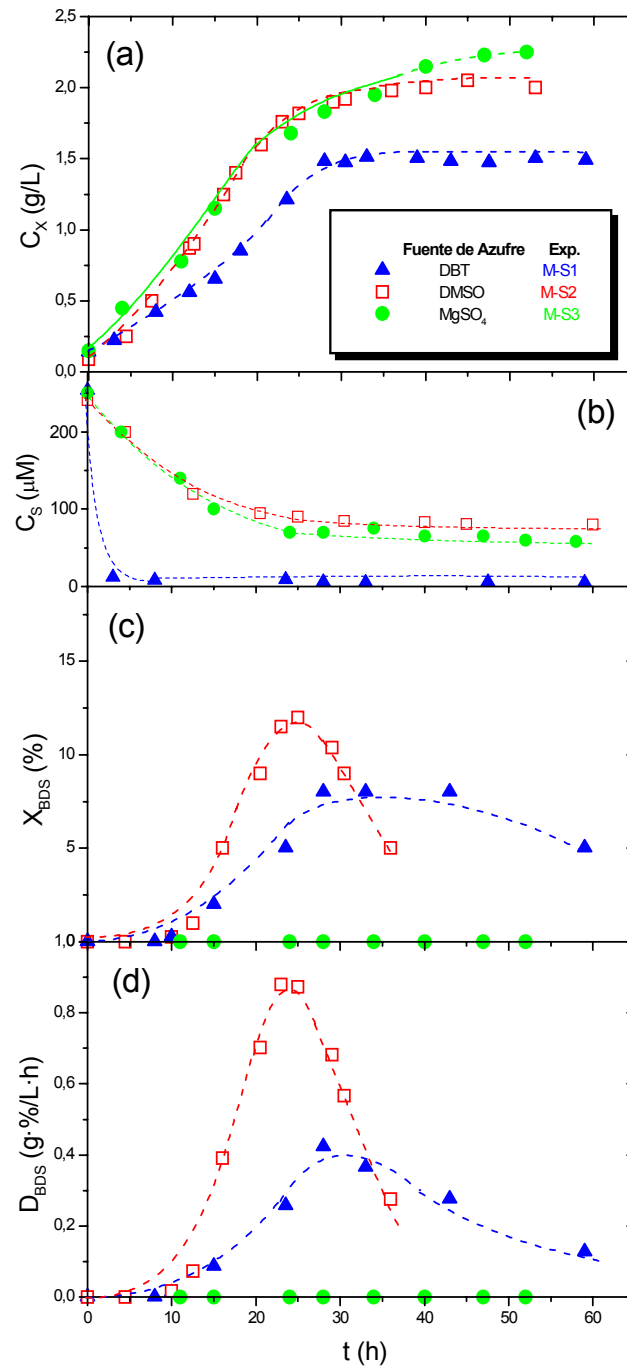
En la Figura 3.8 se pueden ver los resultados obtenidos para las diferentes fuentes de azufre, observándose claras influencias. La velocidad de crecimiento, que se puede observar en la Figura 3.8a, es similar al utilizar DMSO o sulfato como fuente de azufre y algo mayor que en el caso de usar DBT. En cuanto a la concentración máxima de biomasa alcanzada, existe una diferencia significativa entre el uso de DBT o de cualquiera de las otras dos fuentes (1,51 g/L frente a 2,0 ó 2,17 g/L para DMSO y sulfato), lo que podría estar indicando una inhibición en el crecimiento del microorganismo por HBP, producto final de la ruta 4S. Esto indica que DMSO es la fuente de azufre más apropiada a utilizar en el medio de crecimiento en cuanto a la cantidad de biomasa obtenida tras su utilización.

En cuanto a la evolución de las concentraciones de DBT, DMSO y MgSO<sub>4</sub>, como muestra la Figura 3.8b, en todos los casos se observa una disminución a lo largo del crecimiento, siendo ésta más acusada en el caso de utilizar DBT, en cuyo caso se consume casi totalmente durante las tres primeras horas del crecimiento, para luego mantenerse constante en un valor de aproximadamente 10 μM. Cuando se utiliza DMSO o MgSO<sub>4</sub>, sin embargo, el consumo es más lento durante las primeras horas del crecimiento, y se mantiene después constante en un valor más alto, de aproximadamente 80 μM, coincidiendo con el momento en que el microorganismo entra en la fase estacionaria de crecimiento y la concentración de biomasa también permanece en un valor constante.



Respecto al desarrollo del porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) obtenido para las diferentes fuentes de azufre (Figura 3.8c), como era de esperar, al utilizar sulfato se inhibe la síntesis de los genes de la ruta 4S y no se encuentra capacidad desulfurante en ningún punto a lo largo del crecimiento. En cuanto a utilizar DMSO y DBT, se aprecia mayor desulfuración en el primer caso, en torno a las 25 h del crecimiento (cerca del final de la fase exponencial de crecimiento), alcanzándose un valor máximo de un 12% de desulfuración. En el segundo caso (al utilizar DBT como fuente de azufre), el porcentaje de desulfuración se mantiene en un valor más o menos constante durante el crecimiento de la bacteria, pero con un valor máximo más pequeño, en torno al 9%. Así, es de nuevo DMSO la fuente de azufre que proporciona un mayor porcentaje de desulfuración respecto a las otras dos, resultando ser la más adecuada.

Estos resultados se pueden resumir observando el grado de desulfuración durante el crecimiento del microorganismo,  $D_{BDS}$  en la Figura 3.8d. El valor máximo de este parámetro se obtiene cuando se utiliza DMSO como fuente de azufre ya que, como se ha comentado, de esta forma se alcanza, en el mínimo tiempo de crecimiento, una mayor concentración de microorganismo que proporciona un mayor porcentaje de desulfuración. Por tanto, DMSO es la fuente de azufre más adecuada para llevar a cabo el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8.



**Figura 3.8** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **fuentes de azufre** con concentraciones iniciales de 250  $\mu\text{M}$  (DMSO, DBT y  $\text{MgSO}_4$ ); y utilizando en todos los casos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

- Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento.
- Evolución de la concentración de sustrato durante el crecimiento.
- Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.

Una vez obtenidos estos resultados, se emplearon diferentes concentraciones de DMSO para realizar el estudio de esta fuente de azufre, que resultó la mejor elección en los experimentos anteriores para ser utilizada en el medio de crecimiento: 50, 250, 500 y 1300  $\mu\text{M}$  (experimentos M-S2.1, M-S2.2, M-S2.3 y M-S2.4). Las condiciones utilizadas en estos experimentos se encuentran recogidas de forma esquemática en la Tabla 3.9. Durante estos experimentos, se utilizó, al igual que en los anteriores, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno. La temperatura durante todos los experimentos se fijó en 30°C, mientras que el valor del pH se mantuvo constante en 6,7 mediante la utilización de un tampón Tris-HCl. En cuanto a la velocidad de agitación, se varió durante los experimentos entre 100 y 400 rpm, y el caudal de aire fue de 2 L/Lmin durante los experimentos, saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

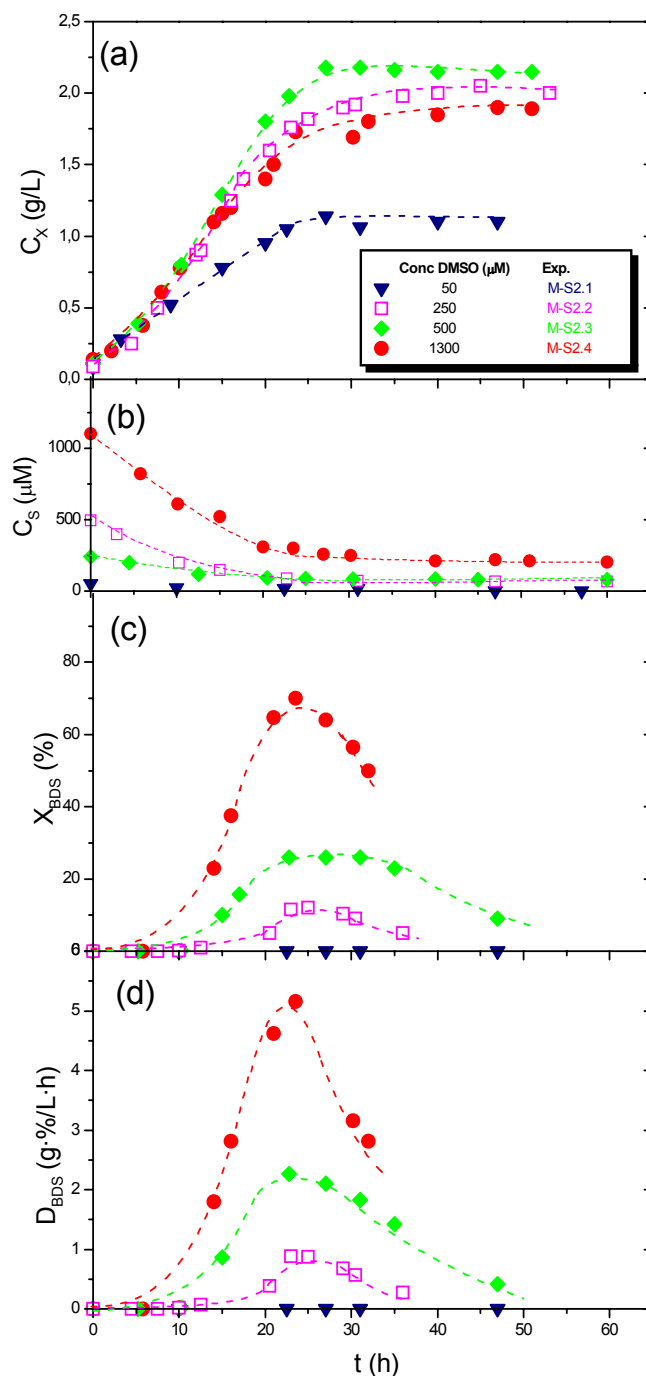
**Tabla 3.9.** Experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia de la concentración de DMSO como fuente de azufre utilizada en el medio de crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Exp.	Fuente Carbono	Conc (g/L)	Fuente Azufre	Conc ( $\mu\text{M}$ )	Fuente Amonio	Conc (g/L)
M-S2.1	Glucosa	20	DMSO	50	$\text{NH}_4\text{Cl}$	2
M-S2.2	Glucosa	20	DMSO	250	$\text{NH}_4\text{Cl}$	2
M-S2.3	Glucosa	20	DMSO	500	$\text{NH}_4\text{Cl}$	2
M-S2.4	Glucosa	20	DMSO	1300	$\text{NH}_4\text{Cl}$	2

En la Figura 3.9a se muestra la comparación de la evolución de la concentración de biomasa obtenida al realizar los experimentos con diferentes concentraciones de DMSO. Como puede observarse, la velocidad específica de crecimiento es muy similar para las cuatro concentraciones de DMSO, aunque algo menor cuando la concentración de DMSO utilizada es la menor, de 50  $\mu\text{M}$ . Esto puede ser debido al hecho de que este valor tan bajo de concentración puede estar limitando el crecimiento del microorganismo, lo cual puede deducirse

también del hecho de que la concentración de biomasa máxima alcanzada con 50  $\mu\text{M}$  de DMSO es muy inferior a la obtenida con el resto de concentraciones (alrededor de 2g/L), de solamente 1,10 g/L. Esto es debido a que, una vez que la fuente de azufre se ha consumido, el microorganismo entra en la fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, la mayor concentración de biomasa alcanzada en el estado estacionario se obtiene cuando la concentración de DMSO es 500  $\mu\text{M}$ , mayor que para 250 y 1300  $\mu\text{M}$ , lo que podría indicar una inhibición del crecimiento a altas concentraciones de DMSO. Así, en cuanto a la concentración de biomasa, la Figura 3.9 a) indica una concentración de DMSO 500  $\mu\text{M}$  como mejor opción para llevar a cabo el crecimiento del microorganismo.

En la Figura 3.9b se puede apreciar el consumo de DMSO por parte del microorganismo. En todos los casos dicho consumo es más rápido durante la fase exponencial del crecimiento, para luego mantenerse más o menos constante una vez que la bacteria entra en la fase estacionaria de crecimiento y no aumenta más su concentración de biomasa en el tiempo. Se puede destacar que cuando la concentración inicial de DMSO es 50  $\mu\text{M}$ , éste se agota alrededor de las 30 h de crecimiento, momento que coincide con la entrada del microorganismo en la fase estacionaria, lo cual apoya la suposición realizada anteriormente: en este caso, la fuente de azufre está limitando el crecimiento del microorganismo.



**Figura 3.9.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **concentraciones de DMSO** (1300, 500, 250 y 50  $\mu\text{M}$ ); y utilizando en todos los casos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

- Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento.
- Evolución de la concentración de sustrato durante el crecimiento.
- Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.

Respecto al porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) obtenido a lo largo del crecimiento (recogido en la Figura 3.9 c) para cada una de las concentraciones iniciales de DMSO analizadas, se puede concluir que cuanto mayor es la concentración de DMSO, mayor es el porcentaje de desulfuración alcanzado durante los ensayos de *resting cells*. Así para una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , el porcentaje de desulfuración es 0 %, para 250  $\mu\text{M}$  es de 10 %, para 500  $\mu\text{M}$  de 20 %, y, finalmente, para 1300  $\mu\text{M}$  se alcanza un 75 % de desulfuración de DBT. Por lo tanto, la concentración de DMSO a utilizar para llevar a cabo un crecimiento óptimo del microorganismo, es 1300  $\mu\text{M}$ . Esta elección queda clara cuando se analiza el grado de desulfuración durante el crecimiento, cuya evolución se muestra en la Figura 3.9 d). Se observa la misma tendencia que para el porcentaje de desulfuración, es decir, su valor aumenta a medida que aumenta la concentración de DMSO utilizada, alcanzándose un valor máximo de 5,16 cuando la concentración de DMSO es 1300  $\mu\text{M}$ , y disminuyendo progresivamente hasta 0 cuando ésta es solamente de 50  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.2. Estudio de la Fuente de Carbono**

Para estudiar la influencia de la fuente de carbono en el medio de crecimiento se han realizado los experimentos M-C1, M-C2 y M-C3, correspondientes a la utilización de glucosa, ácido glutámico y ácido cítrico, como se puede ver resumido en la Tabla 3.10. Los tres experimentos se han llevado a cabo empleando, en todos los casos, una concentración inicial de 20 g/L de fuente de carbono, 1300  $\mu\text{M}$  de DMSO como fuente de azufre, y 2 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno, siendo las condiciones de operación las siguientes: temperatura constante de 30°C a lo largo de todo el experimento, pH de 6,7 mantenido con tampón Tris-HCl, velocidad de agitación entre 100 y 400 rpm, caudal de aire constante de 2L/Lmin y concentración inicial de oxígeno de un 100% del valor de saturación.

**Tabla 3.10.** Experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia de la fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Exp.	Fuente Carbono	Conc (g/L)	Fuente Azufre	Conc (μM)	Fuente Amonio	Conc (g/L)
M-C1	Glucosa	20	DMSO	250	NH <sub>4</sub> Cl	2
M-C2	Ácido Glutámico	20	DMSO	250	NH <sub>4</sub> Cl	2
M-C3	Ácido Cítrico	20	DMSO	250	NH <sub>4</sub> Cl	2

En la Figura 3.10 se muestra la evolución de la concentración de biomasa, de sustrato carbonado, el porcentaje de desulfuración y el grado de desulfuración durante el crecimiento, obtenidos empleando diferentes fuentes de carbono. Como se puede observar en la Figura 3.10a, en la que se muestran los datos experimentales de concentración de biomasa, el crecimiento con glucosa es más rápido que el observado con las otras dos fuentes de carbono. Respecto a la concentración máxima alcanzada en la fase estacionaria, se alcanza un valor más alto cuando el crecimiento del microorganismo se realiza con glucosa y con ácido glutámico, siendo, en ambos casos entre 1,75 y 2 g/L. La concentración final obtenida con ácido cítrico es significativamente menor, no llegando a superar el valor de 1,5 g/L. De estas observaciones se puede deducir que la fuente de carbono que proporciona unas mejores condiciones durante el crecimiento es la glucosa, ya que se alcanza una mayor concentración de biomasa en menos tiempo, disminuyendo así el tiempo de operación, a pesar de que la biomasa alcanzada en la fase estacionaria sea menor que la obtenida cuando se utiliza ácido glutámico.

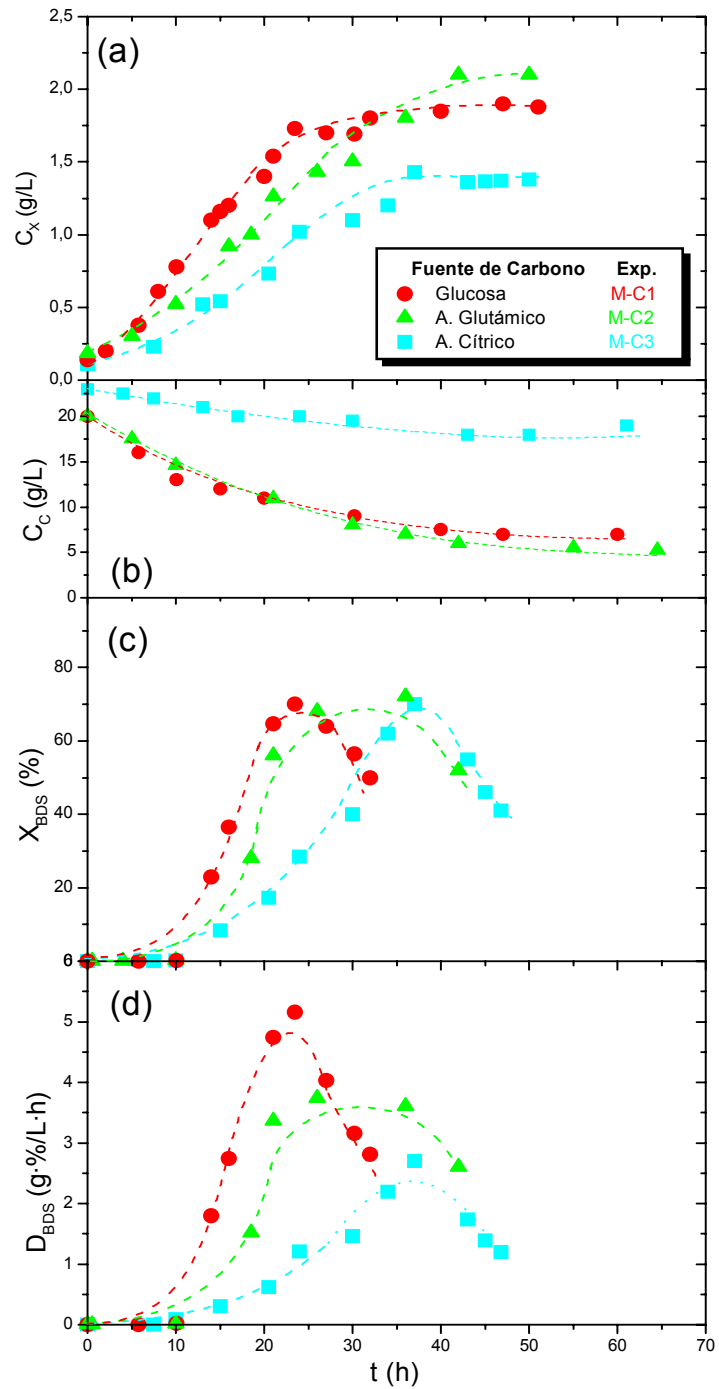
La evolución del sustrato carbonado, como se puede ver en la Figura 3.10b, muestra un consumo de éste en todos los casos, pero este es menor cuando se utiliza ácido cítrico como fuente de carbono, por lo cual se estaciona en un valor bastante más alto que en los otros dos casos, en que el consumo es muy parecido en cuanto a velocidad y en cuanto a concentración de sustrato carbonado alcanzada (aproximadamente unos 5 g/L) cuando el microorganismo entra en la

fase estacionaria de crecimiento, momento en el cual ya no se aprecia aumento de la concentración de biomasa y la bacteria deja de consumir la fuente de carbono

En la Figura 3.10c se puede ver la evolución del porcentaje de desulfuración de DBT de *R. erythropolis* IGTS8 ( $X_{BDS}$ ) empleando las tres fuentes de carbono para su crecimiento. Este parámetro alcanza un valor máximo en torno al 75% en todos los casos. La diferencia se encuentra en el tiempo necesario para alcanzar dicho valor máximo. Así, cuando se utiliza glucosa, el valor máximo de  $X_{BDS}$  se obtiene a las 24 h de crecimiento, mientras que cuando se usa ácido cítrico o ácido glutámico como fuente de carbono, este tiempo se retrasa hasta las 30 h ó 40 h de crecimiento, respectivamente. Por tanto, también en este caso se puede descartar el empleo de ácido cítrico y ácido glutámico como fuente de carbono durante el crecimiento del microorganismo, ya que con glucosa se alcanza antes el tiempo en el cual el microorganismo logra su máximo porcentaje de desulfuración de DBT.

Otro aspecto importante a considerar es el tiempo de crecimiento en el que se mantiene la capacidad de desulfuración en valores altos (muy cercanos al máximo). En este sentido, el ácido glutámico permite obtener un biocatalizador con una capacidad desulfurante estable en un intervalo amplio de tiempo (entre las 25 y 35 h). Este factor se encuentra incluido en el parámetro que se ha definido como grado de desulfuración durante el crecimiento ( $D_{BDS}$ ), que tiene en cuenta los tres aspectos que muestra la gráfica, es decir,  $C_X$ ,  $X_{BDS}$  y  $t$ . Si se observa la Figura 3.10 c), se puede observar que el máximo valor de  $D_{BDS}$  es 5,16, obtenido cuando la fuente de carbono empleada para crecimiento es la glucosa. Cuando el crecimiento se lleva a cabo con ácido glutámico, el valor máximo de  $D_{BDS}$  es menor, de 3,76, y es incluso menor para ácido cítrico, 2,72. Esto indica que es la glucosa la fuente de carbono que proporciona las mejores condiciones para llevar a cabo el crecimiento o producción del biocatalizador, ya que con ello se consigue una mayor capacidad desulfurante y una mayor concentración de biomasa en el mínimo tiempo posible.





**Figura 3.10.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **fuentes de carbono** en concentración de 20g/L (glucosa, ácido cítrico y ácido glutámico); y utilizando en todos los casos NH<sub>4</sub>Cl (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-HCl (pH 7,5), temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

- a) Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento.
- b) Evolución de la concentración de sustrato durante el crecimiento.
- c) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- d) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.

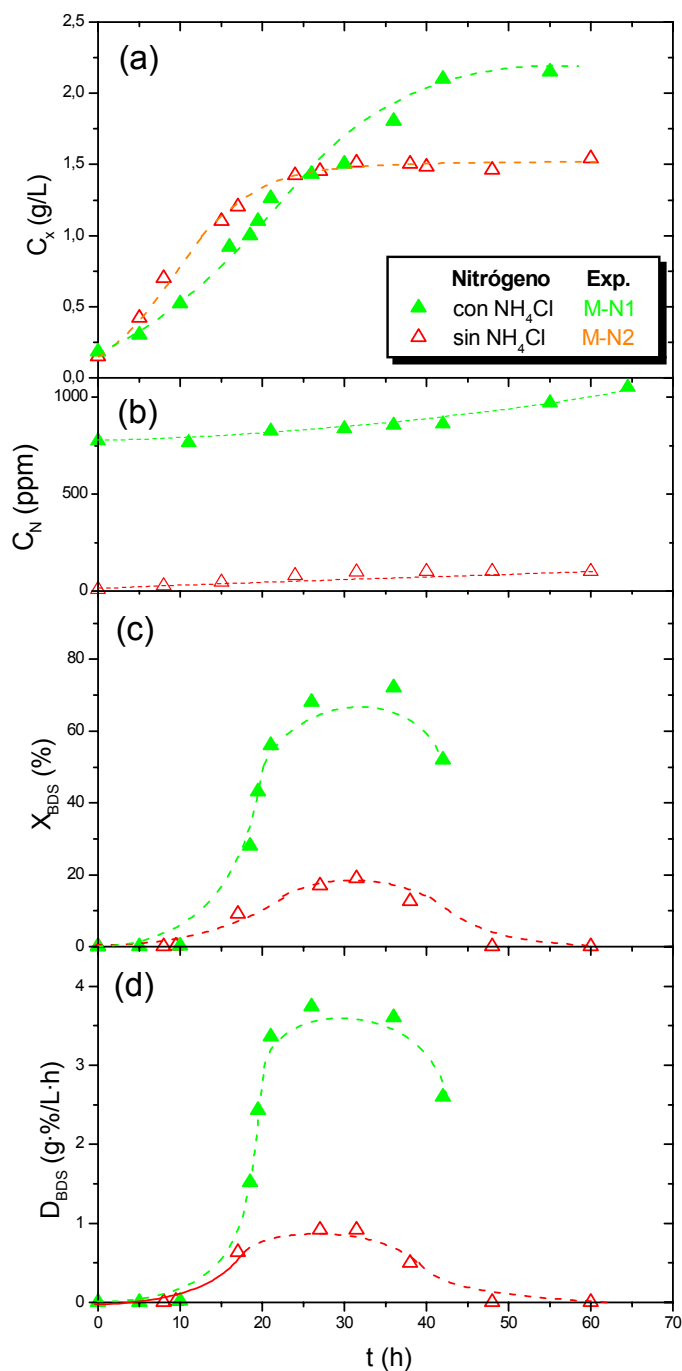
### **3.2.3. Estudio de la Fuente de Nitrógeno**

La fuente de nitrógeno más empleada para el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 es el cloruro de amonio, en concentraciones de 1 ó 2 g/L. En este trabajo se ha utilizado esta fuente de nitrógeno, empleando la concentración de 2 g/L en el medio de crecimiento. Sin embargo, hay que considerar que el ácido glutámico se puede utilizar a la vez como fuente de carbono y nitrógeno, por lo que se pueden comparar los resultados obtenidos utilizando el ácido glutámico con o sin la adición de cloruro amónico (como fuente de nitrógeno complementaria). En la Tabla 3.11 se resumen los experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia de la adición de cloruro amónico al medio de crecimiento cuando se utiliza ácido glutámico como fuente de carbono.

**Tabla 3.11.** Experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia de la fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

<b>Exp.</b>	<b>Fuente Carbono</b>	<b>Conc (g/L)</b>	<b>Fuente Azufre</b>	<b>Conc (μM)</b>	<b>Fuente Amonio</b>	<b>Conc (g/L)</b>
M-N1	Ácido Glutámico	20	DMSO	250	NH <sub>4</sub> Cl	2
M-N2	Ácido Glutámico	20	DMSO	250	-	-

Así, en la Figura 3.11 se representan, de forma comparativa, los resultados obtenidos ( $C_X$ ,  $C_N$ ,  $X_{BDS}$  y  $D_{BDS}$ ) al realizar los dos experimentos planteados para estudiar la fuente nitrogenada (experimentos M-N1 y M-N2): ácido glutámico como única fuente de carbono y nitrógeno, y ácido glutámico con adición de cloruro amónico como fuente de nitrógeno. En ambos casos, se utilizó DMSO como fuente de azufre en concentración 1,3 mM, una temperatura de trabajo de 30°C, se mantuvo el pH en un valor constante de 6,7 utilizando tampón Tris-HCl, la velocidad de agitación varió entre 100 y 400 rpm, el caudal de aire fue de 2L/Lmin, y la concentración inicial de oxígeno disuelto se fijó en un 100% del valor de saturación.



**Figura 3.11.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando ácido glutámico como única fuente de nitrógeno, y ácido glutámico con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L); y utilizando en todos los casos ácido glutámico (20g/L) como fuente de carbono, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

- a) Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento.
- b) Evolución de la concentración de sustrato durante el crecimiento.
- c) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento
- d) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.

Como se puede observar en la citada Figura, la presencia de nitrógeno amoniacal tiene una clara influencia, no sólo en el crecimiento del microorganismo (Figura 3.11a) sino también en la capacidad de eliminación de azufre de la molécula de DBT que presentan las células generadas, es decir, en el porcentaje de desulfuración que se obtiene con esas células ( $X_{BDS}$ ), representado en la Figura 3.11c. En cuanto al primer efecto, la velocidad de crecimiento es algo mayor cuando se utiliza solo ácido glutámico que en el caso de emplear ambas fuentes de nitrógeno; y la concentración máxima de biomasa alcanzada en la fase estacionaria de crecimiento es menor cuando no se adiciona amonio (1,49 g/L) que la obtenida con adición del mismo (2,15 g/L).

En cuanto a la fuente de nitrógeno, cuya evolución se muestra en la Figura 3.11 b, claramente se observa un aumento de la concentración de cloruro amónico debido a su expulsión al medio de crecimiento, proveniente de la ruptura de la molécula de ácido glutámico.

La influencia sobre el porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) es clara, en ausencia de amonio el desarrollo de la capacidad desulfurante se ve muy mermada, alcanzándose valores cercanos al 20%, mientras que en el caso de presencia de nitrógeno amoniacal esta capacidad alcanza valores cercanos al 80% de eliminación de azufre.

Así, como muestra la Figura 3.11d, el valor máximo del grado de desulfuración,  $D_{BDS}$  es de 3,76 en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pero si no se añade esta fuente de nitrógeno, sólo se alcanza un valor máximo de 0,93. Esto podría estar indicando que es necesario adicionar una fuente de nitrógeno, además del ácido glutámico, para el buen desarrollo de la maquinaria enzimática de la Ruta 4S durante el crecimiento del microorganismo.

### **3.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN**

En cuanto a las condiciones de operación utilizadas cuando se lleva a cabo el crecimiento del microorganismo para obtener el biocatalizador que va a ser utilizado más adelante en la biodesulfuración de DBT, en la literatura no se han encontrado estudios en los que se comparen distintas condiciones de operación. Por esa razón, en este apartado se ha realizado un estudio éstas, utilizando el medio de crecimiento con el que se han obtenido los mejores resultados según el apartado 3.2. De esta manera, se podrá determinar también cuáles son las condiciones de operación durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 que proporcionan unas mejores resultados en la preparación del biocatalizador o crecimiento del microorganismo utilizado para realizar la biodesulfuración de DBT.

De la literatura se puede resumir que la mayor parte de los trabajos se han realizado en incubadora. En el caso del trabajo en biorreactor (Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1996) las variables que influyen en el transporte de oxígeno se fijan en 300 rpm y 1,5 L/L/min, empleando volúmenes de trabajo de 0,355 L y 1,5 L. La temperatura empleada es, con alguna excepción, 30°C (Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1994; Ohshiro y col., 1994 y 1996; Omori y col., 1995; Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1996; Oldfield y col., 1997; Gilbert y col., 1998), sólo Wang y Krawiec (1994 y 1996), emplean 25°C y sólo en los experimentos que llevan a cabo en incubadora. En cuanto al pH, Ohshiro y col. (1996) comentan que existe, durante el crecimiento, un descenso en el valor del pH hasta valores de entre 4 y 5,6, dependiendo de la fuente de azufre empleada (DBT y derivados). El equipo de Wang (Wang y Krawiec, 1996; Wang y col., 1996) emplea tampón fosfato, ajustando el pH a valores entre 5 y 7, y realizan experimentos cada 0,5 unidades de pH, encontrando un valor óptimo de 6,5 y que fijan más adelante en los estudios en biorreactor. Ohshiro y col. (1996) e Izumi y col. (1994) emplean un medio con pH 7,5; Gallagher y col. (1993) emplean un medio con pH 6,5; Oldfield y col. (1997) y Omori y col. (1995) parten de un pH de 7,2.

Para abordar el estudio de la influencia de las condiciones de operación durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se han realizado experimentos en que se varía la temperatura, el pH inicial y la concentración de oxígeno disuelto.

El estudio de la **temperatura** se ha abordado realizando un barrido de temperaturas desde 26°C hasta 36°C para buscar las condiciones óptimas entre estos valores ya que por encima y por debajo de ellos la capacidad desulfurante de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se encuentra afectada negativamente (Wang, 1996).

Respecto al estudio del **pH**, ya que los trabajos descritos en la literatura hasta ahora emplean valores de pH entre 6,5 y 7,5 (Olson y col., 1993; Omori y col., 1995; Patel y col., 1997; Kaufman y col., 1999; Folsom y col., 1999; Setti y col., 1999; Magshoudi y col., 2001; Onaka y col., 2000; Matsui y col., 2001; Ohshiro y col., 1999; y Abad y col., 2002) se optó por realizar un experimento control a pH 6,7 y otros dos a pH básico (8,1) y ácido (5,5). Además, al pH central mencionado se probó, por una parte, sin control, y, por otra parte, con control mediante tampón Tris-HCL (pH 7,5) y mediante dosificación de NaOH diluida.

### **3.3.1. Estudio de la Temperatura**

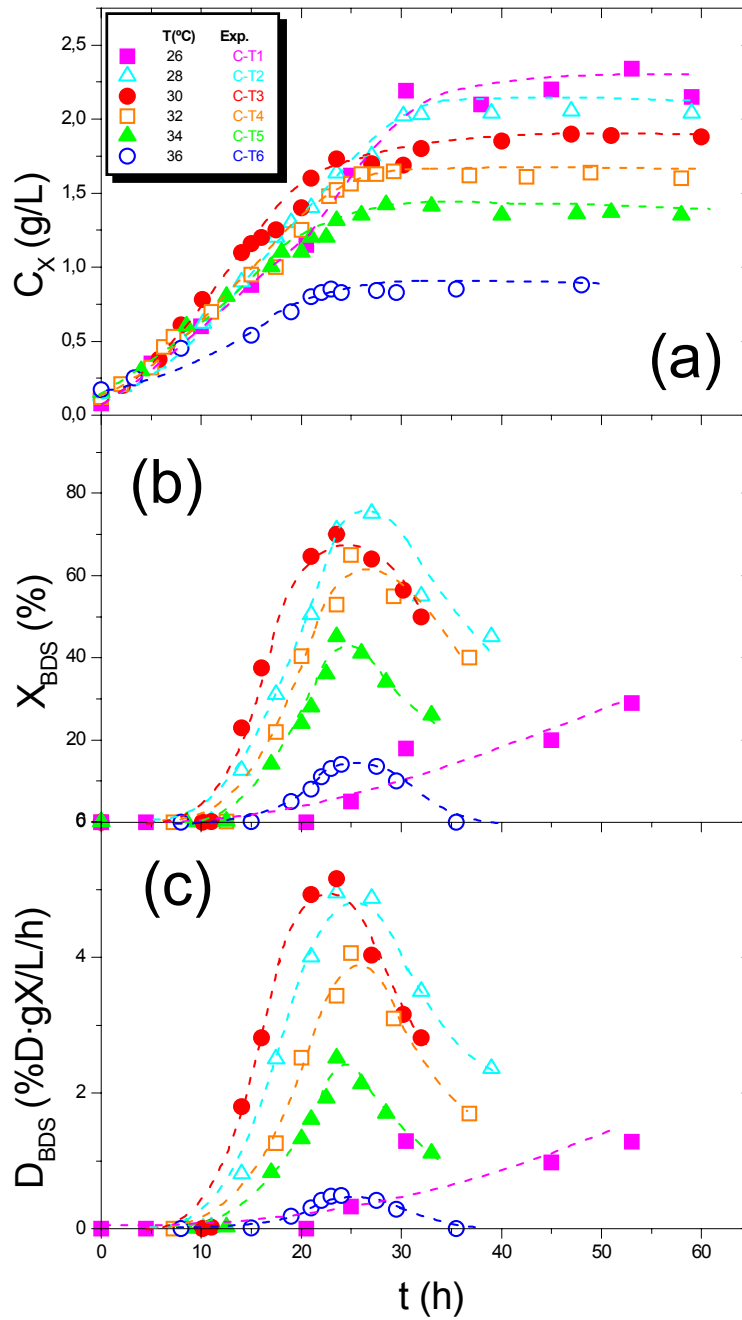
Como ya se ha comentado, se ha variado la temperatura entre 26 y 36°C, realizando para ello seis experimentos, cuyas condiciones de trabajo se resumen en la Tabla 3.12. En todos los casos se utilizó glucosa (20 g/L) como fuente de carbono, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre y NH<sub>4</sub>Cl (2g/L) como fuente de nitrógeno, el pH se mantuvo en un valor de 6,7 mediante el uso de un tampón Tris-HCl, la velocidad de agitación se varió entre 100 y 400 rpm, el caudal de aire introducido fue de 2L/Lmin, y la concentración inicial de oxígeno disuelto se fijó en un 100% de la de saturación.

**Tabla 3.12.** Experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia de la temperatura durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

<b>Exp.</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Control pH</b>	<b>CO<sub>2</sub> (%)</b>	<b>Control CO<sub>2</sub></b>
C-T1	26	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No
C-T2	28	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No
C-T3	30	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No
C-T4	32	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No
C-T5	34	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No
C-T6	36	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No

En la Figura 3.12 se representan, de forma comparativa los resultados obtenidos al realizar los experimentos planteados (experimentos C-T1, C-T2, C-T3, C-T4, C-T5 y C-T6) para estudiar la influencia de la temperatura: 26, 28, 30, 32 y 34°C, esto es, la concentración de biomasa ( $C_X$ ), el porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) y el grado de desulfuración ( $D_{BDS}$ ) obtenido a lo largo del crecimiento.

Como indica la Figura 3.12a, no hay una variación significativa en la velocidad de crecimiento. La diferencia más clara se encuentra en la concentración de biomasa alcanzada; así, cuando disminuye la temperatura de operación, la concentración de biomasa alcanzada en la fase estacionaria de crecimiento es mayor (2,24 g/L para 26°C) que la obtenida a temperaturas más altas (1,37 g/L para 34°C). Por tanto, en cuanto a concentración de biomasa, la mejor opción sería utilizar una temperatura de 26°C, ya que de esta manera, la biomasa obtenida sería mayor en el estado estacionario del crecimiento.



**Figura 3.12.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **temperaturas** (26, 28, 29, 30, 31, 32 y 34°C); y utilizando en todos los casos DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, tampón Tris-HCl (pH 7,5) y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

- a) Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento.
- b) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- c) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.



Sin embargo, si se observa el porcentaje de desulfuración, cuyos valores experimentales a lo largo del crecimiento muestra la Figura 3.12b, se comprueba que *R. erythropolis* IGTS8 alcanza el máximo valor (aproximadamente 75%) en el intervalo de temperatura de 28 a 32°C. En este intervalo, el porcentaje máximo de desulfuración se obtiene entre las 24 y las 30 h de crecimiento, al final de la fase exponencial. Este porcentaje de desulfuración, sin embargo, no alcanza valores mayores del 20% en los experimentos en los que se utilizaron los valores límite de temperatura (26°C y 36°C). Además, cuando la temperatura era de 26°C, este valor máximo no era alcanzado hasta la entrada en la fase estacionaria, aproximadamente a las 55 h de crecimiento. Así, el rango de temperaturas adecuado para llevar a cabo la producción del biocatalizador sería de 28 a 32°C.

Los valores correspondientes al grado de desulfuración ( $D_{BDS}$ ) obtenidos para los diferentes experimentos se representan en la Figura 3.12c. Como se puede ver, la tendencia es la misma que la encontrada para el porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ), y el valor máximo (5,16) se obtiene tras 24 h de crecimiento para el experimento llevado a cabo a 30°C. Así, se puede concluir que la temperatura óptima para realizar el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 en cuanto a biomasa y capacidad desulfurante óptimas es de 30°C.

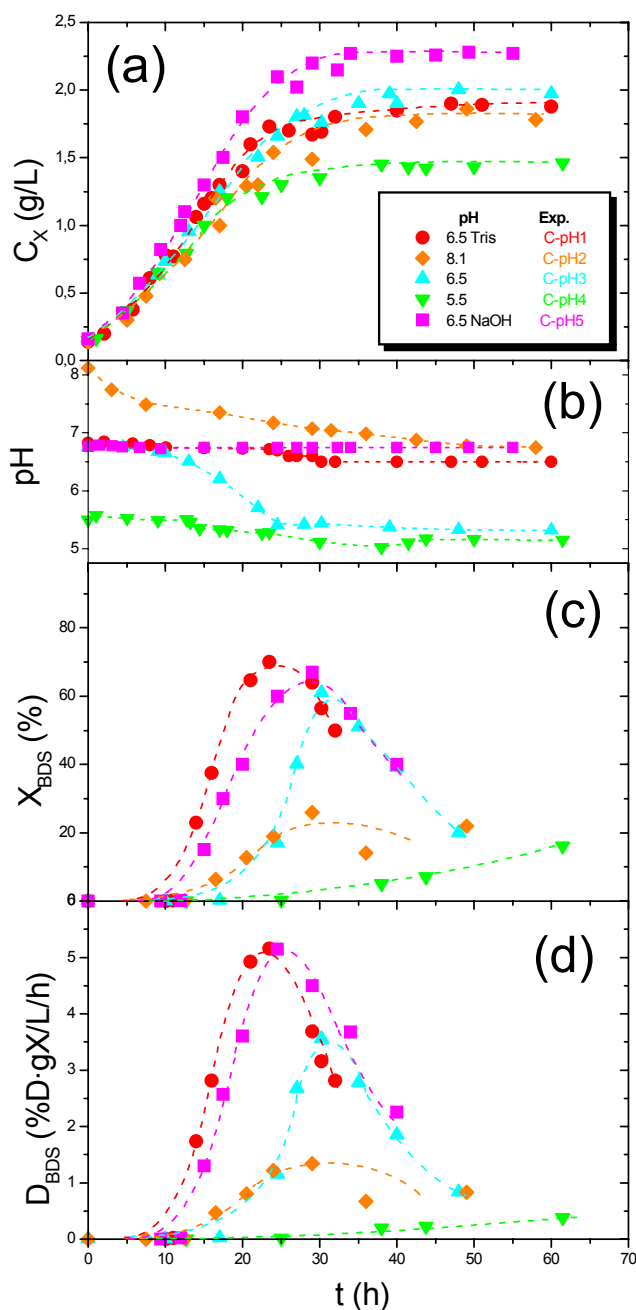
### **3.3.2. Estudio del pH**

Como ya se ha comentado anteriormente, el estudio del pH se ha realizado probando 3 valores diferentes de pH sin control (8,1, 6,7 y 5,5), correspondientes a los experimentos C-pH2, C-pH3 y C-pH4, y además con otros dos experimentos (C-pH1 y C-pH5) en que el pH neutro era controlado mediante el uso de tampón Tris-HCl o la adición de una disolución de NaOH de forma que el pH inicial se mantenía durante todo el experimento, como se recoge en la Tabla 3.13. El resto de condiciones se fijaron en 30°C de temperatura, caudal de aire introducido de 2L/Lmin, concentración inicial de oxígeno disuelto de 100% de saturación, y como fuentes de azufre, carbono y nitrógeno se utilizaron DMSO (1,3 mM), glucosa (20g/L) y NH<sub>4</sub>Cl (2g/L).

**Tabla 3.13.** Experimentos llevados a cabo para estudiar la influencia del pH durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

<b>Exp.</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Control pH</b>	<b>C<sub>O2</sub> (%)</b>	<b>Control C<sub>O2</sub></b>
C-pH1	30	6,7	Sí (tampón Tris-HCl)	100 inicial	No
C-pH2	30	8,1	No	100 inicial	No
C-pH3	30	6,7	No	100 inicial	No
C-pH4	30	5,5	No	100 inicial	No
C-pH5	30	6,7	Sí (disolución NaOH)	100 inicial	No

En la Figura 3.13a se muestra la evolución de la concentración de biomasa obtenida empleando diferentes condiciones de pH. Como puede observarse, el crecimiento es más rápido cuando el pH se controla en un valor de 6,7 mediante la adición de NaOH diluida al fermentador, mientras que esta evolución es más lenta cuando el pH es ácido (5,5). En cuanto a la concentración de biomasa alcanzada en la fase estacionaria de crecimiento, se observa un valor más alto cuando el crecimiento del microorganismo se realiza controlando el pH en un valor de 6,7 mediante la adición de NaOH diluida. Dicho valor máximo es de 2,25 g/L, aproximadamente, comparado con el de 2 g/L en el caso de que el crecimiento se lleve a cabo al mismo pH pero controlando éste mediante un tampón Tris-HCl. La concentración final obtenida a pH 5,5 es significativamente menor, no alcanzando los 1,5 g/L en la fase estacionaria.



**Figura 3.13.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **condiciones de pH** (6,7 sin tamponar, con tampón Tris-HCl y controlando con NaOH diluida, 5,5 sin tamponar, y 8,1 sin tamponar) empleando en todos los casos glucosa (20g/L) como fuente de carbono,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto.

- a) Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento.
- b) Evolución del pH durante el crecimiento.
- c) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- d) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.

En la Figura 3.13b, que muestra el valor del pH, se observa una disminución cuando éste no es controlado, debido probablemente a la expulsión de metabolitos al medio, y esta disminución es mayor cuando el pH inicial es de 6,7, observándose un salto brusco durante la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, mientras que cuando el pH inicial es básico (8,1), la disminución también es importante, pero más progresiva. En el caso de controlar el pH con tampón Tris-HCl, se observa una pequeña disminución de pH, pero poco significativa.

En cuanto a la capacidad desulfurante desarrollada a lo largo del crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 bajo estas condiciones, se aprecia en la Figura 3.12c que el porcentaje máximo de desulfuración se obtiene, entre 24 y 29 h de crecimiento, cuando el pH se controla en un valor de 6,7, ya sea por adición de NaOH diluida o con tampón Tris-HCl. Si se comparan los experimentos llevados a cabo a pH 6,7, se encuentra que cuando no se controla el pH, el máximo porcentaje de desulfuración está desplazado hasta aproximadamente las 30 h de crecimiento y además se mantiene durante muy poco tiempo. Cuando el pH no se controla durante el crecimiento, se observa un menor porcentaje de desulfuración, en torno al 20% cuando el pH inicial es básico, y un 15% cuando es ácido (además, en este último caso, no se alcanza hasta la fase estacionaria de crecimiento, aproximadamente a las 60 h).

Los datos experimentales de  $D_{BDS}$  obtenidos a lo largo del crecimiento se muestran en la Figura 3.13 d); los valores máximos de los experimentos realizados con control de pH a 6,7 (5,15 a las 29 h cuando se añade NaOH diluida, y 5,16 a las 24 h cuando se utiliza tampón Tris-HCl) indican que son éstas las condiciones óptimas durante el crecimiento, ya que de esta forma se obtiene la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible y con una óptima capacidad de desulfuración de DBT.

### **3.4. ESTUDIO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO**

El estudio cinético del crecimiento del microorganismo es una etapa que se debe realizar dentro del estudio de un proceso biológico para poder describir de forma matemática el crecimiento bacteriano, de forma que la aplicación de esta metodología permitirá posteriormente la compleja tarea del cambio de escala en un proceso industrial. Este tipo de procesos son difíciles de describir, porque son multifásicos (gas-líquido-sólido), y además tienen carácter autocatalítico, porque el microorganismo se comporta como un catalizador. Además, las relaciones estequiométricas no son evidentes, ya que el sustrato no se invierte únicamente en formar producto, sino que también se utiliza para el crecimiento y el mantenimiento del microorganismo. A todo esto hay que sumar que cuando se lleva a cabo el cambio de escala, varía la velocidad relativa a la que ocurren los diferentes fenómenos, y a veces también la etapa controlante de la velocidad y, por tanto, dichos fenómenos se deben considerar estudiándolos por separado. Así, después podrán ser acoplados, de forma que puedan describir el proceso global y se pueda llevar a cabo el desarrollo del proceso industrial y el diseño y operación del biorreactor.

En los procesos industriales en que se utilizan microorganismos como biocatalizadores, los principales fenómenos que se deben ser tomados en cuenta son los siguientes:

- *Reacciones complejas*, que tienen lugar dentro y en las proximidades del microorganismo.
- *Transferencia de materia* entre las diferentes fases. Habitualmente hay que tener en cuenta la velocidad de transferencia gas-líquido, considerando el sistema como pseudo-homogéneo, incluyendo en fase líquida el microorganismo ya que, hasta el momento, en los modelos no se incluyen los fenómenos de transferencia de materia entre el líquido y la membrana celular, y los que tienen lugar dentro de la célula.
- *Stress hidrodinámico*, debido a la energía aportada al sistema para mejorar la velocidad de transferencia de materia entre las distintas fases.

En algunos casos, este aporte de energía causa daño celular, lo que supone un límite a dicho aporte de energía al sistema.

La complejidad del modelo cinético para describir los procesos que tienen lugar en un proceso biológico varía dependiendo del grado de *estructuración* y de *segregación* que se quiera dar a dicho proceso. Se han propuesto numerosos modelos cinéticos, que se pueden clasificar de la siguiente manera:

<b>MODELOS</b>	<b>NO ESTRUCTURADO</b>	<b>ESTRUCTURADO</b>
<b>NO SEGREGADO</b>	Población celular tratada como un conjunto, individuo medio y con un solo componente	Descripción de una célula media multicomponente, variando sus componentes con el tiempo
<b>SEGREGADO</b>	Población celular con distribución en alguna propiedad, un único componente	Descripción multicomponente de una población celular, heterogeneidad célula a célula

En los modelos no estructurados-no segregados, la biomasa se considera como un único componente. Se considera una célula media, representativa del cultivo. En los modelos estructurados (o de Célula), la descripción de la biomasa se realiza considerando que está formada por varias especies. Se tienen en cuenta los componentes intracelulares. En los modelos químicamente estructurados, se considera la biomasa formada por varias especies y también un metabolismo simplificado (una red de reacciones), y en los modelos segregados, en la descripción del microorganismo se considera la distribución de alguna propiedad, no se considera microorganismo medio.

Los modelos cinéticos más sencillos son los no estructurados-no segregados, que describen al cultivo como una sola especie reactante llamada biomasa, y consideran al microorganismo representativo de la población global. Son de este tipo los modelos empleados en este trabajo. A partir de ahí, la

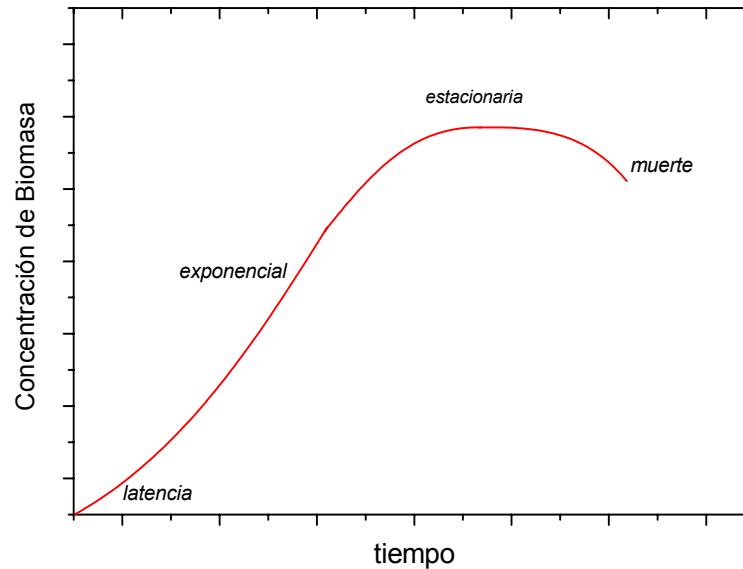
complejidad de los modelos va aumentando hasta los segregados, que se pueden aplicar a procesos en que participan distintos tipos de microorganismos o que se encuentran en diferentes estados, o procesos en que los microorganismos no pueden representarse mediante un microorganismo medio de la población entera con unas propiedades medias.

En este apartado se ha llevado a cabo la descripción matemática del crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 mediante la aplicación de un modelo cinético sencillo (no estructurado no segregado) que describe la evolución de la concentración de biomasa mediante una ecuación sencilla. Además, se ha desarrollado un modelo cinético capaz de describir el desarrollo de la capacidad desulfurante del microorganismo a lo largo de su crecimiento. Dicha capacidad desulfurante se ha considerado como un producto parcialmente asociado al crecimiento, de forma que depende de la fase de crecimiento del microorganismo. Finalmente, debido a la importancia que tiene el oxígeno disuelto en procesos de este tipo, en los que el microorganismo es aerobio estricto y requiere de una concentración de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento para crecer, se ha incluido el estudio del transporte y consumo de oxígeno en el medio, incluyéndose la descripción de su evolución durante el crecimiento en el modelo cinético. Debido a su extensión, éste último estudio no se ha incluido en este apartado sino que se ha descrito en el apartado 3.5 de la presente Memoria.

#### **3.4.1. Modelo Cinético de Crecimiento**

Cuando se tiene un cultivo celular en un medio de crecimiento apropiado, las células utilizan los nutrientes que tienen disponibles con la mayor eficiencia y rapidez, sintetizando sus propios componentes celulares y dividiéndose cuando han conseguido duplicar su masa y su material genético. El tiempo que tarda una célula en hacer todo esto es lo que se conoce como *tiempo de duplicación* y puede variar desde unos 20 minutos en condiciones óptimas hasta varios meses. Cada vez que transcurre ese período de tiempo, el número de células se duplica,

siguiendo, por tanto, un incremento exponencial. De esta manera, el desarrollo de un cultivo discontinuo se ajusta al representado en la Figura 3.14.



**Figura 3.14.** Representación típica de la concentración de biomasa frente al tiempo en un cultivo de *R. erythropolis* IGTS8.

Se pueden distinguir cuatro fases en el crecimiento del microorganismo: la *fase de latencia*, en la que el microorganismo se *adapta* a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer y realizar la producción. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones de partida en las que se encuentra el microorganismo y en las que se desea que trabaje; la *fase exponencial*, en que las células se duplican y aumenta la concentración celular, la *fase estacionaria* en la que no hay aumento neto de microorganismos, lo cual no significa que no se dividan, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros y, por último, la *fase de muerte*, en la que existe un descenso global de células debido a que la velocidad de aparición de nuevos individuos es menor que la de desaparición y disminuye la concentración de biomasa.



Así, el modelo cinético de crecimiento deberá predecir de la forma más exacta posible este tipo de curva de crecimiento, para lo cual se pueden emplear diferentes expresiones matemáticas, en las cuales se basará dicho modelo de crecimiento.

En la literatura, referente a microorganismos con capacidad desulfurante, solamente se ha encontrado un caso en que se describa el crecimiento del microorganismo en biorreactor mediante un modelo cinético: Wang y col. (1996) obtuvieron un modelo de crecimiento para *R. erythropolis* N1-36, basado en la ecuación de Monod, empleando un sistema continuo y determinaron los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento de las células, la constante de afinidad por el sustrato y el coeficiente de rendimiento en biomasa) utilizando la fuente de azufre (DBTO<sub>2</sub>) como sustrato limitante. Las condiciones que utilizaron en este experimento fueron: concentración de glucosa de 6 g/L, concentración de DBTO<sub>2</sub> de 50 μM, pH de 6,0 (mantenido en un valor constante por adición de una disolución de NaOH), temperatura de 30 °C, agitación de 300 rpm y aireación de 1,5 L/L/min. Estos autores obtuvieron valores de 0,180 h<sup>-1</sup> para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), 9 mg/μM para el rendimiento de DBTO<sub>2</sub> en biomasa ( $Y_{xs}$ ), y 0,39 μM para la constante de afinidad por el sustrato ( $K_S$ ).

En este apartado se va a describir, mediante un modelo cinético sencillo no estructurado-no segregado, la evolución del crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en cultivo discontinuo. En este caso, el modelo cinético está basado en la ecuación logística, ampliamente utilizada (Pinches y Pallent, 1986; Weiss y Ollis, 1980), y propuesta por Verhurst en 1844 y Pearl y Reed en 1920 (Bailey y Ollis, 1983).

#### **3.4.1.1. Formulación del Modelo**

En el modelo cinético de crecimiento desarrollado en este trabajo para *R. erythropolis* IGTS8, la biomasa está representada por el conjunto de propiedades

del cultivo celular y se entiende como un microorganismo medio entre todas las células que componen el cultivo.

Para cuantificar la cantidad de biomasa que hay en el cultivo a lo largo del crecimiento del microorganismo, se utiliza la concentración de biomasa (medida en g/L), que en este caso se considera que sigue la evolución a lo largo del tiempo descrita por la ecuación logística, ya que esta función presenta una tendencia similar a la curva de crecimiento del microorganismo. Esta ecuación se desarrolla a partir de la ecuación descrita por Peral y Reed (1920) (Ec. [3.3]), considerando que existe un sustrato limitante del crecimiento, S, como muestran las ecuaciones [3.3] a [3.7].

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_S \cdot C_X \quad [3.3]$$

La velocidad de producción de sustrato, está definida por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_S}{dt} = -Y_{XS} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [3.4]$$

Integrando esta ecuación, con las condiciones de contorno  $t=0 \therefore C_X=C_{X0}$ , se obtiene que:

$$C_S - C_{S_0} = -Y_{XS} \cdot (C_X - C_{X_0}) \quad [3.5]$$

Al ser S el sustrato limitante del crecimiento, cuando

$$C_S=0 \quad \rightarrow \quad C_X=C_X^{max} \quad [3.6]$$

resultando en estas condiciones:

$$C_S = -Y_{XS} \cdot (C_X^{max} - C_{X_0}) \quad [3.7]$$

de forma que:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{\max}}\right) \quad [3.8]$$

Integrando esta ecuación, con la condición inicial:  $t=0 \therefore C_X=C_{X0}$ , se obtiene la ecuación logística, representada por la ecuación [3.9]:

$$C_X = \frac{C_{X_0} \cdot \exp(\mu t)}{1 - \frac{C_{X_0}}{C_X^{\max}} (1 - \exp(\mu t))} \quad [3.9]$$

donde  $C_X$  es la concentración de biomasa,  $C_{X0}$  la concentración inicial de dicha biomasa,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $C_X^{\max}$  la concentración máxima de biomasa alcanzada, y  $t$  es el tiempo transcurrido.

Los parámetros cinéticos de este modelo de crecimiento son, entonces,  $\mu$  y  $C_X^{\max}$ . La velocidad específica de crecimiento está relacionada estrechamente con el tiempo de duplicación de las células en la fase exponencial de crecimiento, y es característica de cada cepa en cada medio de crecimiento y con unas condiciones determinadas. La concentración máxima de biomasa representa la concentración que se alcanza en la fase estacionaria del crecimiento, momento en el cuál dicha concentración es máxima, siendo ésta también característica de la cepa, del medio de crecimiento y de las condiciones de operación utilizadas.

#### ***3.4.1.2. Ajuste de los datos experimentales***

La aplicación del modelo a los datos experimentales de concentración de biomasa ( $C_X$ ) y tiempo, para el cálculo de los parámetros cinéticos del modelo ( $\mu$  y  $C_X^{\max}$ ), se ha realizado en forma integral, aplicando un algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden, mediante un ajuste no lineal en simple respuesta (es decir, se han ajustado aisladamente los datos de  $C$  vs.  $t$  de los experimentos en que se estudiaba el medio de crecimiento y las condiciones de operación). Para ello se ha

utilizado un método integral, empleando el algoritmo de Marquardt, obteniendo como parámetros estadísticos la  $t$  de Student, la  $F$  de Fischer y la suma de residuos al cuadrado (SRC), para un intervalo de confianza del 95%. La suma de residuos al cuadrado viene dada por la ecuación [3.10].

$$SRC = \frac{\sum_{i=1}^N (C_{X_{exp}} - C_{X_{te_i}})^2}{N} \quad [3.10]$$

Los valores de los parámetros del modelo cinético ( $\mu$  y  $C_X^{max}$ ) obtenidos al ajustar cada uno de los experimentos a la ecuación logística se muestran en las Tablas 3.14 a 3.20, que corresponden, respectivamente, a los experimentos en que se estudiaba la influencia del medio de crecimiento y de las condiciones de operación durante el crecimiento del microorganismo. En las Tablas 3.14 a 3.20 figuran también los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las regresiones realizadas ( $t$  de Student,  $F$  de Fischer, intervalo de confianza y suma de los residuos al cuadrado, SRC). Los valores de los citados parámetros estadísticos proporcionan una idea sobre la bondad del ajuste realizado y la fiabilidad de cada uno de los parámetros de la ecuación ajustada.

En las Figuras 3.15 a 3.19 se muestran los datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y el ajuste obtenido aplicando este modelo de crecimiento en que éste se describe mediante la ecuación logística.

### ***Estudio del medio crecimiento***

En este estudio se han realizado experimentos utilizando diferentes fuentes de azufre, carbono y nitrógeno. Como fuente de azufre se han utilizado DMSO, DBT y  $MgSO_4$ , y para la primera de ellas se ha estudiado también la influencia de la concentración en el crecimiento. Como fuente de carbono se han estudiado glucosa, ácido glutámico y ácido cítrico, y como fuente de nitrógeno, se ha estudiado la influencia de añadir o no amonio al medio cuando la fuente de

carbono utilizada es ácido glutámico, que podría usarse a la vez como fuente de carbono y nitrógeno, al contener un grupo amino en su molécula.

Se han ajustado los datos de concentración de biomasa al modelo propuesto para cada uno de los citados experimentos, como se recoge en las Tablas 3.14 a 3.17. En todos los casos, como se puede apreciar en las Figuras 3.15 a 3.17, la predicción de la variación de la concentración de biomasa frente al tiempo que predice el modelo cinético a lo largo de todos los experimentos, es muy cercana a la de los datos experimentales. Por lo tanto, se puede decir que el modelo cinético de crecimiento utilizado en este estudio reproduce muy bien los datos experimentales obtenidos y, por lo tanto, es capaz de describir perfectamente el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 en todos los medios de crecimiento utilizados en este trabajo.

Ajustando los valores de la concentración de biomasa a la ecuación logística en los diferentes experimentos, se han obtenido los parámetros cinéticos del modelo. En la Tabla 3.14 se pueden ver los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos para las diferentes **fuentes de azufre** utilizadas en el estudio de la influencia de dicha fuente en el crecimiento de la bacteria. En cuanto a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), el mayor valor se obtiene cuando se utilizan DMSO (experimento M-S2) o  $\text{MgSO}_4$  (M-S3) como fuente de azufre (0,223 y 0,218  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente), mientras que cuando se usa DBT (experimento M-S1), solamente se alcanza un valor de 0,151  $\text{h}^{-1}$ . Esto se ve claramente reflejado en la Figura 3.21, donde se observa que se alcanza antes la fase estacionaria de crecimiento al utilizar DMSO o  $\text{MgSO}_4$  que con DBT debido a esa mayor velocidad específica de crecimiento. El valor del parámetro  $C_X^{\max}$  muestra una diferencia significativa entre el uso de DBT (1,54 g/L) como fuente de azufre, y el empleo de DMSO (2,0 g/L) o  $\text{MgSO}_4$  (2,17 g/L). Este hecho puede ser debido a la inhibición que se produce en el crecimiento del microorganismo por HBP, el último compuesto formado en la ruta 4S.

En la Tabla 3.15 se muestran los valores de  $\mu$  y  $C_X^{\max}$  resultantes del ajuste de los datos experimentales correspondientes al estudio de la influencia de la

**concentración de DMSO** en el medio de crecimiento. El valor mínimo para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se obtiene para una concentración de DMSO de 50  $\mu\text{M}$  (experimento M-S2.1) ( $0,159 \text{ h}^{-1}$ ). Y lo mismo ocurre para el parámetro  $C_X^{max}$ , que sólo alcanza un valor de 1,10 g/L, mientras que es máximo (2,00 g/L) para una concentración de DMSO de 500  $\mu\text{M}$  (M-S2.3). Esto se ve claramente reflejado en la Figura 3.15, en la que, según el ajuste realizado, se observa una menor velocidad de crecimiento y una menor concentración de biomasa en la fase estacionaria de crecimiento cuando la concentración inicial de DMSO es 50  $\mu\text{M}$ , y sin embargo el valor máximo de  $C_X^{max}$  se obtiene para una concentración de DMSO inicial de 500  $\mu\text{M}$  en el medio de crecimiento.

En cuanto a los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar los experimentos en que se estudiaba la influencia de la **fente de carbono**, éstos se resumen en la Tabla 3.16. El valor de  $\mu$  obtenido cuando se emplea glucosa (experimento M-C1) es  $0,202 \text{ h}^{-1}$ , más alto que cuando se utiliza cualquiera de las otras dos fuentes de carbono ( $0,161 \text{ h}^{-1}$  para el ácido glutámico (M-C2) y  $0,135 \text{ h}^{-1}$  para el ácido cítrico (M-C3)), lo cual queda patente en el ajuste realizado, que se recoge en la Figura 3.16, en que se puede observar cómo el modelo predice que se alcanza antes la fase estacionaria al emplear glucosa como fuente de carbono. El valor de  $C_X^{max}$ , por otra parte, es máximo para el ácido glutámico (2,15 g/L), lo que se refleja también en la Figura 3.16, obteniendo una concentración máxima de biomasa mayor para el ácido glutámico según la predicción del modelo cinético.

La Tabla 3.17 recoge los valores de  $\mu$  y  $C_X^{max}$  obtenidos en el ajuste de los experimentos en que se estudia la influencia de la **fente de nitrógeno**, siendo la velocidad específica de crecimiento más alta ( $0,232 \text{ h}^{-1}$ ) cuando se utiliza el ácido glutámico como única fuente de nitrógeno y no se añade amonio al medio de crecimiento (M-N2). El valor de  $C_X^{max}$ , en cambio, es mayor si se añade cloruro de amonio (M-N1) al medio (2,15 g/L). De nuevo, puede observarse en la Figura 3.17 cómo el modelo predice que es mayor la velocidad específica de crecimiento pero la biomasa máxima alcanzada es menor al utilizar ácido glutámico como fuente única de nitrógeno.

En relación a la bondad de los parámetros estadísticos F de Fischer y t de Student, en todos los casos, los valores obtenidos del ajuste son mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95%. Además, se puede apreciar en las Tablas 3.14 a 3.20 cómo el valor de la suma de los residuos al cuadrado, SRC, disminuye al aumentar el valor de F, lo cual indica que la reproducción de los datos experimentales mejora y por tanto aumenta la calidad del ajuste. Si se observa el intervalo de confianza de cada uno de los parámetros cinéticos  $\mu$  y  $C_X^{max}$ , se aprecia en este caso que se relaciona con el valor del parámetro estadístico t, de forma que el intervalo de confianza es mayor cuanto menor es el valor de t, que indica así la exactitud con la que se predice el valor del parámetro cinético. Por lo tanto, se cumplen los parámetros estadísticos y el modelo cinético propuesto es válido para los medios de crecimiento utilizados en este trabajo.

**Tabla 3.14.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de crecimiento obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la fuente de azufre.

<b>Exp.</b>		<b>M-S1</b>	<b>M-S2</b>	<b>M-S3</b>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<b>Valor del Parámetro</b>	0,151± 0,012	0,223± 0,010	0,218± 0,018
	<b>t de Student</b>	26,76	54,07	20,23
$C_X^{max}$ (g/L)	<b>Valor del Parámetro</b>	1,54± 0,06	2,00± 0,05	2,17± 0,12
	<b>t de Student</b>	40,52	53,23	41,50
<b>F de Fischer</b>		53,08	100,1	43,80
<b>SRC</b>		$7,5 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$8,9 \cdot 10^{-3}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,26	2,57	2,30
	<b>F de Fischer</b>	4,07	5,41	4,07



**Tabla 3.15.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de crecimiento obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la concentración de DMSO.

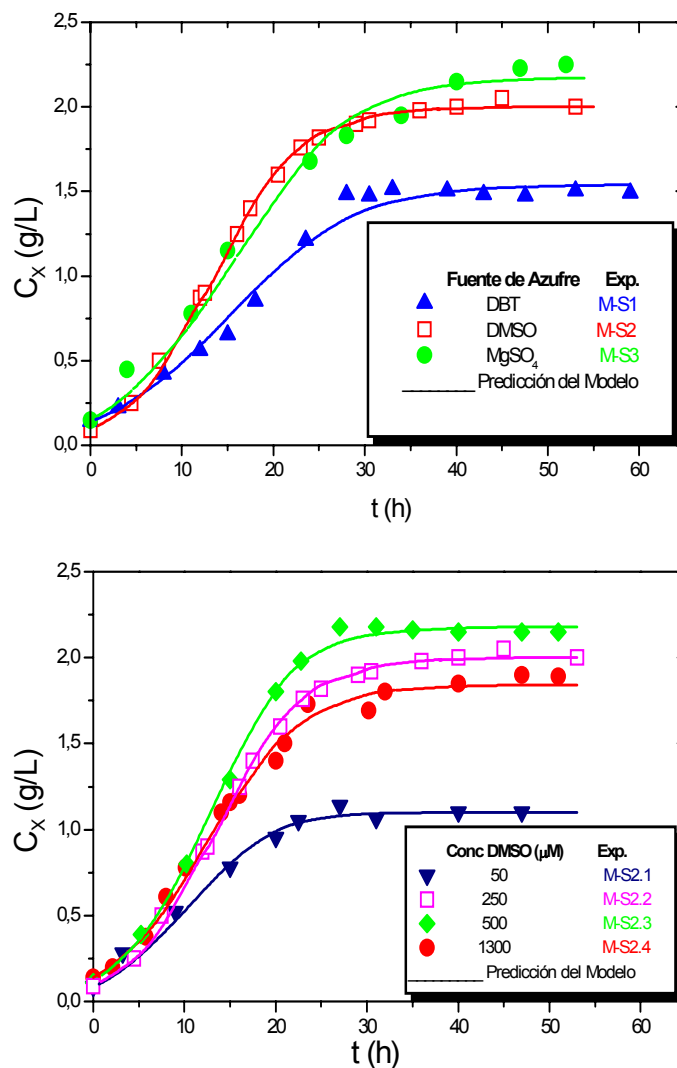
<b>Exp.</b>		<b>M-S2.1</b>	<b>M-S2.2</b>	<b>M-S2.3</b>	<b>M-S2.4</b>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<b>Valor del Parámetro</b>	0,159± 0,030	0,223± 0,010	0,230± 0,020	0,202± 0,014
	<b>t de Student</b>	17,86	54,07	25,75	31,10
$C_X^{max}$ (g/L)	<b>Valor del Parámetro</b>	1,10± 0,05	2,00± 0,05	2,18± 0,10	1,84± 0,06
	<b>t de Student</b>	63,30	53,23	64,96	102,9
<b>F de Fischer</b>		46,46	100,1	50,33	63,85
<b>SRC</b>		1,1·10 <sup>-3</sup>	5,6·10 <sup>-3</sup>	7,8·10 <sup>-3</sup>	2,3·10 <sup>-3</sup>
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,30	2,57	4,76	2,26
	<b>F de Fischer</b>	3,84	5,41	2,44	3,86

**Tabla 3.16.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de crecimiento obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la fuente de carbono.

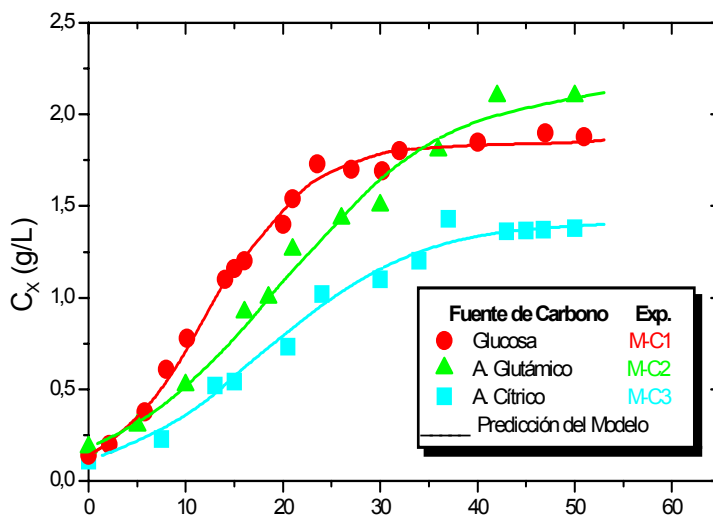
<b>Exp.</b>		<b>M-C1</b>	<b>M-C2</b>	<b>M-C3</b>
<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	0,202± 0,014	0,161± 0,012	0,135± 0,015
	<b>t de Student</b>	31,10	23,00	21,24
<b><math>C_X^{max}</math> (g/L)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	1,84± 0,06	2,15± 0,13	1,41± 0,09
	<b>t de Student</b>	102,9	105,3	41,57
<b>F de Fischer</b>		63,85	37,45	34,67
<b>SRC</b>		2,3·10 <sup>-3</sup>	4,2·10 <sup>-3</sup>	8,3·10 <sup>-3</sup>
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,26	2,57	2,44
	<b>F de Fischer</b>	3,86	5,41	4,76

**Tabla 3.17.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de crecimiento obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la fuente de nitrógeno.

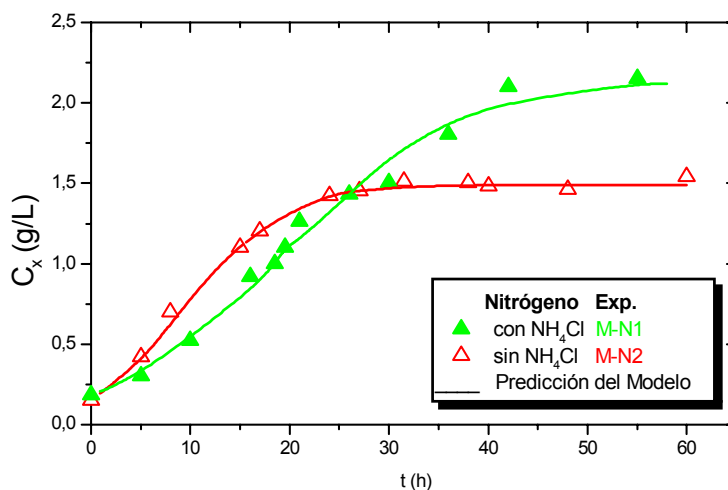
<b>Exp.</b>		<b>M-N1</b>	<b>M-N2</b>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<b>Valor del Parámetro</b>	0,161± 0,012	0,232± 0,024
	<b>t de Student</b>	23,00	22,97
$C_X^{max}$ (g/L)	<b>Valor del Parámetro</b>	2,15± 0.13	1,49± 0.05
	<b>t de Student</b>	105,3	37,37
<b>F de Fischer</b>		37,45	65,88
<b>SRC</b>		4,2.10 <sup>-3</sup>	2,4.10 <sup>-3</sup>
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,57	4,76
	<b>F de Fischer</b>	5,41	2,44



**Figura 3.15.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **fuentes de azufre** con concentraciones iniciales de 250  $\mu$ M (DMSO, DBT y MgSO<sub>4</sub>) y diferentes **concentraciones de DMSO** (1300, 500, 250 y 50  $\mu$ M), y utilizando en todos los casos NH<sub>4</sub>Cl (2g/L) como fuente de nitrógeno, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra el resultado de la aplicación del modelo cinético.



**Figura 3.16.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **fuentes de carbono** en concentración de 20g/L (glucosa, ácido cítrico y ácido glutámico) y diferentes fuentes de nitrógeno y utilizando en todos los casos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-HCl (pH 7,5), temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo cinético.



**Figura 3.17.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando ácido glutámico como única **fuentes de nitrógeno**, y ácido glutámico con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L); y utilizando en todos los casos ácido glutámico (20g/L) como fuente de carbono, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

### ***Estudio de las condiciones de operación***

Como ya se ha comentado, para realizar el estudio de las condiciones de operación durante el crecimiento del microorganismo, se han realizado experimentos a diferentes valores de pH (6,7, 5,5 y 8,1, utilizando además, en el primer caso, tampón Tris-HCl o la adición de una disolución de NaOH, para mantener el pH en un valor constante) y experimentos a diferentes temperaturas (26, 28, 30, 32 y 34°C).

Al ajustar al modelo cinético propuesto para el crecimiento los datos experimentales de concentración de biomasa de cada uno de los citados experimentos, se han obtenido los resultados recogidos en las Tablas 3.18 y 3.19 y la evolución predicha por el modelo, como se muestra en las Figuras 3.18 y 3.19. En todos los casos, se observa que la predicción de la concentración de biomasa obtenida al aplicar la ecuación logística, se ajusta bien a los datos experimentales, por lo que el modelo cinético de crecimiento propuesto describe perfectamente los resultados experimentales de concentración de biomasa en el rango de condiciones de operación utilizadas en este trabajo.

Los valores de la concentración de biomasa de cada uno de los experimentos se han ajustado a la ecuación logística, como ya se ha comentado, obteniendo así los parámetros cinéticos del modelo. La Tabla 3.18 muestra estos valores,  $\mu$  y  $C_X^{max}$ , correspondientes a los experimentos en que se estudia la influencia de la **temperatura**. En este caso se aprecia que existe un valor máximo (0,202 h<sup>-1</sup>) a 30°C y dos valores mínimos de 0,177 y 0,152 h<sup>-1</sup> en los extremos, a 26 y 36°C, respectivamente. El valor de  $C_X^{max}$ , por otra parte, disminuye cuando aumenta la temperatura, desde 2,27 g/L a 26°C hasta 0,81 g/L a 36°C.

En cuanto al ajuste de los experimentos en que se estudia la influencia del **pH** en el medio de crecimiento, no se observa una influencia significativa de éste en el parámetro cinético  $\mu$ , como se puede ver en la Tabla 3.19. Sin embargo sí existe dependencia en el valor de la concentración máxima de biomasa ( $C_X^{max}$ ): el

valor más alto (2,25 g/L) se obtiene cuando se controla el pH en un valor de 6,5 por adición automática de NaOH diluida (M-pH5), y el más bajo (1,43 g/L) corresponde al experimento en que el pH inicial es ácido, de 5,5 (M-pH4) y no se controla durante el experimento. En la Figura 3.24 se puede ver la evolución de la concentración de biomasa predicha por el modelo en los cinco experimentos realizados en las diferentes condiciones de pH, observándose la diferencia en la concentración de biomasa alcanzada en la fase estacionaria, como mostraban los valores del parámetro  $C_X^{max}$ .

Como se ha comentado anteriormente, se puede observar que ambos parámetros cinéticos,  $\mu$  y  $C_X^{max}$  son función de la temperatura, como queda reflejado en la Tabla 3.18. En el caso de la velocidad específica de crecimiento, existe un valor máximo a 30°C (M-T3), mientras que para la concentración máxima de biomasa, ésta disminuye con el aumento de temperatura. Así, esta influencia se puede describir según la ecuación de Ratkowsky (ecuación [3.11]) para el caso de la velocidad específica de crecimiento, mientras que la variación de la concentración máxima de biomasa se puede describir como una recta de pendiente negativa (ecuación [3.12]):

$$\mu(T) = \{C_1 \cdot (T - T_{min}) \cdot [1 - \exp(C_2(T - T_{max}))]\}^2 \quad [3.11]$$

$$C_{X_{max}}(T) = a - b \cdot T \quad [3.12]$$

donde  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $T_{min}$ ,  $T_{max}$ , son los parámetros de la ecuación de Ratkowsky [3.11], y  $a$ ,  $b$  son los parámetros de la ecuación lineal [3.12]. Los valores de estos parámetros, obtenidos tras realizar el ajuste de los parámetros cinéticos  $\mu$  y  $C_X^{max}$  a las ecuaciones anteriormente indicadas, se muestran en la Tabla 3.20.

La evolución de la concentración de biomasa predicha por este modelo de seis parámetros, compuesto por las ecuaciones [3.9], [3.11] y [3.12], se puede observar en la Figura 3.18. Se obtiene una reproducción de los datos muy buena,

por lo que el modelo propuesto en este trabajo es capaz de predecir la concentración de biomasa a diferentes temperaturas en un intervalo de 26 a 36°C.

En todos los casos, como se puede ver en la Tabla 3.20, los valores de los parámetros estadísticos,  $t$  de Student y  $F$  de Fischer son mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95%. Además, los intervalos de confianza de los parámetros no incluyen el cero, por lo cual se puede decir que son significantes estadísticamente para el intervalo de confianza ya citado, lo que se puede comprobar también a través del valor del parámetro estadístico  $t$ . También se puede observar que la suma de residuos al cuadrado (SRC) disminuye al aumentar el valor de  $F$ , indicando una mejor reproducción de los datos experimentales y, por tanto, una mejor calidad del ajuste.

En cuanto a los parámetros estadísticos  $F$  de Fischer y  $t$  de Student, en todos los casos los valores obtenidos del ajuste son mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95%. El intervalo de confianza de los parámetros cinéticos no incluye el cero, por lo que se puede decir que son estadísticamente significativos. Por tanto, se cumplen los criterios estadísticos, y se puede decir que el modelo es válido para las condiciones de operación estudiadas en este trabajo.



**Tabla 3.18.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de crecimiento obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la temperatura.

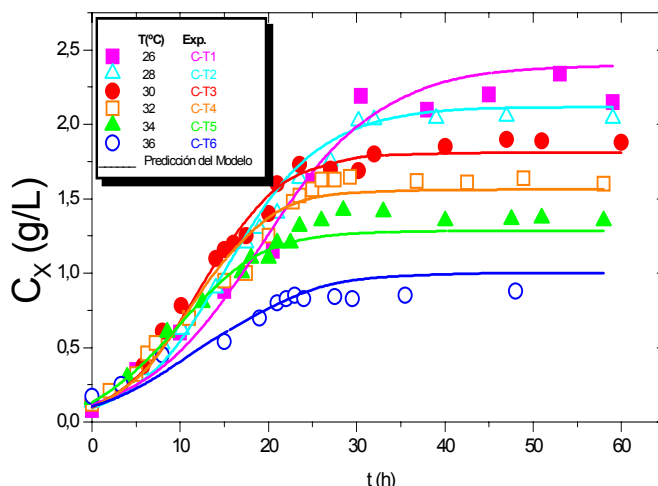
<b>Exp.</b>		<b>C-T1</b>	<b>C-T2</b>	<b>C-T3</b>	<b>C-T4</b>	<b>C-T5</b>	<b>C-T6</b>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<b>Valor del Parámetro</b>	0,177± 0,022	0,180± 0,016	0,202± 0,014	0,196± 0,017	0,168± 0,019	0,152± 0,032
	<b>t de Student</b>	17,69	27,85	31,10	25,22	23,02	11,33
$C_X^{max}$ (g/L)	<b>Valor del Parámetro</b>	2,27± 0,17	2,08± 0,10	1,84± 0,06	1,62± 0,07	1,37± 0,06	0,81± 0,06
	<b>t de Student</b>	30,63	49,23	102,9	55,63	52,45	32,57
<b>F de Fischer</b>		1610	2338	100,1	63,85	2221	1065
<b>SRC</b>		$1,16 \cdot 10^{-2}$	$1,77 \cdot 10^{-3}$	$5,6,10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$2,68 \cdot 10^{-3}$	$1,06 \cdot 10^{-4}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,26	2,23	2,26	2,12	2,23	2,45
	<b>F de Fischer</b>	4,26	4,10	3,86	3,68	4,10	5,14

**Tabla 3.19.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de crecimiento obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia del pH.

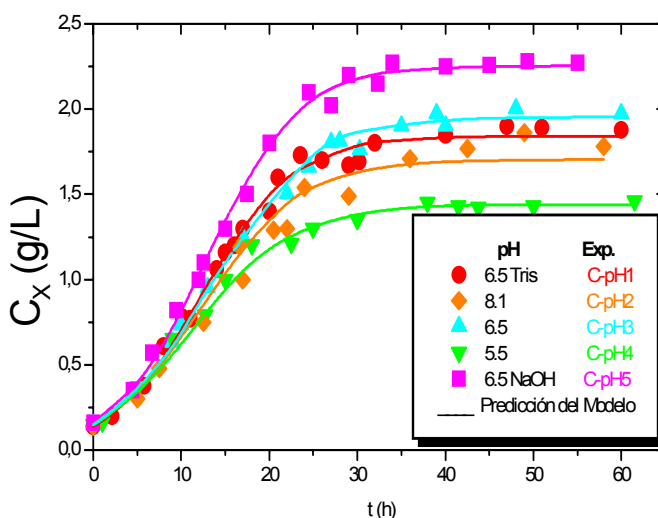
<b>Exp.</b>		<b>C-pH1</b>	<b>C-pH2</b>	<b>C-pH3</b>	<b>C-pH4</b>	<b>C-pH5</b>
<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	0,202± 0,014	0,193± 0,012	0,212± 0,010	0,180± 0,008	0,219± 0,008
	<b>t de Student</b>	31,10	30,18	40,47	49,16	51,62
<b><math>C_X^{max}</math> (g/L)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	1,84± 0,06	1,79± 0,07	1,95± 0,06	1,43± 0,03	2,25± 0,05
	<b>t de Student</b>	63,86	52,25	71,75	104,56	105,40
<b>F de Fischer</b>		3059	2379	4676	8034	8618
<b>SRC</b>		$2,81 \cdot 10^{-3}$	$3,63 \cdot 10^{-2}$	$2,32 \cdot 10^{-3}$	$8,86 \cdot 10^{-4}$	$2,29 \cdot 10^{-3}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,20	2,23	2,23	2,18	2,16
	<b>F de Fischer</b>	3,98	4,10	4,10	3,88	3,80

**Tabla 3.20.** Parámetros obtenidos del ajuste de los parámetros cinéticos ( $\mu$  y  $C_X^{max}$ ) correspondientes a los experimentos C-T1 a C-T6, a las ecuaciones [3.11] y [3.12].

Parámetro		Valor	t de Student
$C_1$		$0,058 \pm 0,021$	5,53
$T_{min}$		$16,61 \pm 5,08$	20,1
$C_2$		$0,082 \pm 0,065$	2,24
$T_{max}$		$41,63 \pm 3,11$	26,7
$a$		$6,01 \pm 0,04$	300
$b$		$0,14 \pm 0,01$	14,0
F de Fischer		3672	
SRC		$1,03 \cdot 10^{-2}$	
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	2,00	
	F de Fischer	2,25	



**Figura 3.18.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **temperaturas** (26, 28, 30, 32, 34 y 36°C) empleando en todos los casos glucosa (20g/L) como fuente de carbono,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-Hcl para mantener el pH en un valor de 6,5 y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

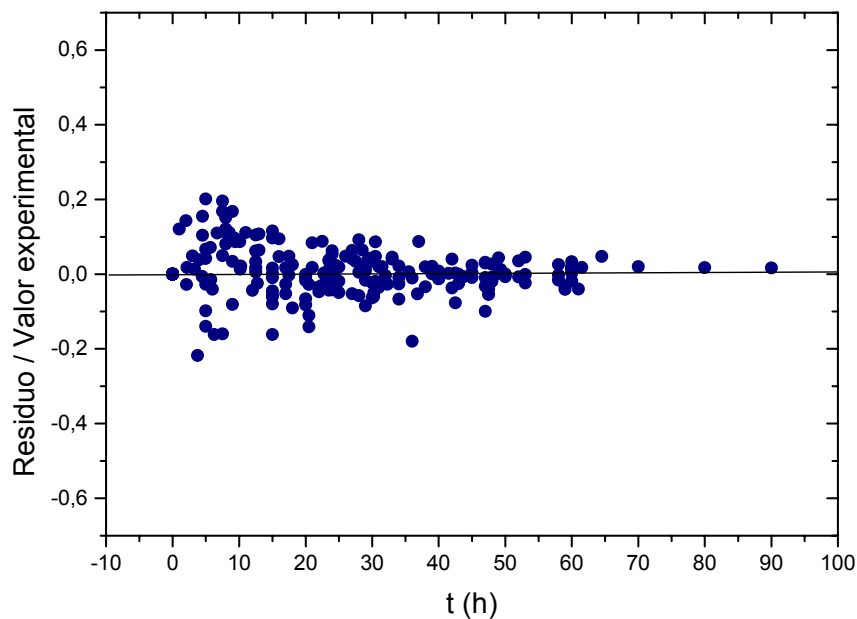


**Figura 3.19.** Evolución de la concentración de biomasa durante el crecimiento en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **condiciones de pH** (6,7 sin tamponar, con tampón Tris-HCl y controlando con NaOH diluida, 5,5 sin tamponar, y 8,1 sin tamponar) empleando en todos los casos glucosa (20g/L) como fuente de carbono,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

### 3.4.1.3. Análisis de los Residuos

Con el objeto de comprobar que los valores de los datos experimentales no comprenden un error sistemático, se ha realizado un análisis de los residuos, representando en la Figura 3.20 el valor del residuo respecto al valor experimental, para normalizar los diferentes experimentos, frente al tiempo de crecimiento.

En dicha Figura se observa que la distribución de los residuos a lo largo del tiempo es completamente al azar, presentando valores por encima y por debajo del cero sin ninguna tendencia apreciable, por lo que se puede concluir que los datos experimentales obtenidos no presentan ningún error sistemático relacionado con la medida, y por tanto son valores fiables.



**Figura 3.20.** Representación gráfica del residuo obtenido al ajustar al modelo cinético propuesto para el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

### **3.4.2. Modelo Cinético de Desarrollo de la Capacidad Desulfurante**

En este trabajo se ha descrito matemáticamente la evolución de la capacidad desulfurante del microorganismo a lo largo del crecimiento, para llegar a desarrollar un modelo cinético de crecimiento junto con la evolución de la concentración de biomasa, descrita en el punto anterior.

La capacidad desulfurante se ha considerado como un “producto” parcialmente asociado al crecimiento, aunque no excretado al medio. Así, dicha capacidad desulfurante, comienza a desarrollarse una vez que el microorganismo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, alcanzando su valor máximo al final de esa fase o al principio de la fase estacionaria, y disminuyendo a partir de ese valor.

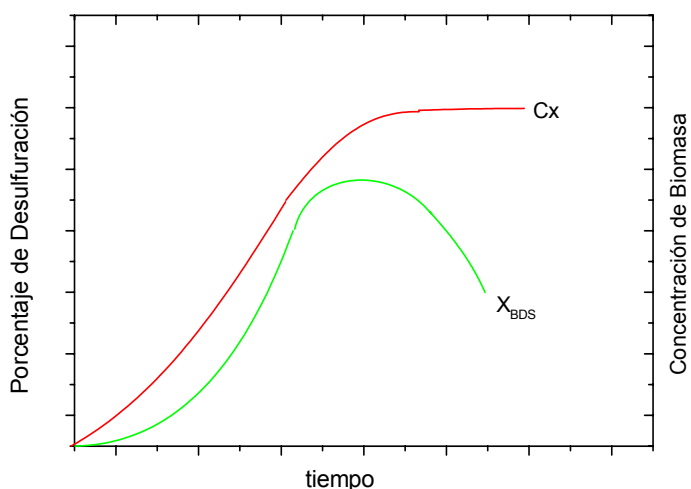
En este caso, la capacidad desulfurante de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 varía dependiendo de las condiciones en que haya sido obtenido dicho microorganismo y varía además a lo largo de la curva de crecimiento, alcanzando un máximo casi siempre en torno a las 25 h, y disminuyendo en mayor o menor medida después de alcanzar esa capacidad desulfurante máxima. Por lo tanto, se puede describir la evolución de esta capacidad desulfurante para los diferentes experimentos realizados en el estudio de la influencia de la composición del medio de crecimiento y de las condiciones de operación en que se lleva a cabo el crecimiento. Así, se ha formulado un modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante y se han ajustado los datos experimentales a dicho modelo, obteniendo unos parámetros y unos valores de capacidad desulfurante, que se comparan con los valores experimentales. Además, se han obtenido del ajuste unos parámetros estadísticos que dan una idea de la validez del modelo que se ha propuesto.

### 3.4.2.1. Formulación del Modelo

Como ya se ha comentado, para describir la capacidad desulfurante de *R. erythropolis* IGTS8 durante el crecimiento, se ha considerado el porcentaje de desulfuración,  $X_{BDS}$ , (calculado como la concentración de HBP, último compuesto de la ruta 4S, formado en el ensayo de *resting cells* respecto a la concentración inicial de DBT) como un producto asociado al crecimiento. Este porcentaje de desulfuración presenta un aumento durante la fase exponencial del crecimiento, para luego disminuir al final de dicha fase o al principio de la fase estacionaria, como muestra la Figura 3.21. Este tipo de evolución se puede describir mediante una modificación de la ecuación de Luedeking-Piret, de forma que en este caso, se propone que la ecuación que describe la variación de  $X_{BDS}$  con el tiempo es la siguiente:

$$\frac{dX_{BDS}}{dt} = \alpha \cdot \frac{dC_X}{dt} - \beta \cdot C_X \quad [3.13]$$

donde  $\alpha$  y  $\beta$  son, en este caso, los parámetros del modelo, y están relacionados con la velocidad a la que aumenta al principio la capacidad desulfurante, y se va perdiendo después cuando se alcanza el final de la fase exponencial de crecimiento. Estos parámetros son característicos del microorganismo y de las condiciones que hayan sido utilizadas para llevar a cabo su crecimiento.



**Figura 3.21.** Evolución típica del porcentaje de desulfuración con respecto a la concentración de biomasa para *R. erythropolis* IGTS8.

### **3.4.2.2. Ajuste de los datos experimentales**

Los datos experimentales de  $X_{BDS}$  obtenidos en los diferentes experimentos del estudio del medio de crecimiento y las condiciones de operación se han ajustado a la ecuación [3.13], utilizando el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden para integrar la ecuación, con las siguientes condiciones de contorno:  $X_{BDS} = 0$  para  $t = 12,5$  h. Este algoritmo se ha acoplado al algoritmo de Marquardt, siendo necesario emplear para cada experimento la predicción teórica de la evolución de la biomasa obtenida previamente, llevando a cabo un ajuste en simple respuesta no lineal, y se han obtenido los parámetros estadísticos  $t$  de Student,  $F$  de Fischer y la suma de residuos al cuadrado ( $SRC$ ). Para determinar la bondad del ajuste, al igual que para el modelo de crecimiento, se han empleado los test estadísticos de Student y de Fisher, como ya se ha comentado, para un intervalo de confianza del 95%.

Las Figuras 3.22 a 3.27 recogen los datos experimentales de  $X_{BDS}$  obtenidos tras los ensayos de *resting cells*, y se muestran además, mediante líneas continuas, los valores predichos por el modelo. También se pueden ver en estas Figuras los valores del grado de desulfuración,  $D_{BDS}$ , obtenido experimentalmente en cada uno de los experimentos, junto con los valores predichos por el modelo, representados mediante una línea continua.

Los valores de los parámetros del modelo cinético ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que se han obtenido al realizar el ajuste de los datos experimentales a la ecuación [3.13] se resumen en las Tablas 3.21 a 3.28, donde se incluyen también los parámetros estadísticos obtenidos del ajuste, y los valores tabulados para un intervalo de confianza del 95%.

A continuación se comentan los resultados obtenidos para cada uno de los experimentos obtenidos del estudio de la influencia de la composición del medio de crecimiento y de las condiciones de operación en el desarrollo de la capacidad desulfurante.



### ***Estudio del medio crecimiento***

En las Figuras 3.22 a 3.25, se observan los resultados obtenidos del ajuste al modelo de los experimentos realizados en el estudio de las distintas fuentes de azufre, carbono y amonio en medio de crecimiento. En dicha figura se representan los valores del porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) y del grado de desulfuración ( $D_{BDS}$ ), tanto los experimentales como los calculados por el modelo. En todos los casos, la predicción de la variación del porcentaje de desulfuración frente al tiempo que predice el modelo propuesto, y la variación del grado de biodesulfuración a lo largo de todos los experimentos, es muy cercana a la de los datos experimentales. Por lo tanto, se puede decir que el modelo cinético de desarrollo de la capacidad desulfurante propuesto en este trabajo, es capaz de reproducir la variación de la capacidad desulfurante de *R. erythropolis* IGTS8 durante se crecimiento en las condiciones estudiadas en este apartado.

En la Tabla 3.21 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos de la regresión para los experimentos con distintas **fuentes de azufre**. Cuando se utiliza DBT como fuente de azufre, se obtiene un valor de  $\alpha$  menor que en el caso de usar DMSO (M-S2), es decir, el desarrollo de la capacidad desulfurante durante el crecimiento del microorganismo es más rápido cuando se utiliza DMSO como fuente de azufre. Además, si se observa la Figura 3.23 y la Tabla 3.22, se puede comprobar que cuanto mayor es la **concentración de DMSO** en el medio de crecimiento, mayor es el valor del parámetro  $\alpha$ . Así, la capacidad desulfurante del microorganismo se desarrolla más rápidamente para una concentración inicial de DMSO de 1,3 mM (M-S2.1). Por otro lado,  $\beta$  es también mayor cuando se utiliza DMSO que cuando se añade DBT (M-S1) como fuente de azufre, y presenta un valor máximo para una concentración inicial de DMSO de 1,3 mM. Esto implica que la capacidad desulfurante cae más rápidamente durante el crecimiento cuanto mayor es la concentración inicial de DMSO, es decir, cuando ésta es 1,3 mM. Hay que añadir que en el caso de utilizar  $MgSO_4$  (M-S3) como fuente de azufre en el crecimiento, la capacidad desulfurante desarrollada por el microorganismo es nula y por lo tanto no se ha podido realizar ningún ajuste de los datos experimentales y no existen datos de los parámetros del modelo  $\alpha$  y  $\beta$ .

En la Tabla 3.23 se presentan los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  resultantes del ajuste de los datos experimentales de las distintas **fuentes de carbono** utilizadas para llevar a cabo el crecimiento del microorganismo. El valor más alto de  $\alpha$  se obtiene con glucosa (M-C1), y la tendencia a disminuir la capacidad desulfurante durante la fase estacionaria de crecimiento (indicada por el parámetro  $\beta$ ) es un poco mayor también cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono. El valor mínimo de  $\alpha$  y de  $\beta$  se presentan al utilizar ácido cítrico (M-C3). Esto se ve reflejado en la Figura 3.24, en la que se observa que la capacidad desulfurante se desarrolla más rápidamente, y también cae más rápido cuando se utiliza glucosa, mientras que es más lento en el caso de usar ácido cítrico como fuente de carbono.

Cuando se emplea ácido glutámico como fuente de carbono, la presencia de cloruro de **amonio** en el medio influye claramente en el desarrollo de la capacidad desulfurante, como se puede extraer de la Figura 3.25, y de la Tabla 3.24, de forma que el valor del parámetro  $\alpha$  es tres veces mayor cuando se añade cloruro de amonio al medio (M-N1) y además la pérdida de capacidad desulfurante es más rápida en este caso (lo cual viene indicado por un valor de  $\beta$  más alto en este caso).

En cuanto a la bondad de los parámetros estadísticos F de Fischer y t de Student, dados en las Tablas 3.21 a 3.24, en todos los casos los valores que se obtienen del ajuste son mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95%. De esta forma, se puede decir que la calidad del ajuste es buena y que los valores de los parámetros obtenidos del ajuste,  $\alpha$  y  $\beta$ , son, con una confianza del 95%, los que se encuentran entre el intervalo de confianza indicado, que no incluye el cero, por lo que son estadísticamente significativos.

**Tabla 3.21.** Parámetros cinéticos del modelo cinético de desarrollo de la capacidad desulfurante obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la fuente de azufre en el medio de crecimiento.

<b>Exp.</b>		<b>M-S1</b>	<b>M-S2</b>	<b>M-S3</b>
<b><math>\alpha</math> (%D·L/g)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	9,88± 2,54	13,24± 3,58	-
	<b>t de Student</b>	9,99	8,74	-
<b><math>\beta</math> (%D·L/g·h)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	0,078± 0,065	0,267± 0,161	-
	<b>t de Student</b>	3,11	3,92	-
<b>F de Fischer</b>		158,8	144,9	-
<b>SRC</b>		0,55	1,57	-
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,78	2,31	-
	<b>F de Fischer</b>	6,94	4,46	-

**Tabla 3.22.** Parámetros cinéticos del modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la concentración de DMSO.

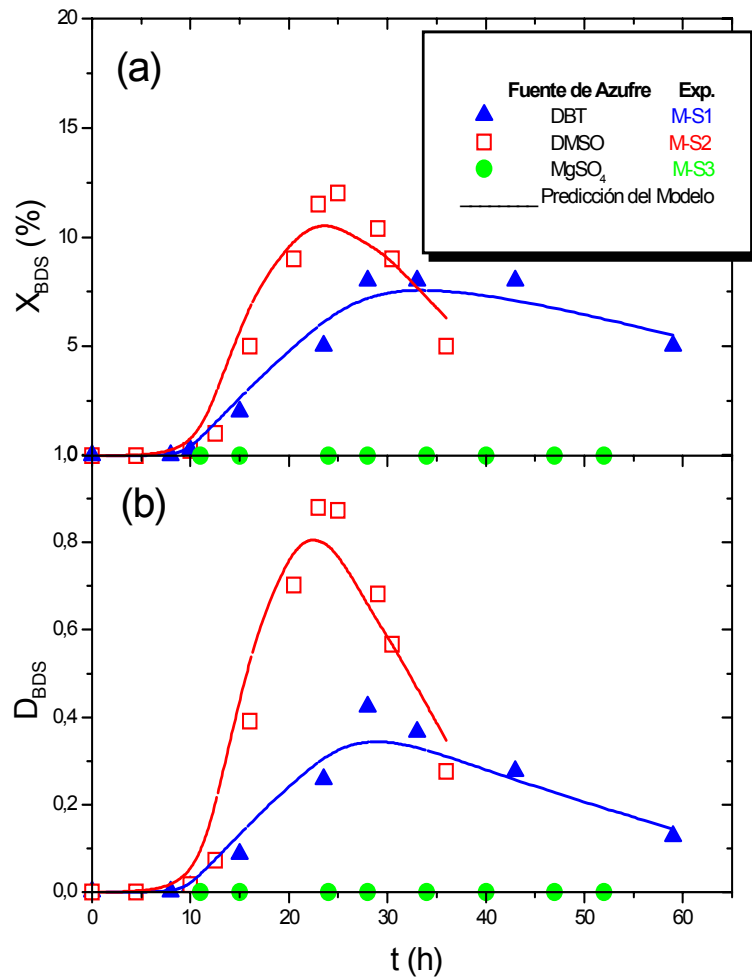
<b>Exp.</b>		<b>M-S2.1</b>	<b>M-S2.2</b>	<b>M-S2.3</b>	<b>M-S2.4</b>
<b><math>\alpha</math> (%D·L/g)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	-	13,24± 3,58	26,27± 5,82	127,79± 18,61
	<b>t de Student</b>	-	8,74	11,06	12,83
<b><math>\beta</math> (%D·L/g·h)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	-	0,267± 0.161	0,347± 0,186	2,71± 0,82
	<b>t de Student</b>	-	3,92	4,58	9,12
<b>F de Fischer</b>		-	144.9	147,0	477,7
<b>SRC</b>		-	1,57	7,37	16,64
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	-	2.31	2,23	2,23
	<b>F de Fischer</b>	-	4,46	4,10	4,10

**Tabla 3.23.** Parámetros cinéticos del modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la fuente de carbono.

<b>Exp.</b>		<b>M-C1</b>	<b>M-C2</b>	<b>M-C3</b>
<b><math>\alpha</math> (%D·L/g)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	127,79± 18,61	113,10± 31,30	66,17± 36,63
	<b>t de Student</b>	12,83	10,02	4,17
<b><math>\beta</math> (%D·L/g·h)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	2,71± 0,82	2.63± 1,21	0,46± 0,37
	<b>t de Student</b>	9,12	5,68	2,84
<b>F de Fischer</b>		477,7	189,9	83,67
<b>SRC</b>		16,64	28,77	64,23
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,23	2.45	2,36
	<b>F de Fischer</b>	4,10	5,14	4,74

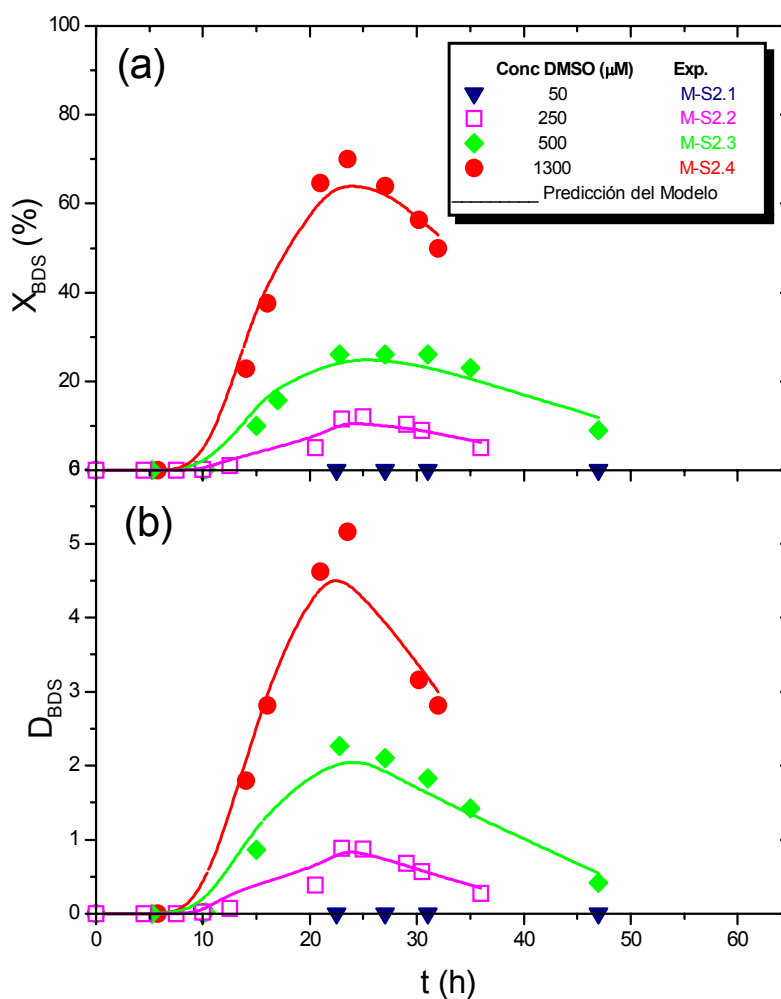
**Tabla 3.24.** Parámetros cinéticos del modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la fuente de nitrógeno.

<b>Exp.</b>		<b>M-N1</b>	<b>M-N2</b>
<b><math>\alpha</math> (%D·L/g)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	113,10± 31,30	37,2± 20,5
	<b>t de Student</b>	10,02	5,05
<b><math>\beta</math> (%D·L/g·h)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	2.63± 1,21	0,482± 0,312
	<b>t de Student</b>	5,68	3,18
<b>F de Fischer</b>		37,45	189,9
<b>SRC</b>		4,2·10 <sup>-3</sup>	28,77
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,45	2,78
	<b>F de Fischer</b>	5,14	6,94



**Figura 3.22.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **fuentes de azufre** con concentraciones iniciales de 250  $\mu$ M (DMSO, DBT y  $MgSO_4$ ); y utilizando en todos los casos  $NH_4Cl$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra el resultado de la aplicación del modelo.

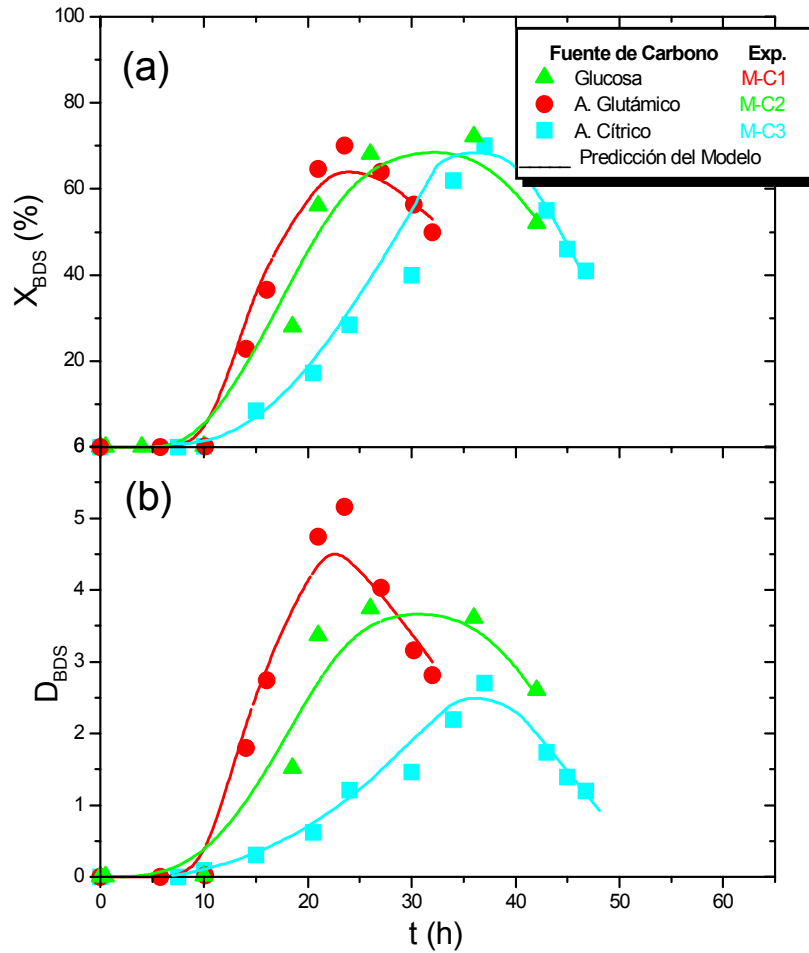
- a) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- b) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.



**Figura 3.23.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **concentraciones de DMSO** (1300, 500, 250 y 50  $\mu\text{M}$ ); y utilizando en todos los casos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, glucosa (20g/L) como fuente de carbono, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra el resultado de aplicar el modelo.

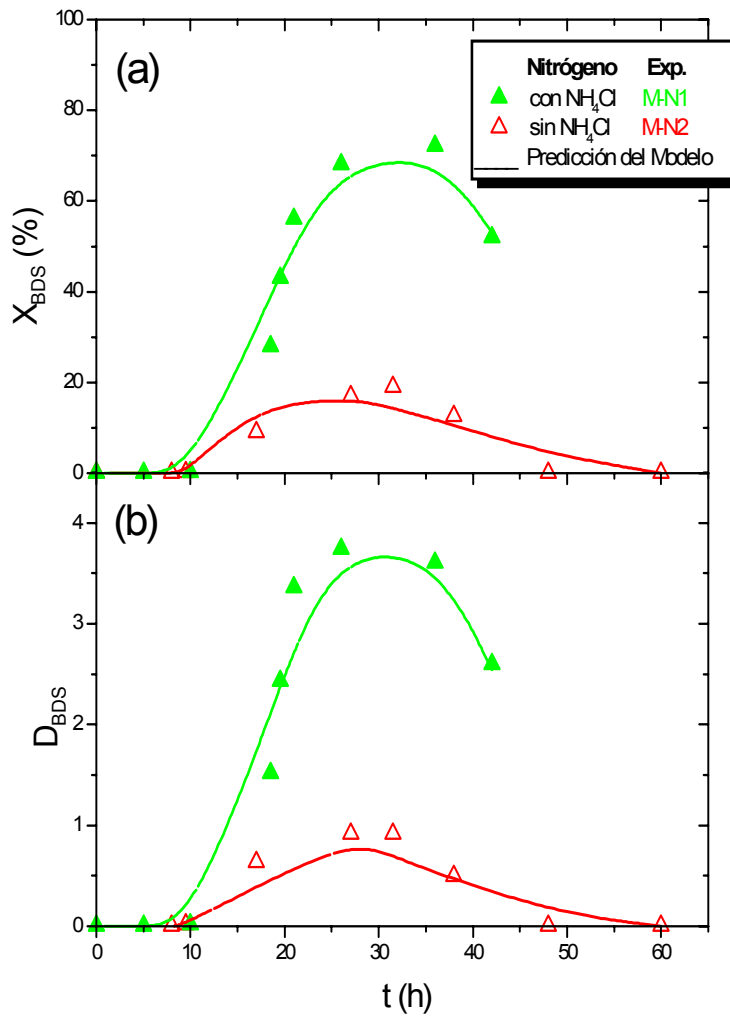
- a) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- b) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.





**Figura 3.24.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **fuentes de carbono** en concentración de 20g/L (glucosa, ácido cítrico y ácido glutámico); y utilizando en todos los casos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-HCl (pH 7,5), temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

- a) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- b) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.



**Figura 3.25.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando ácido glutámico como única fuente de nitrógeno, y ácido glutámico con  $NH_4Cl$  (2g/L); y utilizando en todos los casos ácido glutámico (20g/L) como fuente de carbono, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, tampón Tris-HCl (pH 7,5), una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

- a) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento
- b) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.

### ***Estudio de las condiciones de operación***

Las Figuras 3.26 y 3.27 muestran los valores de porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) y grado de desulfuración ( $D_{BDS}$ ) predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos en que se estudia la influencia de la temperatura y del pH. En ambos casos se obtienen evoluciones muy cercanas a las experimentales, por lo que el modelo propuesto es capaz de predecir dichos valores de porcentaje de desulfuración y grado de desulfuración en el rango de condiciones de operación estudiado. Los valores representados en las Figuras 3.26 y 3.27 de grado de desulfuración, están calculados según la ecuación [3.2], tanto los experimentales como los predichos por el modelo. En el primer caso se calculan a partir de los datos de  $X_{BDS}$  experimentales y en el segundo caso, se obtienen de los datos de  $X_{BDS}$  calculados por el modelo.

La Tabla 3.25 muestra los valores de los parámetros del modelo,  $\alpha$  y  $\beta$  obtenidos del ajuste de los datos experimentales a diferentes **temperaturas** durante el crecimiento. A partir de estos valores, se puede deducir que cuando se incrementa la temperatura de 26 (M-T1) a 36°C (M-T6), existe un valor máximo de  $\alpha$  a 30°C (M-T3). También el valor de  $\beta$  presenta su valor máximo entre 28 y 30°C, siendo cero a 26°C, ya que no se ha alcanzado la máxima capacidad desulfurante durante ese tiempo de crecimiento. Esto se refleja en la Figura 3.26, donde la capacidad desulfurante se desarrolla más rápidamente a 30°C y disminuye también más rápido entre 28 y 30°C.

Al variar las **condiciones de pH** empleadas durante el crecimiento del microorganismo, los valores más altos de  $\alpha$ , que se pueden ver en la Tabla 3.26, se obtienen cuando el pH se controla mediante la adición automática de NaOH diluida (M-pH5) o mediante el uso de tampón Tris (M-pH1), mientras que el valor más bajo se alcanza para un pH inicial ácido de 5,5 (M-pH4). Esto implica que la capacidad desulfurante se desarrolla más rápidamente al controlar el pH en un valor aproximadamente neutro durante el crecimiento, mientras que valores de pH más ácidos hacen que lo haga más lentamente (como se comprueba en la Figura

3.27). Además, para este último experimento, se obtiene un valor de  $\beta$  nulo ya que, al igual que en el caso de trabajar a 26°C (M-T1), durante el tiempo de crecimiento correspondiente al experimento, no se alcanzó la capacidad desulfurante máxima, como se observa en la Figura 3.27. En cuanto al resto de condiciones, este parámetro presenta su valor máximo cuando se controla el pH en un valor de 6,5 mediante la adición de tampón Tris al medio (M-pH1).

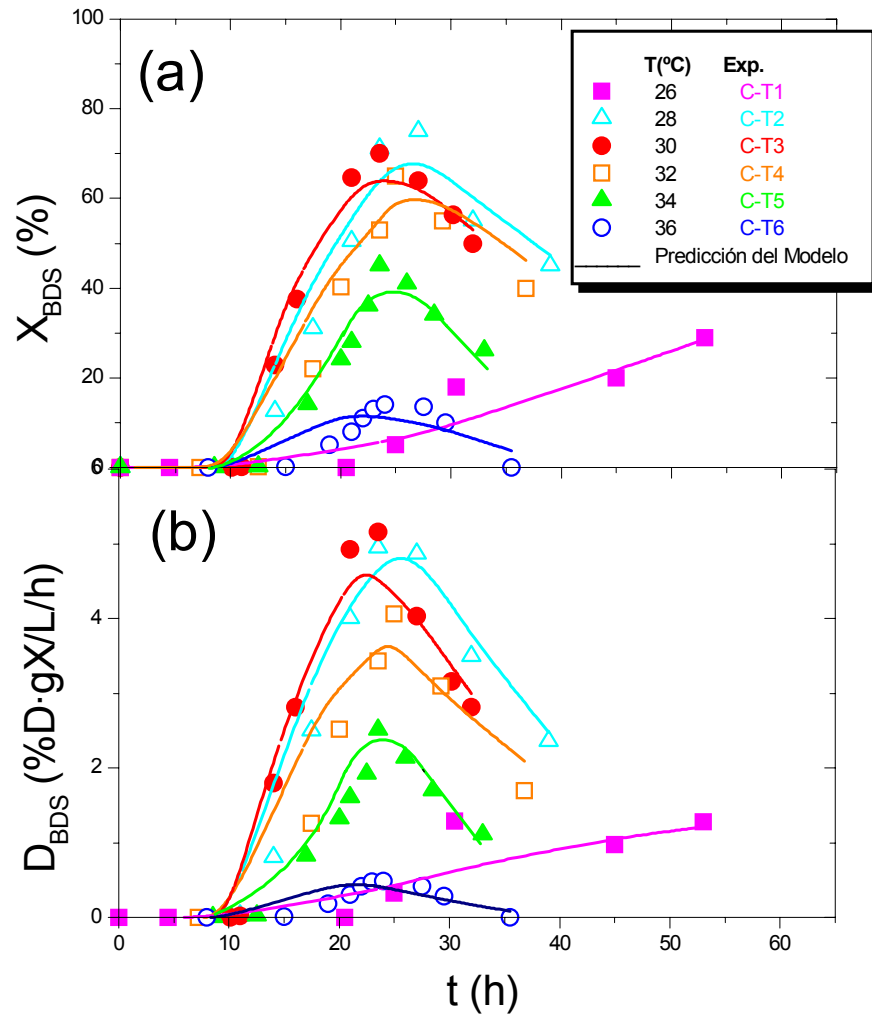
En relación a los parámetros estadísticos F de Fischer y t de Student, dados en las Tablas 3.25 y 3.26, en todos los casos se cumplen los criterios estadísticos, es decir, los valores que se obtienen del ajuste son mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95% y por tanto el modelo es válido para predecir los valores experimentales obtenidos en las condiciones de operación estudiadas.

**Tabla 3.25.** Parámetros cinéticos del modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia de la temperatura.

<b>Exp.</b>		<b>C-T1</b>	<b>C-T2</b>	<b>C-T3</b>	<b>C-T4</b>	<b>C-T5</b>	<b>C-T6</b>
<b><math>\alpha</math></b> <b>(%D·L/g)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	18,85± 23,43	105,29± 23,97	127,79± 18,61	95,57± 38,03	65,46± 36,54	36,37± 27,13
	<b>t de Student</b>	5,31	8,85	12,83	5,11	4,24	4,33
<b><math>\beta</math></b> <b>(%D·L/g·h)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	0	2,17± 1,00	2,17± 0,82	0,61± 0,41	0,68± 0,42	0,29± 0,15
	<b>t de Student</b>	-	6,89	9,12	4,12	3,35	3,65
<b>F de Fischer</b>		58,31	92310	477,7	70,65	75,31	30,03
<b>SRC</b>		8,01·10 <sup>2</sup>	1,14·10 <sup>2</sup>	1,77·10 <sup>2</sup>	6,86·10 <sup>2</sup>	4,25·10 <sup>2</sup>	2,14·10 <sup>2</sup>
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,78	2,45	2,45	2,57	2,36	2,36
	<b>F de Fischer</b>	6,94	5,14	5,14	5,79	4,74	4,74

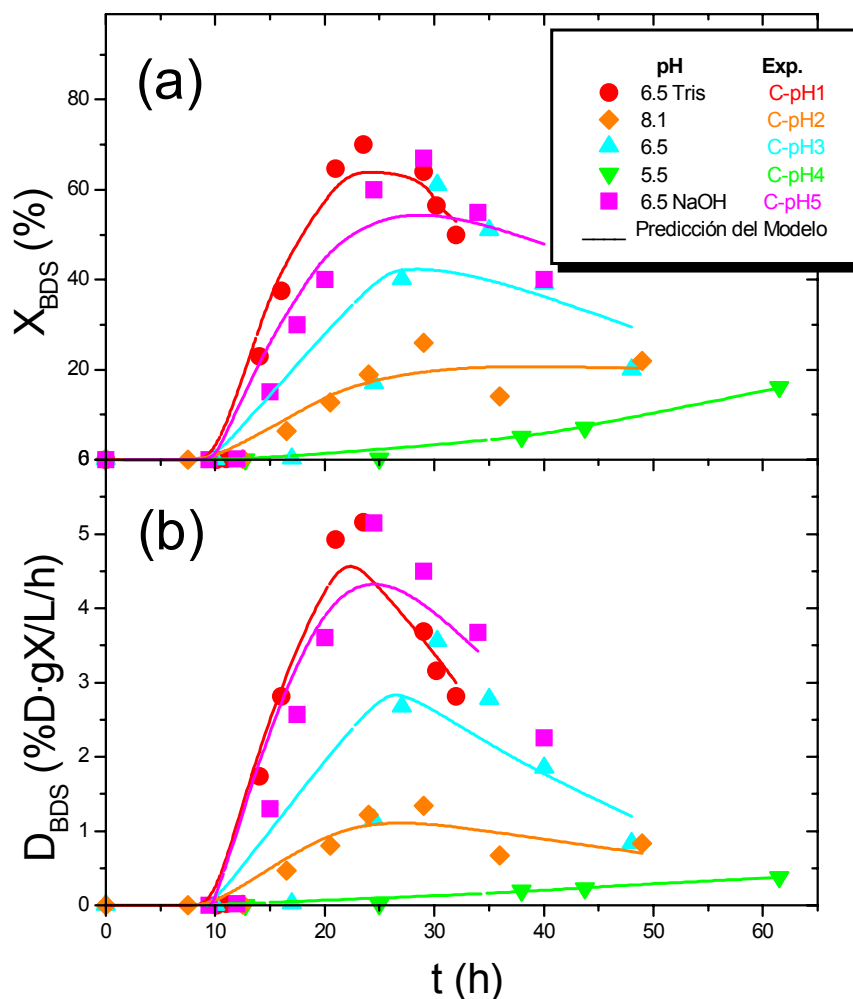
**Tabla 3.26.** Parámetros cinéticos del modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante obtenidos para los experimentos en que se estudia la influencia del pH.

Exp.		C-pH1	C-pH2	C-pH3	C-pH4	C-pH5
$\alpha$ (%D·L /g)	Valor del Parámetro	127,79± 18,61	31,34± 22,90	61,89± 44,71	10,58± 3,72	83,37± 20,42
	t de Student	12,83	4,27	3,98	4,22	6,39
$\beta$ (%D·L /g·h)	Valor del Parámetro	2,17± 0,82	0,06± 0,02	0,45± 0,22	0	0,44± 0,21
	t de Student	9,12	3,97	4,04	-	5,64
F de Fischer		477,7	47,32	65,71	54,37	98,47
SRC		1,7·10 <sup>2</sup>	1,3·10 <sup>2</sup>	1,9·10 <sup>2</sup>	0,8·10 <sup>2</sup>	3,7·10 <sup>2</sup>
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	2,45	2,57	2,57	3,18	2,57
	F de Fischer	5,14	5,14	5,14	9,55	5,79



**Figura 3.26.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **condiciones de pH** (6,7 sin tamponar, con tampón Tris-HCl y controlando con NaOH diluida, 5,5 sin tamponar, y 8,1 sin tamponar) empleando en todos los casos glucosa (20g/L) como fuente de carbono,  $NH_4Cl$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

- a) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- b) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.



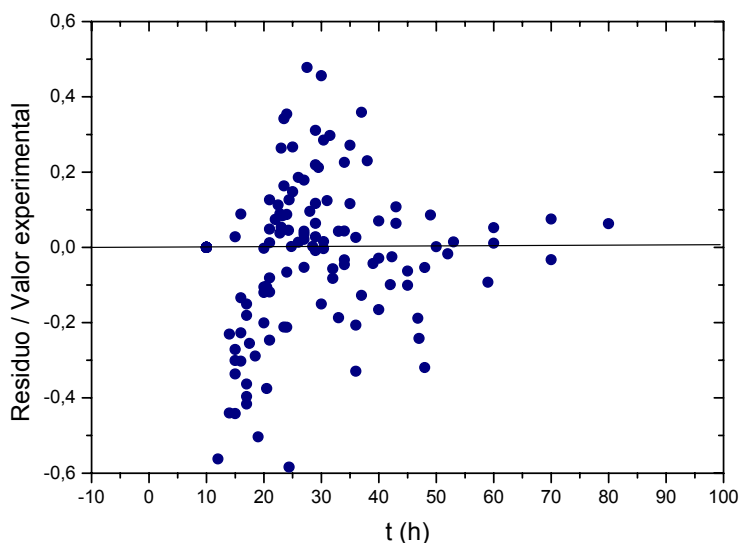
**Figura 3.27.** Resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio BSM con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 empleando diferentes **condiciones de pH** (6,7 sin tamponar, con tampón Tris-HCl y controlando con NaOH diluida, 5,5 sin tamponar, y 8,1 sin tamponar) empleando en todos los casos glucosa (20g/L) como fuente de carbono,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2g/L) como fuente de nitrógeno, DMSO (1,3 mM) como fuente de azufre, una temperatura de 30°C y saturando inicialmente al 100% de oxígeno disuelto. La línea continua muestra la predicción del modelo.

- a) Evolución del porcentaje de desulfuración durante el crecimiento.
- b) Evolución del grado de biodesulfuración durante el crecimiento.



### 3.4.2.3. Análisis de los Residuos

Se ha llevado a cabo un análisis de los residuos obtenidos en el ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto. En la Figura 3.28 se puede ver representado el valor del residuo respecto a su valor experimental frente al tiempo de crecimiento para todos los experimentos realizados. Se observa en esta Figura que la distribución de los residuos a lo largo del tiempo de crecimiento es al azar, no existiendo ninguna tendencia en los valores, sino que se distribuyen al azar por encima y por debajo del cero. Esto indica que no existe ningún error sistemático asociado a la medida con la que se han obtenido los datos experimentales, y por lo tanto son valores fiables.



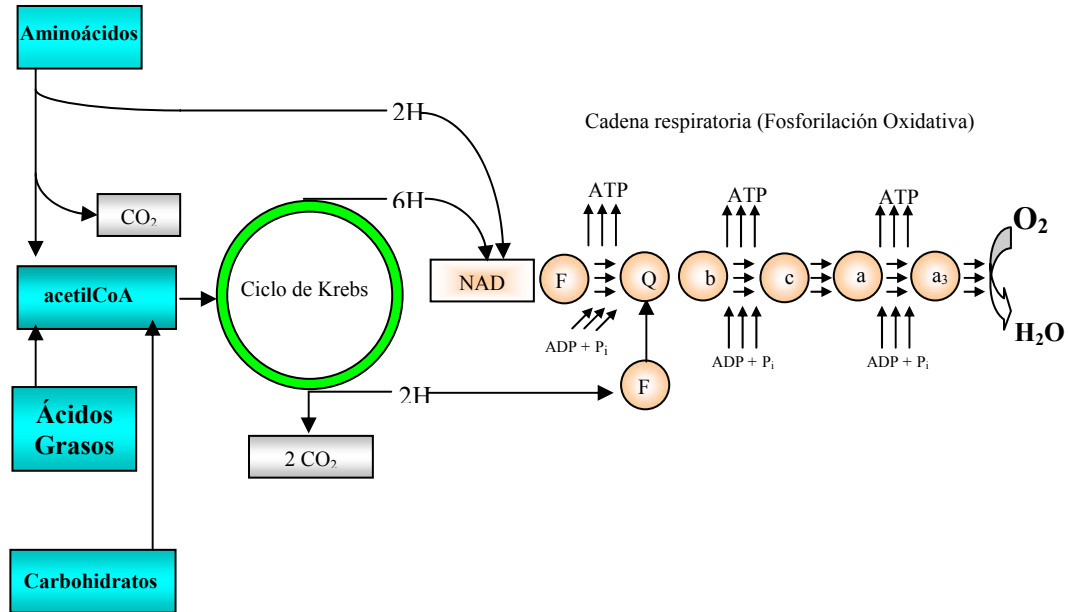
**Figura 3.28.** Representación gráfica frente al tiempo del valor del residuo obtenido del ajuste al modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante de los diferentes experimentos realizados para estudiar la influencia del medio de crecimiento y de las condiciones de operación durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

### **3.5. ESTUDIO del CONSUMO y del TRANSPORTE de OXÍGENO**

En los procesos en que se utilizan organismos aerobios, como en el caso de este trabajo, en que se emplea una bacteria aerobia como biocatalizador para llevar a cabo la biodesulfuración de DBT, la disponibilidad de oxígeno afecta de forma muy importante a los productos metabólicos y a la velocidad a la que se producen éstos dentro del microorganismo; los factores que más afectan son las condiciones fluidodinámicas establecidas por la aireación y la agitación, y la escala de operación, que afecta a las condiciones hidrodinámicas.

La Figura 3.29 resume las reacciones bioquímicas que se dan, en general, dentro de la célula. Se debe hacer especial énfasis en la respiración celular, y que proporciona energía para la oxidación de grasas y azúcares, con la consecuente formación de dióxido de carbono. Esta energía es necesaria para la síntesis de proteínas, enzimas, etc., capacitando al microorganismo para llevar a cabo el crecimiento y el mantenimiento celular, siendo el oxígeno el aceptor último de electrones de la cadena respiratoria. Por esta razón, el oxígeno disuelto en el medio tiene tanta importancia en los procesos que tienen lugar con microorganismos aerobios.

El estudio del consumo y el transporte de oxígeno en el proceso de biodesulfuración es de trascendencia, debido a que se lleva a cabo con una bacteria estrictamente aerobia, *Rhodococcus erythropolis*, que requiere del oxígeno para crecer y mantenerse, y para realizar la ruta de desulfuración. En este tipo de procesos aerobios, para efectuar cambios de escala, uno de los criterios más utilizados es el de mantener valores similares de concentración de oxígeno disuelto en las diversas escalas, de forma que la determinación de la velocidad de consumo (habitualmente conocida como *Oxygen Uptake Rate*, *OUR*), y de la velocidad de transferencia de materia (a través del coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_L a$ ), es de gran interés.



**Figura 3.29.** Ruta de oxidación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. El símbolo F designa NADH y succinato deshidrogenasa. Q es la Coenzima A, y *b*, *c*, *a* y *a*<sub>3</sub> designan los citocromos.

Por otra parte, el modelo cinético que describe el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 debe incluir la influencia del oxígeno disuelto, si es que afecta al mismo. Para ello, hay que incluir la descripción de la variación de la concentración de oxígeno en el conjunto de ecuaciones diferenciales que forman el modelo, y esto requiere conocer el transporte de oxígeno en el medio y el consumo de oxígeno del microorganismo en dicho medio.

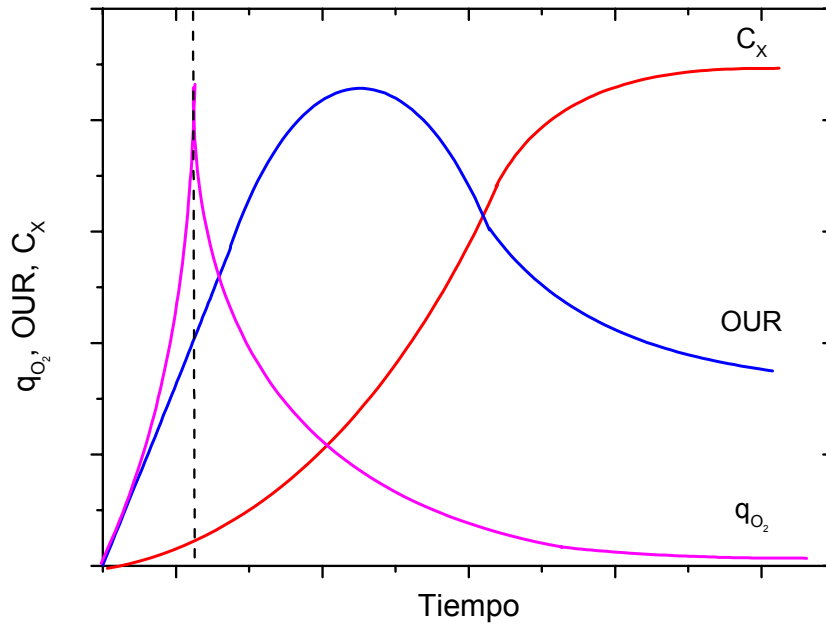
En este apartado se realiza el estudio del consumo de oxígeno del microorganismo y del transporte de oxígeno del aire al medio, obteniendo los parámetros relacionados con dicho transporte (coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_La$ ) y consumo de oxígeno (velocidad de consumo de oxígeno,  $OUR$ ). Para ello, se han realizado cinco experimentos en biorreactor en los que se ha llevado a cabo el crecimiento del microorganismo utilizando diferentes velocidades de agitación (150, 250, 400, 550 y 700 rpm), de forma que se pueda estudiar la influencia de las distintas condiciones de transporte de oxígeno en el crecimiento del microorganismo.

Finalmente, se ha determinado la expresión que proporciona la evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el crecimiento del microorganismo, y se han calculado los parámetros de tal expresión mediante una regresión no lineal ajustando los datos experimentales obtenidos en los experimentos citados anteriormente. De esta forma se completa el modelo que describe matemáticamente la etapa de crecimiento del microorganismo, a través de la predicción de la evolución de la concentración de biomasa, de la capacidad desulfurante, y de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento.

### **3.5.1. Estudio del Consumo de Oxígeno**

En cuanto al consumo de oxígeno por parte del microorganismo, se debe distinguir, por un lado, velocidad de consumo de oxígeno (*OUR*) y, por otro lado, velocidad de consumo específico ( $q_{O_2}$ ), cuando se refiere al consumo por gramo de biomasa. Es importante destacar que ninguno de los dos es constante a lo largo del crecimiento (García-Ochoa y col., 1998), como se muestra en la Figura 3.30.

Durante el crecimiento, el consumo específico aumenta y la concentración de oxígeno disuelto en el medio disminuye. Pinches y Pallent (1986) observaron que la velocidad de consumo de oxígeno se podía relacionar con la concentración celular, de forma que cuando la concentración de oxígeno es el factor limitante del crecimiento del microorganismo, se puede utilizar una cinética de tipo Monod tanto para la velocidad de crecimiento específica como para el consumo específico de oxígeno. En la fase estacionaria del crecimiento, el consumo específico disminuye y la concentración de oxígeno disuelto aumenta porque disminuye la demanda. Además, existe una concentración crítica de oxígeno disuelto, por debajo de la cual el microorganismo se comporta de forma distinta en cuanto a su metabolismo, que se traduce en diferencias en la concentración máxima de biomasa alcanzada en el crecimiento.



**Figura 3.30.** Evolución típica de la velocidad de consumo de oxígeno durante el crecimiento del microorganismo.

La velocidad de consumo de oxígeno en transformaciones microbianas puede describirse por la siguiente ecuación (Pinches y Pallent, 1986):

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_x = m_{O_2} C_x + Y_{OX} \frac{dC_x}{dt} \quad [3.14]$$

Esta ecuación considera el consumo específico de oxígeno como una función de dos términos. Generalmente, se considera que el microorganismo consume oxígeno en las reacciones metabólicas que lleva a cabo, con dos objetivos globales: el mantenimiento celular en estado viable (representado por un coeficiente de mantenimiento,  $m_{O_2}$ ) y el crecimiento (considerado mediante un rendimiento macroscópico,  $Y_{OX}$ ). El primer parámetro,  $m_{O_2}$ , tiene un valor constante independientemente de las condiciones de transporte de oxígeno que existan en el medio de crecimiento, mientras que el rendimiento macroscópico,  $Y_{OX}$ , de acuerdo al tratamiento habitual, dado por la ecuación [3.14], se puede ver influenciado por el transporte, por lo que tendrá un valor distinto en el caso de que cambien las condiciones de transporte en el cultivo (García-Ochoa y Gómez, 1998).

En los procesos de fermentación aerobios es necesario proporcionar al microorganismo la cantidad de oxígeno suficiente para que éste satisfaga sus requerimientos metabólicos. La utilización de los nutrientes por parte de los microorganismos, principalmente la oxidación de la fuente de carbono y su posterior transformación en biomasa, productos y dióxido de carbono, sólo es posible con el suficiente aporte de oxígeno desde la fase gas. Cuando, en un biorreactor, un componente poco soluble, como el oxígeno, debe ser transferido desde el gas –aire- al medio líquido, donde se encuentran los microorganismos, el balance de oxígeno puede expresarse:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_X \quad [3.15]$$

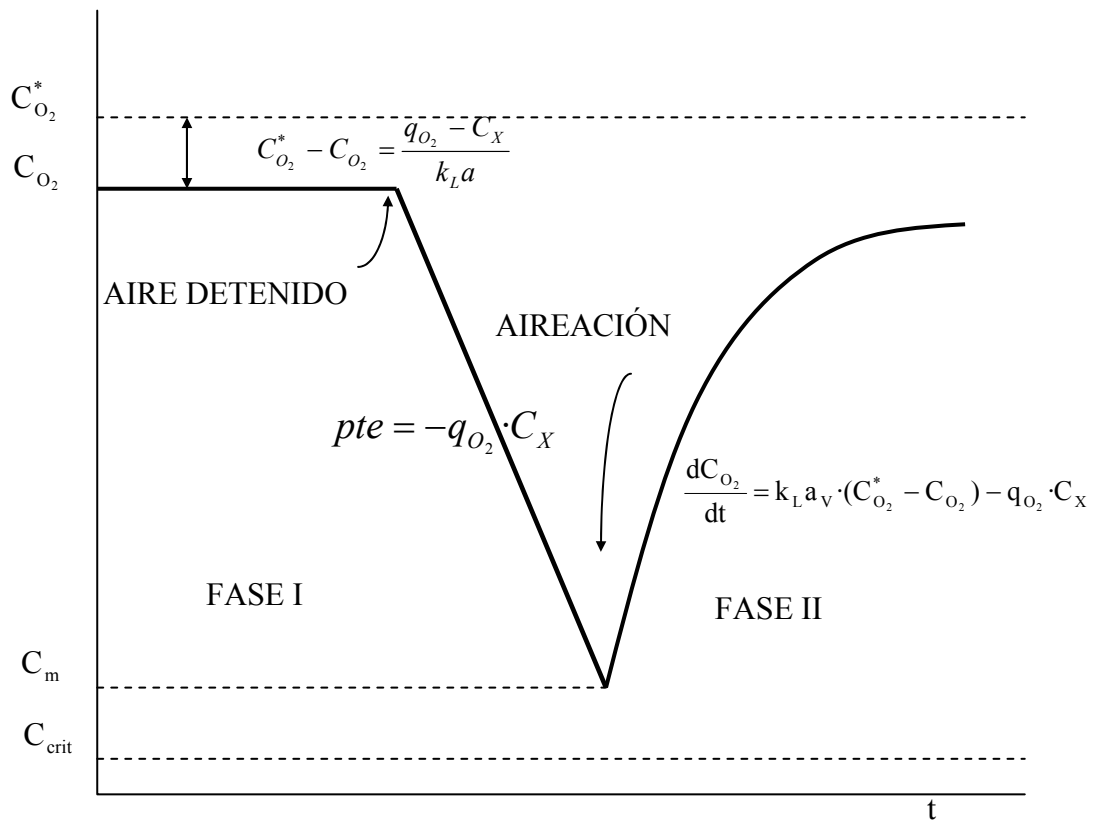
siendo el primer sumando a la izquierda de la expresión el término referido al transporte de oxígeno, y el segundo, el referido al consumo de oxígeno por parte del microorganismo (*OUR*). En el término referente al transporte,  $k_L a$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $C_{O_2}^*$  es la concentración de saturación de oxígeno disuelto, y en el término referente al consumo,  $q_{O_2}$  es la velocidad específica de consumo de oxígeno y  $C_X$  es la concentración de biomasa en cada momento.

El método de medida de la velocidad de consumo más utilizado por su sencillez y relativa exactitud es el **método dinámico** (Dussap y Gros, 1985; Yang y col., 1988; Gao y Lee, 1992; Rane y Sims, 1994; Gómez, 1995, García-Ochoa y col., 2000). Este método se basa en el balance de oxígeno disuelto en el biorreactor expresado en la ecuación [3.15], midiendo la evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante la interrupción de la aireación del caldo y su posterior aireación. Si, a su vez, se mide la concentración celular en el medio de cultivo, se puede determinar el consumo específico de oxígeno del microorganismo,  $q_{O_2}$ , como la pendiente, con signo negativo, de la recta de regresión obtenida al representar la concentración de oxígeno disuelto,  $C_{O_2}$  vs. tiempo en la fase de no aireación, como se muestra en la Figura 3.31. En esta

figura se recogen, en forma esquemática, las distintas fases de aplicación de este método. En una primera fase, se suspende la aireación en el medio de cultivo, registrando la disminución de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo, de forma que la ecuación [3.15] en estas condiciones, se reduce a:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -q_{O_2} \cdot C_X = OUR \quad [3.16]$$

Antes de que la concentración de oxígeno disuelto alcance un valor crítico, se reanuda la aireación del medio de cultivo. La concentración de oxígeno aumenta y, conocido  $OUR$ , se puede determinar  $k_L a$ , de acuerdo a la ecuación [3.15].



**Figura 3.31.** Esquema de la técnica dinámica (régimen no estacionario) para la medida de la velocidad de consumo del microorganismo.

### **3.5.2. Estudio del Transporte de Oxígeno**

En cuanto a la transferencia de oxígeno, los sistemas microbianos son heterogéneos, normalmente gas-líquido-sólido, por lo que se ha de tener en cuenta el aire suministrado al sistema, el medio y el propio microorganismo. Por tanto, es imprescindible en la mayoría de los sistemas prestar atención al transporte gas-líquido, tanto en los sistemas aerobios, que son la mayoría, como en el caso de sistemas anaerobios, donde se produce el transporte de otros gases, como metano o dióxido de carbono, por ejemplo. La velocidad de transferencia de materia se suele describir como un término proporcional al gradiente de concentración, siendo el coeficiente de proporcionalidad el llamado coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_L a$ . Para poder llevar a cabo el diseño y el cambio de escala de los reactores, se debe conocer este coeficiente, pero esto resulta complejo, especialmente en sistemas en los que se trabaja con microorganismos.

La etapa de transporte de oxígeno del aire al medio líquido es a menudo la etapa controlante de todo el proceso, debido a la baja solubilidad que presentan los gases en los líquidos y la baja velocidad de transporte que se produce. La importancia de la transferencia de materia gas-líquido en las biotransformaciones aerobias hace que en las últimas décadas haya sido objeto de numerosos trabajos (Yagi y Yoshida, 1975; Figueiredo y Calderbank, 1979; Nishikawa y col., 1981; Ogut y Hatch, 1988; Poizat y col., 1992; Nocentini y col., 1993; Roman y col., 1993; Pedersen y col., 1994; García-Ochoa y Gómez, 1998). Sin embargo, es escasa la información que existe sobre la influencia de las variables de operación en el coeficiente de transporte y su predicción en los cultivos de elevada viscosidad (Margaritis y Zajic, 1978; Vashitz y col., 1989; Suh y col., 1992; Herbst y col., 1992; Gómez, 1995, García-Ochoa y Gómez, 2004). Sin duda, esta falta de información en caldos con microorganismos se debe a que se supone que los datos obtenidos con caldos simulados -donde los trabajos han sido más extensos- son extrapolables a la fermentación en presencia de los microorganismos, sin tener los inconvenientes del trabajo con microorganismos (Dussap y col., 1985; Vlaev y Valeva, 1990; Kawase y col., 1992; Roman y col., 1993).



La ecuación [3.15] es la base de los **métodos de medida de  $k_La$**  en biorreactores. Se han desarrollado un gran número de técnicas experimentales de medida, con distintas variantes, todas ellas aplicables dentro de un intervalo restringido de condiciones de operación y que se pueden clasificar en: técnicas de medida indirecta y técnicas de medida directa.

Las **técnicas de medida indirecta** de  $k_La$  son aquellas que se llevan a cabo en sistemas donde no se está produciendo una biotransformación. Los valores de  $k_La$  obtenidos en medios artificiales que simulan los caldos de fermentación se emplean, generalmente, para realizar comparaciones entre diferentes biorreactores que operan en condiciones similares o en la obtención de correlaciones empíricas que permiten estimar el coeficiente de transporte y describir la transferencia de materia gas-líquido (Dussap y col., 1985; Vlaev y Valeva, 1990; Yasukawa y col., 1991; Leckie y col., 1991b; García-Ochoa y Gómez, 1998).

En estos casos, en ausencia de transformación microbiana, el término correspondiente al consumo de oxígeno,  $q_{O_2} \cdot C_x$ , de la ecuación [3.15] se hace cero, resultando la siguiente expresión:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [3.17]$$

Los datos experimentales para la resolución de esta ecuación se pueden obtener mediante diferentes técnicas o métodos, que pueden ser clasificados en químicos y físicos. Los métodos químicos se basan en la medida de la concentración de oxígeno disuelto a través de una reacción química como la oxidación del sulfito (Yoshida y col., 1960; Dussap y col., 1985; Yang y col., 1992), la adsorción de CO<sub>2</sub> (Danckwerts y Gillham, 1966; Danckwerts, 1970) o la oxidación de hidracina (Onken y col., 1985). Los métodos físicos utilizan la respuesta de un electrodo de oxígeno a los cambios en la concentración de este gas en el medio, en condiciones no estacionarias o dinámicas. Este último tipo de método es el más utilizado y se basa en la medida de la concentración de oxígeno disuelto durante la absorción o desorción de oxígeno en la disolución (Dussap y

col., 1985; Costa y col., 1982a y 1982b; Merchuk y col., 1994; Arranz, 1993; Gómez, 1995, García-Ochoa y Gómez, 1998). Su aplicación presenta ciertas restricciones que es necesario tener en cuenta para la obtención de valores correctos, como son la adecuada disposición en el reactor del electrodo de medida, el tiempo de respuesta y la linealidad del mismo (Nocentini y col., 1993; Merchuk y col., 1994).

Las **técnicas de medida directa** son aquellas en las que se determina la velocidad de transferencia de materia en presencia de microorganismos, por lo que el valor obtenido es más representativo del sistema en estudio. La medida de la variación de la concentración de oxígeno en el biorreactor puede realizarse en condiciones estacionarias o no estacionarias o dinámicas.

El **método dinámico de medida** consiste en interrumpir la aireación del medio de cultivo, como se ha comentado anteriormente, y reanudarla, registrando la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo. En esas condiciones, la ecuación [3.14] se puede expresar como:

$$dC_{O_2} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \cdot dt - q_{O_2} \cdot C_X \cdot dt \quad [3.18]$$

Teniendo en cuenta que, en el momento en que se inicia la aireación del caldo, las condiciones iniciales son  $t=t_m$  y  $C=C_m$ , la ecuación [3.18] se puede integrar, obteniéndose la siguiente expresión:

$$q_{O_2} \cdot C_X \cdot (t - t_m) + (C_{O_2} - C_m) = k_L a \cdot \int_{C_m}^C (C_{O_2}^* - C_{O_2}) dt \quad [3.19]$$

Esta ecuación, una vez integrada, permite calcular el valor de  $k_L a$  a partir de la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo, una vez conocido el valor del consumo del microorganismo,  $OUR$  ó  $q_{O_2} \cdot C_X$ , como se ha explicado anteriormente.

Como ya se ha comentado, la transferencia de oxígeno en un biorreactor tipo tanque agitado —el más ampliamente utilizado en este tipo de procesos— es función de muchas variables, como las propiedades físicas del líquido, la geometría del tanque y del agitador, el tipo de difusor empleado y las condiciones de operación. Este elevado número de variables hace que existan numerosas correlaciones empíricas para estimar el valor de  $k_L a$  que se pueden clasificar en dos categorías. Unas tienen una forma dimensional, correlacionando  $k_L a$  con la velocidad de agitación (o potencia por unidad de volumen), la velocidad superficial del gas y, en caso de que el fluido sea no-Newtoniano, con la viscosidad, según una expresión del tipo:

$$k_L a = C_1 \cdot V_s^a \cdot N^b \cdot \mu_a^c \quad [3.20]$$

o bien, si se utiliza la potencia suministrada por el agitador:

$$k_L a = C_2 \cdot V_s^a \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{b'} \cdot \mu_a^c \quad [3.21]$$

Los valores de las constantes,  $C_1$  y  $C_2$ , y de los exponentes en ambos tipos de ecuaciones cambian para los distintos autores, dependiendo, principalmente, de los parámetros geométricos del tanque. En la Tabla 3.27 se presentan los valores de los exponentes de cada una de las variables en algunas de las correlaciones propuestas en la literatura.

La segunda categoría tiene una forma adimensional y expresan, generalmente, el número de Sherwood como una función del número de Reynolds, de Aireación y de Weber.

$$Sh = C_3 \cdot Re^{x_1} \cdot Na^{x_2} \cdot We^{x_3} \quad [3.22]$$

Ambos tipos de ecuaciones son únicamente aplicables en un restringido intervalo de las condiciones de operación y son casi específicas de cada recipiente. Sin embargo, este tipo de ecuaciones empíricas han sido utilizadas ampliamente en la literatura (Yagi y Yoshida, 1975; Figueiredo y Calderbank, 1979; Nishikawa y col., 1981; Ogut y Hatch, 1988; Poizat y col., 1992; Nocentini y col., 1993;

Roman y col., 1993; Pedersen y col., 1994; García-Ochoa y Gómez, 1998), pero muchas veces no concuerdan los resultados obtenidos con las diferentes ecuaciones (García-Ochoa y Gómez, 1998; Gogate y col., 2000). En los últimos años se han desarrollado otro tipo de modelos basados en inteligencia artificial, como redes neuronales (García-Ochoa y Gómez, 2001), aunque también con una base empírica.

Hasta ahora, estos modelos han sido los más empleados para realizar el cambio de escala, a pesar de que requieren mucho trabajo experimental, y por ello están siendo reemplazados por modelos teóricos o predictivos, basados en principios fundamentales. Así, se han desarrollado modelos teóricos capaces de describir la transferencia de materia en biorreactores de tipo columna o airlift (Kawase y col., 1987; García-Calvo, 1989, 1992; Tobajas y col., 1999). Recientemente, García-Ochoa y Gómez (2004) han propuesto un modelo para la predicción del coeficiente de transporte y el área específica en reactores tipo tanque agitado, basado en la teoría de penetración de Higbie y la teoría de turbulencia isotrópica de Kolmogoroff. Este modelo es el que se ha utilizado en este trabajo para determinar el coeficiente de transferencia de materia, comparando su predicción con los valores experimentales obtenidos en el medio de crecimiento.

**Tabla 3.27.** Valores de los exponentes obtenidos en la estimación de  $k_L a$  para cada una de las variables de las correlaciones propuestas en la literatura. (Adaptado de García-Ochoa y Gómez, 2004).

Sistema	Autores	N	P/V	$V_s$	$\mu_a$	Volumen (L)
Newtoniano	Yagi y Yoshida (1975)		0,8	0,3		12
	Figueiredo y Calderbank (1979)	-	0,6	0,8	-	600
	Vant'Riet (1979)	-	0,4	0,5	-	2 - 2600
	Nishikawa y col. (1981)	2,4	0,8	0,33	-	2,65 - 170
	Chandrasekharan y Calderbank (1981)	-	0,55	$0,55 \cdot D^{-1/2}$		50 - 1430
	Davies y col. (1985)		0,8	0,45		20 - 180
	Kawase y Moo-Young (1988)		1,0	0,5		
	Linek y col. (1987)		0,6	0,4		20
	Linek y col. (1991)		0,65	0,4		20
	Gagnon y col. (1998)		0,6-0,8	0,5		22
	Arjunwadkar y col. (1998)		0,68	0,58		5
	Vasconcelos y col. (2000)		0,62	0,49		5
No Newtoniano	Yagi y Yoshida (1975)	2,2	-	0,3	-0,4	2,65
	Nishikawa y col. (1981)	2,4	0,8	0,3	-0,5	2,7 - 170
	Linek y col. (1991)	-	1,1	0,4	-	20
	Pedersen y col. (1994)	2,7	-	0,5-0,7	-	5
	García-Ochoa y Gómez (1998)	2,0	0,6	0,67	-0,67	20
	Arjunwadkar y col. (1998)		0,68	0,4		5
	García-Ochoa y Gómez (2001)	2,0	-	0,5	-0,67	2-25

### **3.5.2.1. Predicción del coeficiente volumétrico de transferencia de materia**

Como se ha visto, el coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_L a$ , se puede estimar en reactores tipo tanque agitado mediante un gran número de ecuaciones. La mayoría de ellas son empíricas (Jonson y Huang, 1956; Calderbank y Moo-Young, 1961; Perez y Sandall, 1974), y otras tienen una base teórica (Lamont y Scott, 1970; Prasher y Wills, 1973; Kawase y col., 1987, 1992; Zhang y Thomas, 1996).

Para predecir  $k_L a$ , a continuación se comenta cómo se realiza la estimación del coeficiente de transporte,  $k_L$  y posteriormente del área interfacial específica,  $a$ .

Los modelos teóricos para la **predicción del coeficiente de transferencia de materia**,  $k_L$ , se dividen según diferentes aproximaciones. Unos están basados en el concepto de una interfase rígida (Whitman, 1923), otros en el de una interfase donde se produce una renovación de la superficie mediante el desplazamiento de líquido a la interfase (Higbie, 1935; Danckwerts, 1951) y otros en una combinación de ambos conceptos (Toor y Marchelo, 1958).

El modelo que se utiliza en este trabajo (García-Ochoa y Gómez, 2004) está basado en la teoría de penetración de Higbie (Kawase y col., 1987; Billet y Schultes, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999). Suponiendo una difusión no estacionaria de los elementos de la interfase gas-líquido. Así, para la unidad de masa transferida durante un tiempo de contacto o exposición  $t_e$ , se obtiene que:

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad [3.23]$$

El tiempo de exposición,  $t_e$ , que caracteriza el tiempo de residencia de los microtorbellinos en la interfase, generalmente se desconoce, pero se puede describir a través de un modelo adecuado. La evaluación de dicho tiempo se puede realizar mediante la teoría de Kolmogoroff (1941). Lo que propone esa

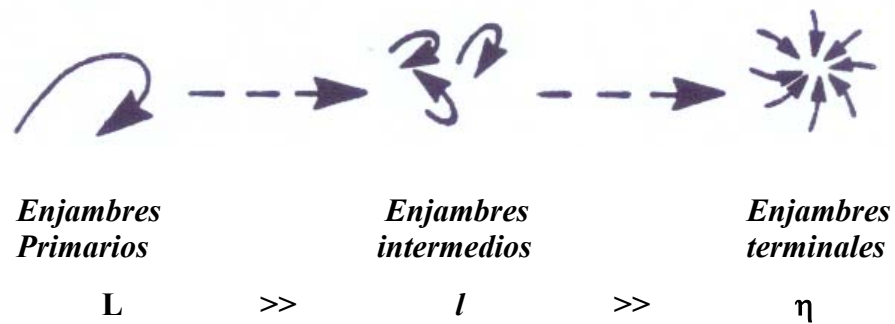
teoría es que el flujo turbulento se puede representar con el modelo de pequeños enjambres o torbellinos dentro de torbellinos mayores, albergados a su vez dentro de otros aún mayores. Los enjambres primarios, que tienen una longitud de onda o escala similar a las dimensiones del flujo de la corriente principal, se forman como consecuencia de la turbulencia producida por la agitación. Estos enjambres primarios no son isotrópicos, es decir, que las distribuciones estadísticas de las fluctuaciones varían al hacerlo la orientación espacial de los ejes coordenados; se trata de enjambres inestables y que se desintegran en enjambres más pequeños o de mayor frecuencia (Figura 3.31). Estos enjambres contienen, según Kolmogoroff, la mayor parte de la energía cinética que suministra la agitación.

Kolmogoroff propuso la siguiente hipótesis: “A números de Reynolds suficientemente elevados existe un rango, de elevados números de onda, donde la turbulencia se encuentra en equilibrio estático, y queda determinada por los parámetros *energía disipada por unidad de masa*,  $\varepsilon$ , y la *viscosidad cinemática*,  $\nu$ . Este estado de equilibrio es universal”. Esta turbulencia es independiente de las condiciones externas y cualquier cambio en la escala de longitudes efectivas y en la escala de tiempo de la turbulencia solo puede ser el resultado del efecto de los parámetros  $\varepsilon$  y  $\nu$ . Si se considera un volumen pequeño de fluido, cuyas dimensiones sean pequeñas comparadas con la escala del flujo principal, las componentes fluctuantes de la velocidad son iguales, y la llamada turbulencia isotrópica local existe incluso aunque la turbulencia de los enjambres mayores no pueda ser considerada como isotrópica. A partir de razonamientos dimensionales, Kolmogoroff llegó a obtener la longitud de escala y la velocidad de escala para los enjambres más pequeños, de acuerdo a la relación entre dos parámetros característicos de los enjambres, tales como su longitud,  $\eta$ , y la velocidad de fluctuación,  $u$ . Ambos parámetros dependen de la velocidad de disipación de energía por unidad de masa,  $\varepsilon$ , y la viscosidad cinemática,  $\nu$ , de acuerdo a:

$$\eta = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad [3.24]$$

$$u = (\nu \cdot \varepsilon)^{\frac{1}{4}} \quad [3.25]$$

El tiempo de exposición se suele medir como el tiempo en el que la burbuja se desplaza una longitud igual a su diámetro, y se estima mediante la relación entre la longitud de la turbulencia y la velocidad de fluctuación de Kolgomoroff. Esta relación ha sido utilizada en algunos trabajos para calcular valores de tiempo de exposición en la predicción del coeficiente de transferencia de materia volumétrico en reactores de tipo airlift (Kawase y col., 1987; Kawase y Hashiguchi, 1996).



**Figura 3.31.** Transferencia de energía desde los enjambres primarios, no isotrópicos, a los enjambres terminales, según el concepto de turbulencia isotrópica local.

Kawase y col. (1992) y García-Ochoa y Gómez (2004) han aplicado este modelo cuando el comportamiento reológico del líquido se describe mediante los modelos de Ostwald-de Waele y Casson. Si se considera el modelo de Ostwald-de Waele para la descripción de fluidos no newtonianos, se obtienen las siguientes ecuaciones para el tiempo de exposición y el coeficiente de transporte:

$$t_e = \left( \frac{K}{\varepsilon \cdot \rho} \right)^{\frac{1}{(1+n)}} \quad [3.26]$$

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left( \frac{\varepsilon \cdot \rho}{k} \right)^{\frac{1}{2 \cdot (1+n)}} \quad [3.27]$$

mientras que si se utiliza el modelo de Casson, se obtienen las siguientes ecuaciones:



$$t_e = \left( \frac{\mu_c / \rho}{(1 - \sqrt{\alpha})^2} \right)^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\varepsilon}} \quad [3.28]$$

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left( \frac{\varepsilon \cdot \rho \cdot (1 - \sqrt{\alpha_r})^2}{\mu_c} \right)^{\frac{1}{4}} \quad [3.29]$$

En la mayor parte de los trabajos, cuando se lleva a cabo la predicción teórica del coeficiente de transferencia de materia en tanques, columnas de burbujeo y reactores airlift con fluidos no newtonianos (Kawase y col., 1987; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999), se suele adoptar la aproximación de Ostwald-de Waele.

En el caso de medios con comportamiento newtoniano ( $n=1$ ;  $k=\mu$ ;  $\mu_c=\mu$  y  $\alpha_r=0$ ), las ecuaciones [3.26] y [3.27] se reducen ambas a la siguiente:

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left( \frac{\varepsilon \cdot \rho}{\mu} \right)^{\frac{1}{4}} \quad [3.30]$$

Como se observa, para determinar  $k_L$  es necesario estimar la velocidad de disipación local de energía,  $\varepsilon$ . Para ello, se asume que la energía en la interfase gas-líquido se consume en el contacto entre los elementos de líquido y las burbujas de gas. La velocidad media de disipación de energía por unidad de masa en un tanque agitado se puede aproximar a:

$$\varepsilon \approx \varepsilon_{ave} = \frac{P}{\rho \cdot \frac{\pi}{4} T^2 H} \quad [3.31]$$

La potencia suministrada en el caso de sistemas con aireación,  $P$ , es siempre menor que en sistemas no aireados,  $P_0$ . Abradi y col. (1988) han utilizado la siguiente ecuación, propuesta por Michel y Miller (1962), para describir los datos experimentales en un amplio rango de condiciones experimentales:

$$P = \alpha \cdot \left( \frac{P_0^2 \cdot N \cdot T^3}{Q^{0.56}} \right)^\beta \quad [3.32]$$

donde las constantes  $\alpha$  y  $\beta$  dependen del tipo de agitador y la configuración del sistema de agitación. Sus valores para turbinas Rushton son  $\alpha=0,783$  y  $\beta=0,459$ , para un agitador con una única turbina, y para un sistema con doble turbina los valores son  $\alpha=1,224$  y  $\beta=0,432$  (Abrardi y col., 1988).

La potencia suministrada en un sistema no aireado,  $P_0$ , se puede evaluar teniendo en cuenta que el número de potencia,  $N_p$ , se puede considerar constante en el régimen turbulento ( $Re > 10000$ ), por lo que depende solamente del tipo de agitador y de la geometría. El número de potencia,  $N_p$ , viene expresado por la siguiente ecuación:

$$N_p = \frac{P_0}{\rho \cdot N^3 \cdot T^5} \quad [3.33]$$

Así, una vez conocidos todos estos parámetros, el coeficiente de transferencia de materia,  $k_L$ , se puede calcular mediante las ecuaciones [3.27], [3.29] ó [3.32], dependiendo del modelo utilizado y del sistema empleado.

Por otro lado, el **área interfacial específica**,  $a$ , depende de las propiedades hidrodinámicas del reactor (de la fracción volumétrica de gas en el líquido, también llamada *hold-up* del gas,  $\phi$  y del diámetro de burbuja,  $d_b$ ), que a su vez son función de las propiedades físicas y de la geometría del sistema. En la literatura se han encontrado distintas ecuaciones para la determinación del área interfacial específica en reactores tipo tanque agitado (Joshi y col., 1982; Barigou y Greaves, 1996), aunque su aplicación ha sido muy limitada.

El área interfacial específica se puede calcular a partir de los valores de tamaño medio de burbuja,  $d_b$ , y del *hold-up* del gas,  $\phi$ , suponiendo burbujas esféricas, mediante la siguiente ecuación (Kawase y col., 1987; Tobajas y col., 1999):

$$a = \frac{6\phi}{d_b} \quad [3.34]$$

El *hold-up* del gas se puede estimar con la ecuación obtenida por Kudrewizki (1982) a partir de la teoría de la turbulencia isotrópica:

$$\frac{\phi}{1-\phi} = 0,5 \cdot \frac{V_s^{2/3}}{(g \cdot l)^{1/3}} \cdot \left( \frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \quad [3.35]$$

Suponiendo que el diámetro de las burbujas formadas en el régimen turbulento está afectado por la velocidad de agitación, se obtiene la siguiente ecuación para  $l$ , la microescala lateral de la turbulencia (Kudrewizki y Rabe, 1986):

$$l = 2 \cdot \left( \frac{\sigma}{\xi \rho_L} \right)^{3/5} \cdot \left( \frac{L^{2/5}}{w^{6/5}} \right) \cdot \left( \frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{0.1} \quad [3.36]$$

donde el coeficiente de resistencia,  $\xi$ , tiene un valor constante de 0,4 para un amplio valor de número de Reynolds:  $1 \cdot 10^3 \leq \text{Re} \leq 2 \cdot 10^5$ .

Teniendo en cuenta que la velocidad en la pala del agitador viene dada por:  $w = \pi \cdot T \cdot N$ , y que para configuraciones estándar del reactor:  $L = \frac{1}{6} \cdot h$ , se puede obtener la siguiente ecuación:

$$\frac{\phi}{1-\phi} = 0,819 \cdot \frac{V_s^{2/3} N^{2/5} T^{4/15}}{g^{1/3}} \left( \frac{\rho_L}{\sigma} \right)^{1/5} \cdot \left( \frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \cdot \left( \frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{-1/15} \quad [3.37]$$

Cuando la fase líquida es viscosa, es necesario modificar la ecuación anterior, para tener en cuenta las fuerzas viscosas que se habían supuesto despreciables (Bhavaraju y col., 1978; Kawase y Hashiguchi, 1996), obteniendo entonces la siguiente ecuación:

$$\frac{\phi_v}{1-\phi_v} = \frac{\phi}{1-\phi} \cdot \left( \frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{-1/4} \quad [3.38]$$

siendo  $\phi_v$  el *hold-up* en el sistema viscoso.

El diámetro de burbuja de equilibrio se puede obtener mediante un balance entre la presión dinámica ejercida por el flujo turbulento sobre la burbuja produciendo su rotura, y la resistencia de la interfase (tensión superficial y resistencia de la fase líquida a la deformación, aunque esta última suele ser pequeña). La relación entre la tensión superficial y las fuerzas de fluctuación turbulenta es el número de Weber,  $We$ , que se puede suponer que tiene un valor constante:

$$We = \tau \cdot d_b / \sigma = C \quad [3.39]$$

En un flujo turbulento isotrópico, la presión dinámica se puede expresar en términos de la velocidad de fluctuación,  $u$ , y de la microescala lateral de la turbulencia en equilibrio,  $l$ , supuesta del mismo orden de magnitud que el diámetro de burbuja,  $d_b$ . Así:

$$u = (\varepsilon \cdot l)^{1/3} \quad [3.40]$$

y entonces:

$$\tau \cong \rho_L \cdot u^2 \cong \rho_L \cdot \left[ \left( \frac{P}{V} \right) \cdot \frac{d_b}{\rho_L} \right]^{2/3} \quad [3.41]$$

Combinando las ecuaciones [3.38] y [3.39], se obtiene la siguiente ecuación:

$$d_{b_{\max}} \propto \frac{\sigma^{3/5}}{\left( \frac{P}{V} \right)^{2/5} \cdot \rho_L^{1/5}} \quad [3.42]$$

En la literatura se han propuesto muchas ecuaciones con esta forma para diferentes sistemas (Calderbank, 1958; Parthasarathy y col., 1991). Bhavaraju y col. (1978) han propuesto la siguiente ecuación para un diámetro de burbuja medio en sistemas viscosos:

$$d_b = 0,7 \cdot \frac{\sigma^{0,6}}{\left( \frac{P}{V} \right)^{0,4} \cdot \rho_L^{0,2}} \cdot \left( \frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{0,1} \quad [3.43]$$

donde  $\mu_L$  representa la viscosidad para fluidos newtonianos puros, aunque se puede utilizar la viscosidad de Casson,  $\mu_C$ , en el caso de fluidos no newtonianos y  $\mu_L$  es la viscosidad del gas.

Así, obtenidos el diámetro de burbuja,  $d_b$ , y el *hold-up* del gas,  $\phi$ , se puede calcular el área interfacial específica,  $a$  mediante la ecuación [3.34]. Y una vez obtenido este valor, junto con el valor calculado para el coeficiente de transferencia de materia,  $k_L$ , con las ecuaciones [3.27], [3.29] ó [3.30], se puede obtener el coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_L a$ . Los resultados son una predicción muy buena de los datos de diversos autores obtenidos en tanques de diferentes tamaños, con medios de viscosidades muy diferentes (García-Ochoa y col., 2004).

### **3.5.2.2. El Factor de Aumento, $E$**

En cuanto a la exactitud en la predicción de  $k_L a$  para cultivos en biorreactores mediante correlaciones empíricas, existen muchos problemas, ya que se suelen encontrar algunas discrepancias entre los valores predichos y los valores estimados de  $k_L a$  a partir de dichas correlaciones. Esto puede ser debido a la fuerte influencia de la geometría del biorreactor, al intervalo de condiciones de operación en que la ecuación es válida, a la influencia de las propiedades fisico-químicas, o al método de medida utilizado (García-Ochoa y Gómez, 1998; Gogate y col., 2000).

También se encuentran diferencias si se utiliza el método de predicción comentado, si no se tienen en cuenta otros aspectos. Hay que considerar otros factores que afectan al valor del coeficiente volumétrico de transporte, como la presencia de surfactantes y del propio microorganismo. En los procesos en que se trabaja con microorganismos, se producen simultáneamente el transporte y las reacciones bioquímicas de una o más especies entre las distintas fases. En ocasiones, el transporte de sustratos hasta las células o las enzimas que actúan de catalizadores del proceso se produce a una velocidad mucho mayor que la reacción bioquímica, en cuyo caso la velocidad total de conversión de sustrato viene dada solamente por la

cinética de la reacción. Sin embargo, cuando la velocidad de transferencia de materia es relativamente pequeña comparada con la velocidad de la reacción, el transporte puede tener una gran influencia o incluso controlar la velocidad del proceso biológico. De esta forma, cuando el gas es absorbido en un líquido y reacciona, los perfiles de concentración del gas absorbido varían debido a la reacción, y la velocidad de absorción se puede ver aumentada. La absorción de oxígeno en un medio de cultivo se puede considerar como la absorción de un gas en un líquido donde los reactantes son los microorganismos que se encuentran en el líquido (Merchuck y Asenjo, 1995). Este fenómeno se conoce como aumento del transporte de oxígeno debido a la presencia de microorganismo. En el estudio de la absorción con reacción química, el aumento de transporte debido a la reacción química es un aspecto conocido, que se describe mediante un factor de aumento,  $E$ , aunque este tratamiento no está extendido en los procesos bioquímicos.

El incremento en la velocidad de absorción específica del gas debido a la presencia de la fase dispersa, se puede caracterizar mediante un factor de aumento,  $E$ . Este parámetro se tiene en cuenta a través del número adimensional de Hatta. El número de Hatta proporciona una medida de la extensión de la reacción en la película. Cuando la velocidad de transferencia de materia es relativamente grande, no se detecta influencia en el consumo de oxígeno por el microorganismo, ya que el aumento del transporte es muy pequeño. Sin embargo, existen cultivos donde la velocidad de consumo de oxígeno ( $OUR$ ) es alta, o la viscosidad es muy grande, y se puede observar un aumento de la velocidad de transporte de oxígeno debido a la actividad del microorganismo, observándose un aumento significativo del valor de  $k_L a$  respecto a la absorción física.

Este aumento puede ser obtenido a partir de diferentes modelos de transferencia de materia para sistemas turbulentos. Para predecir el factor de aumento se puede utilizar un modelo muy sencillo, como el modelo de la doble película (Van Swaaij y Versteeg, 1992).

El transporte de oxígeno se considera en estado estacionario en la película y, por tanto, no existe acumulación de materia en ella. El oxígeno es un gas poco soluble en agua, por lo que se puede suponer que no existe limitación en cuanto a la

transferencia de materia en la fase gas, y solamente es necesario considerar la resistencia a la transferencia de materia en la fase líquida. Además, se supone que existe una capa de anchura  $z_s$ , de moléculas absorbidas (sustancias como antiespumantes, surfactantes, etc.), y una monocapa de células de anchura  $z_m$  tras la interfase gas-líquido en el lado del líquido. La situación puede quedar descrita de forma esquemática por la Figura 3.32.

En un reciente trabajo (García-Ochoa y Gómez, 2005) se ha propuesto el siguiente modelo:

El balance de materia para el oxígeno disuelto a través de la capa de surfactante puede escribirse como:

$$D_s \frac{\partial C^2}{\partial z^2} = 0 \quad 0 \leq z \leq z_s \quad [3.44]$$

Suponiendo que esta capa está seguida de una monocapa de células, el balance de materia para el oxígeno que se disuelve y se consume en la monocapa de células, de concentración  $C_{X_m}$ , constante, es:

$$D_m \frac{\partial C^2}{\partial z^2} = q_{O_2} C_{X_m} \quad z_s \leq z \leq z_m \quad [3.45]$$

Finalmente, suponiendo que la capa anterior está seguida de una zona estancada de líquido de anchura  $z_L$ , con una concentración celular  $C_{X_l}(z)$ , se puede escribir:

$$D_l \frac{\partial C^2}{\partial z^2} = q_{O_2} \cdot C_{X_l}(z) \quad z_m \leq z \leq z_L \quad [3.46]$$

Las condiciones de contorno de las ecuaciones [3.44] a [3.46] son las siguientes:

$$\left. \begin{aligned}
 -D_m \cdot \frac{dC}{dz} &= D_s \cdot \frac{C^* - C_s}{z_s} \therefore z = z_s \\
 C|_I &= C|_{II} \therefore z = z_s + z_m \\
 -D_m \cdot \frac{dC}{dz} &= -D_L \cdot \frac{dC_{II}}{dz} \therefore z = z_s + z_m \\
 C|_{II} &= C_I \therefore z = z_s + z_m + z_L
 \end{aligned} \right\} [3.47]$$

donde  $C$  representa la concentración de oxígeno en la fase continua en la película de líquido o la monocapa celular,  $D$  es el coeficiente de difusión molecular en una película de anchura  $z$ ,  $q_{O_2}$  representa la velocidad específica de consumo de oxígeno del microorganismo y  $q_{O_2} \cdot C_X$  la velocidad de consumo de oxígeno ( $OUR$ ).

Algunos de los trabajos encontrados en la literatura realizan una discusión del factor de aumento biológico por absorción de oxígeno en fermentaciones (Tsao, 1969; Merchuck y Asenjo, 1995; Ju y Sundarajan, 1992) suponiendo diferentes perfiles de concentración celular en biorreactores. En este trabajo se ha utilizado una relación lineal para la concentración celular en la capa de líquido estancado:

$$C_X(z) = a + b \cdot z \quad [3.48]$$

Esta sustitución tiene la ventaja añadida de proporcionar una solución con una forma cerrada fácil de evaluar. Las constantes  $a$  y  $b$  de la ecuación [3.47] se obtienen a partir de las condiciones de contorno que se muestran en la Figura 3.46, de lo cual resulta:

$$C_X(z) = C_{X_I} - \frac{C_{X_m} - C_{X_I}}{z_L} \cdot (z - z_T) \therefore z_s + z_m \leq z \leq z_s + z_m + z_L \quad [3.49]$$

siendo  $z_T$  el espesor total.

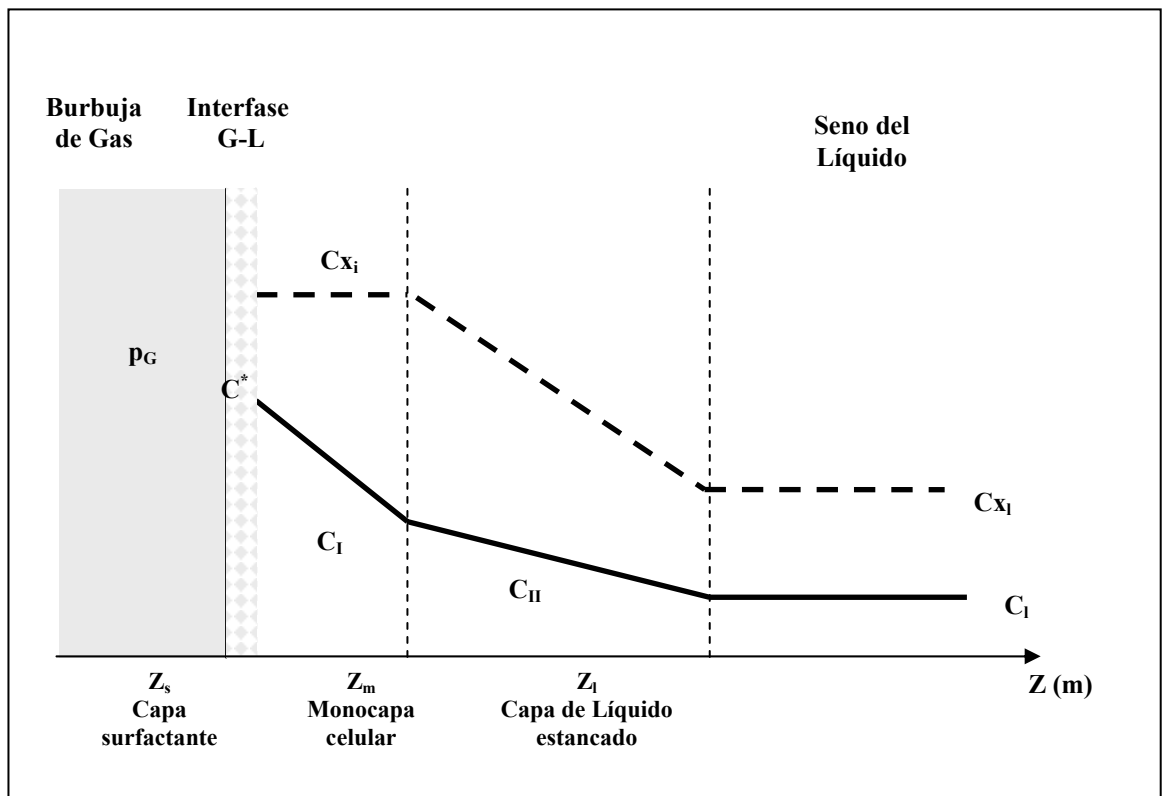
El aumento de transferencia de materia respecto a la absorción física en un sistema biológico (con presencia de microorganismo) se define con respecto a la velocidad de absorción en sistemas gas-líquido. Así, el factor de aumento se puede definir como la relación entre el flujo de absorción de oxígeno en presencia de una



tercera fase dispersa (en este caso, el microorganismo) y el flujo de absorción en su ausencia, en las mismas condiciones hidrodinámicas y de gradiente para la transferencia de materia:

$$E = \frac{J_{O_2}}{J_{O_2}^0} \quad [3.50]$$

donde  $J$  es la densidad de flujo molar de oxígeno ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a través de la interfase gas-líquido.



**Figura 3.32.** Representación esquemática del perfil de oxígeno y concentración de biomasa en estado estacionario. (Adaptado de García-Ochoa y Gómez, 2005)

Con las soluciones de las ecuaciones [3.44] y [3.46], se puede evaluar el flujo de transporte de oxígeno en el límite entre la película de surfactante y la monocapa celular suponiendo una cinética de orden cero para la velocidad de consumo de oxígeno (Ju y Sundarajan, 1992; Merchuk y Asenjo, 1995):

$$J_{O_2} = -D_m \cdot \frac{dC}{dz} \Big|_{z=z_s} = \left[ \frac{D_m q_{O_2} C_{X_m} z_m z_L}{D_l} + \frac{z_L^2 q_{O_2} (2C_{X_m} + C_{X_l})}{6} + \frac{z_m^2 q_{O_2} C_{X_m} + 2(C^* - C)}{2} \right] \cdot \left[ \frac{1}{\sum_i z_i / D_i} \right] \quad [3.51]$$

El flujo de absorción en ausencia de microorganismo ( $C_{X_L}=C_{X_m}=0$  y  $q_{O_2}=0$ ) en las mismas condiciones hidrodinámicas y de gradiente para la transferencia de materia es:

$$J_{O_2}^0 = -D_m \cdot \frac{dC}{dz} \Big|_{z=z_s} = \frac{(C^* - C)}{z_L / D_L} \quad [3.52]$$

Combinando las ecuaciones [3.50], [3.51] y [3.52], se puede obtener la expresión del factor de aumento:

$$E = \left[ 1 + \frac{q_{O_2} \cdot C_{X_m} \cdot z_m^2}{2D_m (C^* - C_L)} \cdot \left( 1 + 2 \frac{z_L \cdot D_m}{z_m \cdot D_L} + \frac{2z_L^2}{3z_m^2} \right) + \frac{1}{3} \cdot \frac{q_{O_2} \cdot C_{X_l} \cdot z_L^2}{2D_l (C^* - C_L)} \right] \cdot \left[ \frac{z_L / D_L}{\sum_i z_i / D_i} \right] \quad [3.53]$$

donde el primer paréntesis de la ecuación [3.53] es una función del número de Hatta y de la relación  $z_L/z_m$  y  $D_m/D_L$  y representa el aumento del transporte por la presencia del microorganismo, resultante de la velocidad de consumo de oxígeno por los microorganismos en la monocapa de células y la capa de líquido estancado.

$$f(Ha) = \left[ Ha_m \cdot \left( 1 + 2 \frac{z_L \cdot D_m}{z_m \cdot D_L} + \frac{2z_L^2}{3z_m^2} \right) + \frac{1}{3} \cdot Ha_L \right] \quad [3.54]$$

donde  $Ha$ , el número adimensional de Hatta está definido como:

$$Ha_i = \frac{q_{O_2} C_{X_i} z^2}{2D_i \cdot (C^* - C_L)} \quad [3.55]$$

El segundo paréntesis de la ecuación [3.53] representa el efecto de bloqueo físico debido a la película surfactante, las células adsorbidas en la interfase, considerando éstas como partículas sólidas semipermeables entorpeciendo el movimiento de difusión de las moléculas de oxígeno, y la película de líquido:

$$g\left(\frac{z}{D}\right) = \left[ \frac{\frac{z_L}{D_L}}{\frac{z_s}{D_s} + \frac{z_m}{D_m} + \frac{z_L}{D_L}} \right] \quad [3.56]$$

produciendo este término una disminución del transporte

La expresión [3.53] se puede, por tanto, simplificar a:

$$E = [1 + f(Ha)] \cdot [g(z/D)] \quad [3.57]$$

Dependiendo de los valores relativos de ambos términos, el factor de aumento,  $E$ , puede tomar valores menores, iguales o superiores a 1. Este fenómeno se ha descrito en la literatura y depende de las sustancias dispersas, presencia de surfactante, y de la clase y concentración de microorganismo (Yagi y Yoshida, 1975; Ju y Sundarajan, 1992; Galaction y col., 2004).

### ***3.5.2.3. Coeficiente volumétrico de transferencia de materia en presencia de biotransformación***

Como ya se ha comentado anteriormente, la velocidad de transferencia de materia de la fase gas a la fase líquida se suele describir como un valor proporcional al gradiente de concentración, en cuyo caso la constante de proporcionalidad viene dada por un coeficiente de transferencia de materia,  $k_L$ :

$$J_{O_2}^0 = k_G \cdot (p_G - p_i) = k_L \cdot (C_i - C_L) \quad [3.58]$$

Teniendo en cuenta la ecuación [3.49], el flujo molar por unidad de volumen,  $N_{O_2}$ , se puede expresar como:

$$N_{O_2} = a \cdot J_{O_2} = a \cdot E \cdot N^0 = k_G a \cdot (p_G - p_i) = a \cdot E \cdot k_L (C_i - C_L) \quad [3.59]$$

Considerando el coeficiente global de transporte, ante la imposibilidad de medir las propiedades físicas en la interfase, se tiene:

$$N_{O_2} = K_G a \cdot (p_G - p^*) = K_L a \cdot (C^* - C_L) \quad [3.60]$$

donde:

$$\frac{1}{K_L a} = \frac{1}{E \cdot k_L a} + \frac{1}{H \cdot k_G a} \quad [3.61]$$

Se puede observar que el coeficiente volumétrico global de transferencia de materia,  $K_L a$ , es un parámetro que agrupa las resistencias al transporte de oxígeno debido a las fases gas y líquida, y que puede ser modificado dependiendo del valor de  $E$ .

Debido a que el oxígeno es muy poco soluble en agua, la resistencia en la fase gas se supone despreciable. Por tanto, la resistencia a la transferencia en la película de líquido puede expresarse como:

$$K_L a = E \cdot k_L a \quad [3.62]$$

Así, se puede determinar el coeficiente volumétrico global de transferencia de materia,  $K_L a$ , una vez calculados el factor de aumento,  $E$ , y el coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_L a$ . Dependiendo de si  $E$  toma valores menores, iguales o superiores a 1, el coeficiente global  $K_L a$  en presencia de biotransformación, se verá disminuido, igualado o aumentado respecto al coeficiente  $k_L a$  sin microorganismo, cuyo valor se calcula sin tener en cuenta la presencia del microorganismo en el medio.

### **3.5.3. Resultados Experimentales y Discusión**

A continuación se exponen los resultados experimentales obtenidos en cuanto al consumo y transporte de oxígeno del microorganismo determinados en este trabajo, analizados de acuerdo a los modelos teóricos expuestos anteriormente.

#### ***3.5.3.1. Aplicación del Método Dinámico***

Se ha aplicado el método dinámico de medida para la obtención experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de materia en el medio de cultivo utilizado, empleando diferentes velocidades de agitación y distintos caudales de aireación. Las medidas se han realizado en ausencia y presencia de microorganismo en el medio. En este último caso, se ha obtenido también la velocidad de consumo de oxígeno.

En **ausencia de microorganismo**, los datos experimentales obtenidos del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se recogen en la Tabla 3.28. En la Figura 3.33 se representan los valores obtenidos en el medio inerte, sin microorganismo  $(k_{La})_i$  para distintas velocidades de agitación y diferentes caudales de aireación. En dicha figura se observa que, al representar el coeficiente volumétrico de transferencia de materia frente a la velocidad de agitación o al caudal de aireación,  $k_{La}$  aumenta al aumentar dichas variables, es decir, un aumento en la velocidad de agitación o en el caudal de aireación produce un aumento en el transporte de materia a través del medio de crecimiento del microorganismo. Así, al aumentar la velocidad de agitación o el caudal de aireación del medio, se consigue un aumento del transporte de oxígeno a través de él y por tanto una mayor concentración de oxígeno disuelto en el medio.

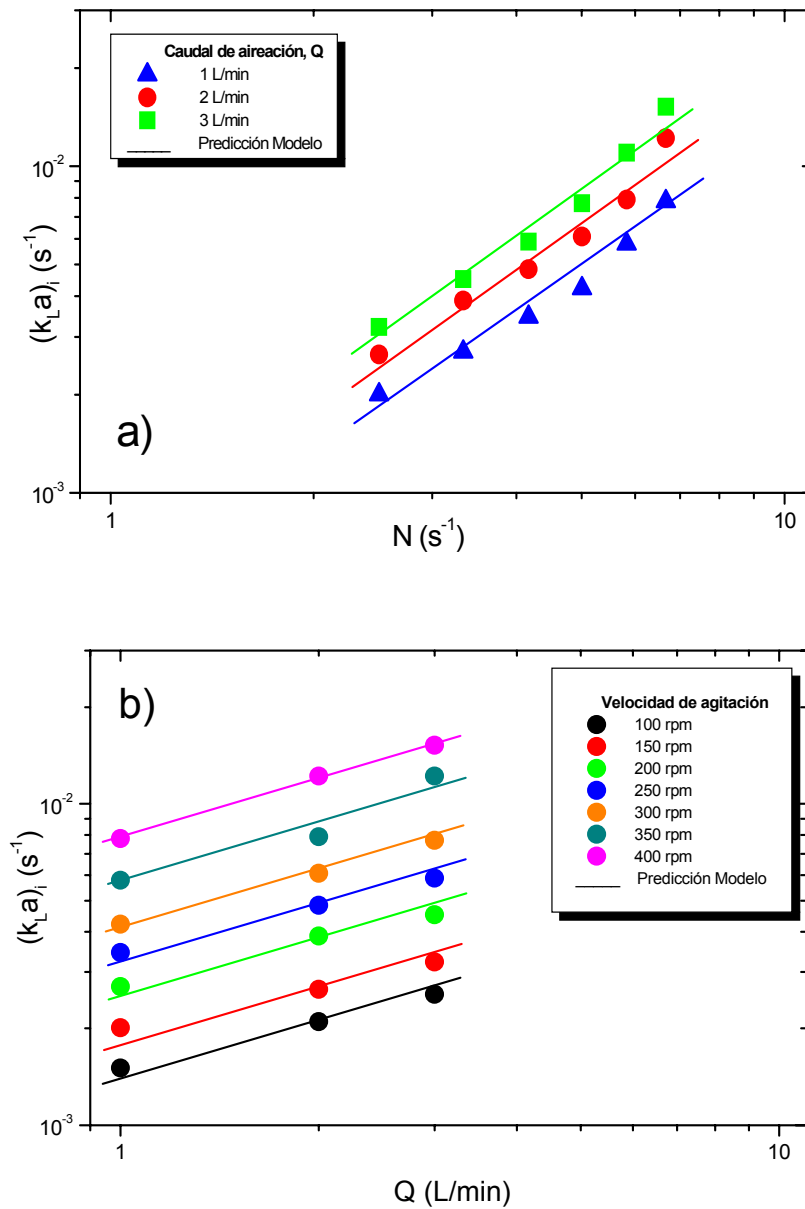
**Tabla 3.28.** Medidas experimentales de  $k_La$  obtenidas por la técnica dinámica en el medio de crecimiento, en ausencia de microorganismo.

$N$ (rpm)	$Q$ (L/min)	$(k_{LA})_i \cdot 10^3$ (s <sup>-1</sup> )
100	1	1,51
100	2	2,10
100	3	2,56
150	1	2,01
150	2	2,65
150	3	3,22
200	1	2,70
200	2	3,88
200	3	4,52
250	1	3,45
250	2	4,84
250	3	5,87
300	1	4,22
300	2	6,09
300	3	7,70
350	1	5,78
350	2	7,90
350	3	12,2
400	1	7,80
400	2	12,2
400	3	15,2

Por otro lado, se ha aplicado el modelo teórico propuesto por García-Ochoa y Gómez (2004) y se ha realizado la predicción teórica del coeficiente de transporte,  $k_L$  y del área interfacial específica,  $a$ , para lo que se han utilizado los parámetros y las propiedades físicas del sistema que se resumen en la Tabla 3.29. En la Figura 3.33 se muestran los resultados obtenidos por simulación para las mismas condiciones empleadas que en la medida experimental de  $(k_L a)_i$  mediante el método dinámico. En ambos casos se aprecia que el coeficiente volumétrico de transporte aumenta al aumentar la velocidad de agitación y al aumentar el caudal de aireación, y lo hace en los dos casos según una función de tipo potencial; lo mismo se observaba en los valores experimentales obtenidos mediante la técnica dinámica. Además, se aprecia que los datos experimentales obtenidos por el método dinámico se ajustan muy bien a los valores predichos por el modelo teórico propuesto, por lo que se puede decir que este modelo es capaz de predecir el valor de  $k_L a$  en un medio inerte, en ausencia de biotransformación

**Tabla 3.29.** Parámetros utilizados en la predicción de  $k_L$  y  $a$ .

$D_L$ (m <sup>2</sup> /s)	$2 \cdot 10^{-9}$
$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	1000
$w$ (m)	0,03
$b$ (m)	0,01
$N^\circ$ agitadores	2
$N_p$	9,4
$\sigma$ (N/m)	0,05
$k$	$2 \cdot 10^{-3}$
$n$	1



**Figura 3.33.** Datos experimentales de  $k_{La}$  sin microorganismo para distintas velocidades de agitación y distintos caudales de aireación, obtenidos por la técnica dinámica en el medio de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8.

- a) respecto a la velocidad de agitación
- b) respecto al caudal de aireación



En **presencia de microorganismo**, se han realizado medidas de la velocidad de consumo de oxígeno ( $OUR$ ) y del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $(k_La)_{mo}$  por la técnica dinámica durante el crecimiento. En las Tablas 3.30 a 3.33 se recogen los datos experimentales de  $OUR$  (velocidad de consumo de oxígeno), obtenidos utilizando diferentes condiciones de agitación, y con un caudal de aireación de 1 L/min. Los datos experimentales de  $k_La$  se muestran en la Tabla 3.34, en la que también se indican las condiciones de velocidades de agitación y caudal de aireación utilizados y la concentración de biomasa correspondiente.

Como se puede observar en las Tablas 3.30 a 3.33, los valores de  $OUR$  aumentan en las primeras horas durante el crecimiento del microorganismo, hasta alcanzar un valor máximo, a partir del cual, disminuyen, como ya se comentó anteriormente, debido a la disminución de la demanda de oxígeno al final de la fase exponencial. Se han ajustado los datos experimentales de  $OUR$  vs.  $C_X$  a la ecuación [3.14], en simple respuesta, obteniendo los parámetros  $m_{O_2}$  e  $Y_{OX}$ , correspondientes al consumo de oxígeno para el mantenimiento y para el crecimiento del microorganismo, respectivamente. Dichos valores, junto con los parámetros estadísticos resultantes del ajuste y tabulados para un nivel de confianza del 95%, se recogen en la Tabla 3.35. Como se puede deducir de dicha tabla, el valor de  $m_{O_2}$  es constante independientemente de la velocidad de agitación, mientras que el rendimiento macroscópico,  $Y_{OX}$  presenta valores diferentes dependiendo de la velocidad de agitación empleada.

**Tabla 3.30.** Datos experimentales de *OUR* obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **150 rpm** mediante la técnica dinámica.

$t_G$ (h)	$C_X$ (g/L)	$OUR \cdot 10^7$ (mol/L·s)
0	0,15	2,81
2,3	0,24	3,14
3,2	0,28	3,00
6,0	0,43	4,03
8,25	0,60	4,44
27,0	1,43	4,78

**Tabla 3.31.** Datos experimentales de *OUR* obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **250 rpm** mediante la técnica dinámica.

$t_G$ (h)	$C_X$ (g/L)	$OUR \cdot 10^7$ (mol/L·s)
0	0,15	2,03
3,0	0,26	3,16
5,0	0,36	3,92
7,0	0,57	5,92
10,0	0,80	6,65
15,0	1,20	6,29
18,5	1,50	5,34
23,5	1,63	5,23

**Tabla 3.32.** Datos experimentales de *OUR* obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **400 rpm** mediante la técnica dinámica.

$t_G$ (h)	$C_X$ (g/L)	$OUR \cdot 10^7$ (mol/L·s)
0	0,15	2,18
5,5	0,36	4,08
6,6	0,48	5,04
10,0	0,80	6,96
12,5	1,12	7,06
16,0	1,43	5,81
20,0	1,67	4,66
24,0	1,75	4,70
28,5	1,77	5,23

**Tabla 3.33.** Datos experimentales de *OUR* obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **550 rpm** mediante la técnica dinámica.

$t_G$ (h)	$C_X$ (g/L)	$OUR \cdot 10^7$ (mol/L·s)
0	0,15	9,47
3,5	0,28	1,06
6,2	0,45	1,20
10,0	0,80	2,20
15,0	1,20	2,34
20,0	1,55	1,96
22,5	1,60	1,86
24,5	1,64	1,32
30,0	1,70	1,22

**Tabla 3.34.** Medidas experimentales de  $k_La$  obtenidas por la técnica dinámica en el medio de crecimiento, en presencia de microorganismo.

$N$ (rpm)	$Q$ (L/min)	$C_x$ (g/L)	$(k_La)_{mo} \cdot 10^3$ (s <sup>-1</sup> )
100	1	0,12	1,40
100	1	0,13	1,50
100	1	0,44	1,31
100	2	0,09	2,42
100	2	0,11	2,50
100	2	0,11	2,44
100	2	0,32	3,03
100	2	0,90	2,65
100	2	0,97	3,59
100	3	0,35	3,52
100	3	0,13	2,54
100	3	0,15	2,95
100	3	1,10	5,41
150	3	0,35	3,76
200	1	0,15	2,26
200	1	0,40	2,44
200	1	0,51	4,10
200	2	0,10	2,63
200	2	0,37	2,03
200	2	0,40	3,45
200	2	0,94	3,53
200	2	1,00	6,20
200	3	0,35	4,55
200	3	1,10	8,74
250	1	1,02	1,34
250	1,5	0,97	2,27
300	1	0,39	2,72
300	1	1,50	5,21

**Tabla 3.34. (continuación).** Medidas experimentales de  $k_La$  obtenidas por la técnica dinámica en el medio de crecimiento, en presencia de microorganismo.

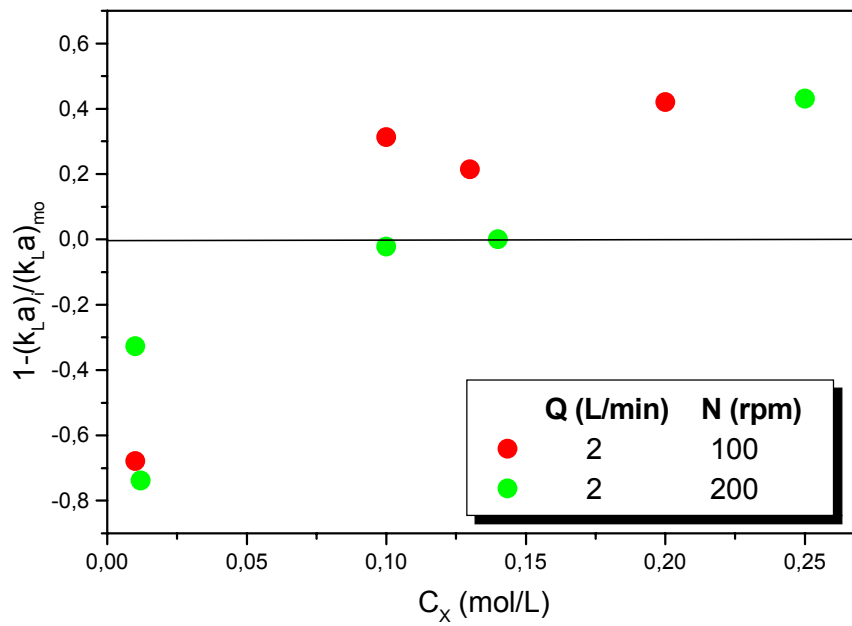
$N$ (rpm)	$Q$ (L/min)	$C_x$ (g/L)	$(k_La)_{mo} \cdot 10^3$ (s <sup>-1</sup> )
300	2	0,11	3,48
300	2	0,97	5,32
300	2	1,50	6,21
300	3	1,60	3,84
300	4	1,75	4,38
400	1	0,25	4,77
400	1	2,78	5,88
400	2	0,27	6,33
400	2	2,78	8,18
400	3	0,29	7,03
500	1	1,81	5,05
500	2	1,81	6,13
500	3	1,81	6,39

**Tabla 3.35.** Parámetros obtenidos del ajuste de los valores de  $(OUR)_d$  a la ecuación [3.14] en simple respuesta y valores de los parámetros estadísticos tabulados para un nivel de confianza del 95%.

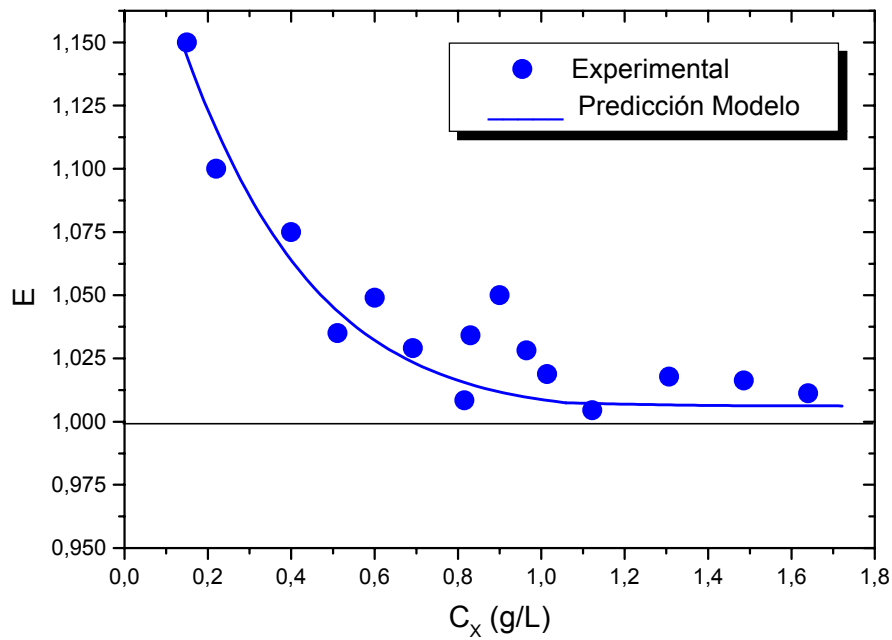
<b>N (rpm)</b>		<b>150</b>	<b>250</b>	<b>400</b>	<b>550</b>
<b><math>m_{O_2}</math> (mol/L·s)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	$2,30 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,45 \cdot 10^{-7}$	$2,28 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,36 \cdot 10^{-7}$	$2,34 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,25 \cdot 10^{-7}$	$2,05 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,31 \cdot 10^{-7}$
	<b>t de Student</b>	86,5	97,8	123,5	113,6
<b><math>Y_{Ox}</math> (mol O<sub>2</sub>/gX)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	0,019 $\pm 0,006$	0,016 $\pm 0,002$	0,020 $\pm 0,0015$	0,023 $\pm 0,002$
	<b>t de Student</b>	36,2	49,23	102,9	55,63
<b>F de Fischer</b>		1296	12593	5604	6596
<b>SRC</b>		$1,16 \cdot 10^{-11}$	$1,77 \cdot 10^{-10}$	$5,64 \cdot 10^{-9}$	$2,36 \cdot 10^{-10}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,17	2,18	2,23	2,20
	<b>F de Fischer</b>	3,49	3,49	3,71	3,49

En cuanto a los valores de  $(k_La)_{mo}$ , en la Tabla 3.34 se muestran los valores experimentales del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en presencia de biotransformación, y se observa que, en el caso de que el microorganismo esté presente en el medio, dicho coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se ve influido por éste, y no solamente por la velocidad de agitación y el caudal de aireación. Así, para unas mismas condiciones de agitación y caudal de aireación, se obtienen valores distintos de  $(k_La)_{mo}$  dependiendo de la concentración de biomasa que haya en el medio. Esto es debido a que, como ya se ha comentado anteriormente, se produce un aumento en la transferencia de oxígeno debido al consumo de éste por parte del microorganismo. Esto queda reflejado en la Figura 3.34, donde se ha representado  $1 - (k_La)_i / (k_La)_{mo}$  vs.  $C_X$ , para un caudal de aireación de 2 L/min, y velocidades de agitación de 100 y 200 rpm. En dicha figura se observa que la diferencia entre el coeficiente volumétrico de transporte en presencia y en ausencia de microorganismo en el medio de crecimiento aumenta en la medida que aumenta la concentración de biomasa, y además, los valores de  $k_La$  en presencia de microorganismo son mayores que sus correspondientes en ausencia de microorganismo, indicando que existe un de aumento de la transferencia de oxígeno debido a la presencia de biotransformación.

De estos valores es posible deducir la necesidad de un factor de aumento que tenga en cuenta este aumento del transporte de oxígeno en el medio cuando se produce biotransformación. Este factor de aumento,  $E$ , se ha calculado experimentalmente como el cociente entre los valores de  $(k_La)_{mo}$  y  $(k_La)_i$  y teóricamente mediante el modelo propuesto por García-Ochoa y Gómez (2005). Los valores obtenidos en ambos casos para diferentes valores de  $C_X$  se pueden ver representados en la Figura 3.35, observándose que en todos los casos el factor de aumento es mayor que 1, lo que indica que el transporte de oxígeno en el medio se incrementa por el consumo del microorganismo. Además, se observan valores más altos para concentraciones de biomasa pequeñas debido a un mayor consumo específico de oxígeno en ese caso. En esta figura queda reflejado que el modelo teórico es capaz de predecir el aumento del transporte de oxígeno observado debido a la presencia del microorganismo *R. erythropolis* IGTS8 en el medio.



**Figura 3.34.** Representación gráfica de los datos experimentales de  $k_L a$  sin microorganismo y con microorganismo, en función de la concentración de biomasa.



**Figura 3.35.** Valores de  $E$  obtenidos experimentalmente a partir de los valores de  $k_L a$  obtenidos mediante el método dinámico y predichos por el modelo teórico propuesto.



### **3.5.3.2. Proceso de Crecimiento, Consumo y Transporte de Oxígeno**

El estudio del consumo y transporte de oxígeno durante el crecimiento del microorganismo puede ser realizado también a partir de los datos experimentales de concentración de biomasa y oxígeno disuelto obtenidos durante dicho crecimiento. En este caso, no es necesario interrumpir en ningún momento la aireación del caldo y los valores experimentales así obtenidos se han denominado ***medida en proceso***.

Para realizar este estudio, se han llevado a cabo 5 experimentos, en los cuales se ha realizado el crecimiento del microorganismo en biorreactor a diferentes velocidades de agitación (y, por tanto, diferentes condiciones de transporte de oxígeno a través del medio). En todos los casos, el medio de crecimiento utilizado ha sido el optimizado en el apartado 3.2 de la presente Memoria. Los resultados de dichos experimentos, obtenidos como concentración de biomasa, oxígeno disuelto y porcentaje de desulfuración se muestran en las Tablas 3.36 a 3.39.

**Tabla 3.36.** Resultados experimentales obtenidos durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 con una velocidad de agitación de **150 rpm**.

$t_G$ (h)	$C_{O_2}$ (%)	$C_X$ (g/L)	$X_{BDS}$ (%)
0	100	0,15	-
0,1	81,4	-	-
0,37	69,3	-	-
0,87	60,4	-	-
1,5	56	-	-
2,0	45	-	-
2,5	39	0,23	-
3,2	43	0,25	-
5,0	37,5	0,36	-
6,0	28,5	0,44	-
8,25	12,6	0,58	-
9,0	8,3	0,62	-
10,0	0	0,70	0
14,25	0	0,97	14
16,0	0	1,07	-
17,0	0	1,1	32
18,0	0	1,16	-
19,0	0	1,21	40
24,0	0	1,38	60
27,0	0	1,41	-
27,6	0	1,43	70
31,3	0	1,44	72
36,0	0	1,46	-
42,0	0	1,49	46
48,0	0	1,57	34
54,0	0	1,5	-

**Tabla 3.37.** Resultados experimentales obtenidos durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 con una velocidad de agitación de **250 rpm**.

$t_G$ (h)	$C_{O_2}$ (%)	$C_X$ (g/L)	$X_{BDS}$ (%)
0	100	0,2	-
0,25	60	-	-
0,5	56	-	-
1,0	60	-	-
1,25	62	-	-
1,5	60	-	-
2,0	55	-	-
2,5	58	-	-
3,0	62	0,26	-
3,5	60	-	-
4,0	58	-	-
5,0	54	0,36	-
6,0	50	-	-
7,0	43	0,57	-
10,0	38	0,8	0
14,5	14	1,1	12
15,0	65	1,2	-
16,5	71,2	1,3	26
18,5	72,7	1,5	36
23,5	75,5	1,63	65
30,0	75,5	1,7	75
35,0	75,5	1,8	62
39,0	75,4	1,8	53
43,0	75,5	1,7	48
48,0	76,3	1,9	34

**Tabla 3.38.** Resultados experimentales obtenidos durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 con una velocidad de agitación de **400 rpm**.

$t_G$ (h)	$C_{O_2}$ (%)	$C_X$ (g/L)	$X_{BDS}$ (%)
0	100	0,15	-
0,25	90,1	-	-
0,5	90,4	-	-
0,75	89,3	-	-
1,0	86,9	-	-
1,25	86,1	-	-
1,5	85,2	-	-
1,75	84,6	-	-
2,0	84,2	-	-
2,25	84,1	-	-
2,5	84,1	-	-
2,75	84,1	0,21	-
3,5	83,7	-	-
4,0	83,4	-	-
5,5	82,5	0,36	0
6,6	79	0,48	-
10,0	76	0,8	-
12,5	72	1,12	0
16,0	66	1,43	0
18,8	62	1,52	20
20,0	60,8	1,67	38
21,5	60	1,70	54
22,7	80	1,72	64
24,0	83,6	1,75	75
28,5	87,2	1,77	84
32,0	85,7	1,76	77
37,0	86,2	1,77	75
43,0	86,8	1,77	72
49,0	87,9	1,78	71

**Tabla 3.39.** Resultados experimentales obtenidos durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 con una velocidad de agitación de **550 rpm**.

$t_G$ (h)	$C_{O_2}$ (%)	$C_X$ (g/L)	$X_{BDS}$ (%)
0	100	0,2	-
0,25	60	-	-
0,5	56	-	-
1,0	60	-	-
1,25	62	-	-
1,5	60	-	-
2,0	55	-	-
2,5	58	-	-
3,0	62	0,26	-
3,5	60	-	-
4,0	58	-	-
5,0	54	0,36	-
6,0	50	-	-
7,0	43	0,57	-
10,0	38	0,8	0
14,5	14	1,1	12
15,0	65	1,2	-
16,5	71,2	1,3	26
18,5	72,7	1,5	36
23,5	75,5	1,63	65
30,0	75,5	1,7	75
35,0	75,5	1,8	62
35,0	75,5	1,8	62
40,0	76,5	1,78	46
47,0	88,5	1,77	42

Durante el crecimiento del microorganismo, el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno se encuentra influenciado por la presencia de microorganismo. El valor de dicho coeficiente durante el proceso de crecimiento,  $(k_La)_p$  debe ser igual al coeficiente volumétrico global de transferencia de materia  $K_La$ , definido en el modelo teórico propuesto por García-Ochoa y Gómez (2005), cuyo valor se puede calcular mediante la ecuación [3.62] a través del factor de aumento,  $E$ . En las Tablas 3.40 a 3.43 se recogen los valores de  $(k_La)_p$  obtenidos de esta manera para las condiciones empleadas en los experimentos llevados a cabo.

La determinación experimental de la velocidad de consumo de oxígeno en proceso,  $(OUR)_p$ , se ha llevado a cabo a partir de la ecuación [3.15], utilizando la variación de concentración de oxígeno disuelto o perfil de oxígeno, obtenido a lo largo del tiempo durante el crecimiento del microorganismo. Debido a la presencia de microorganismo, la ecuación [3.15] se traduce en la ecuación [3.63], resultante de sustituir el coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $k_La$ , por su correspondiente en presencia de microorganismo,  $E \cdot k_La$ , es decir:

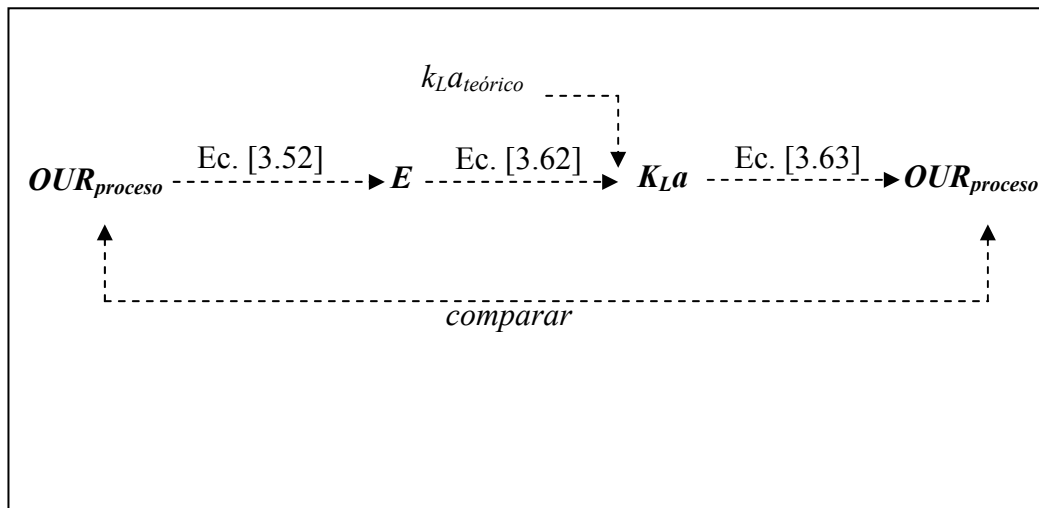
$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = E \cdot k_La \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - OUR \quad [3.63]$$

De la ecuación [3.63] se deduce que, conociendo el perfil de oxígeno a lo largo del tiempo y el término  $E \cdot k_La \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})$ , que corresponde a la velocidad de transporte de oxígeno, se puede calcular la velocidad de consumo de oxígeno en proceso:

$$(OUR)_p = E \cdot k_La \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad [3.64]$$

En las Tablas 3.40 a 3.43, se recogen los datos obtenidos de las velocidades de consumo de oxígeno utilizando los datos del perfil de concentración de oxígeno,  $(OUR)_p$ , junto con los valores de  $(k_La)_p$ , como se ha comentado anteriormente. Hay que tener en cuenta que el valor de  $(OUR)_p$  se encuentra influenciado por el factor de aumento, y éste, a su vez, se calcula a

partir del valor de la velocidad de consumo de oxígeno. Así, es necesario realizar un proceso de iteración, cuyos pasos a seguir se esquematizan en la Figura 3.36. Sin embargo, los valores de  $E$  calculados de esta manera no difieren significativamente de los ya calculados anteriormente y mostrados en el apartado 3.5.3.1 de esta Memoria.



**Figura 3.36.** Procedimiento de tanteo utilizado para el cálculo de  $OUR$  en proceso y de  $K_La$ , en los experimentos de crecimiento del microorganismo realizados a diferentes velocidades de agitación.

**Tabla 3.40.** Valores calculados de  $(k_La)_p$  y  $(OUR)_p$  obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **150 rpm** a partir del perfil de oxígeno.

$t$ (h)	$(k_La)_p \cdot 10^3$ ( $s^{-1}$ )	$(OUR)_p \cdot 10^4$ ( $mol/m^3 \cdot s$ )
0	1,320	0,565
2,5	1,268	1,35
3,2	1,256	1,52
5	1,241	1,89
6	1,232	2,06
8,25	1,220	2,33
9	1,219	2,40
14,25	1,208	2,57
16	1,206	2,53
17	1,206	2,50
18	1,205	2,45
19	1,204	2,40
24	1,203	2,12
27	1,202	1,97



**Tabla 3.41.** Valores calculados de  $(k_{LA})_p$  y  $(OUR)_p$  obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **250 rpm** a partir del perfil de oxígeno.

$t$ (h)	$(k_{LA})_p \cdot 10^3$ ( $s^{-1}$ )	$(OUR)_p \cdot 10^4$ ( $mol/m^3 \cdot s$ )
0	4,52	0,021
5	4,21	5,29
10	4,08	7,02
14,5	4,05	6,77
18,5	4,04	5,72
24	4,03	3,93
30	4,03	2,99

**Tabla 3.42.** Valores calculados de  $(k_{LA})_p$  y  $(OUR)_p$  obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **400 rpm** a partir del perfil de oxígeno.

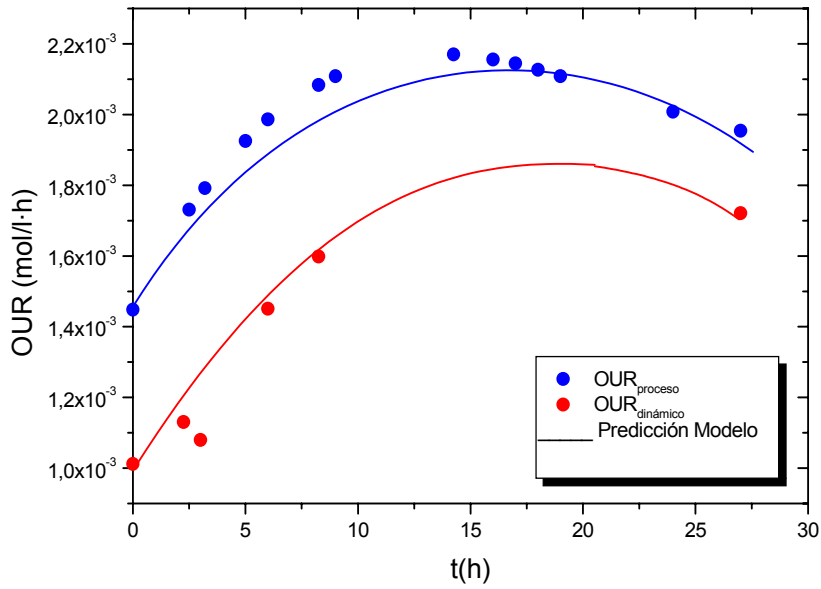
$t$ (h)	$(k_{LA})_p \cdot 10^2$ ( $s^{-1}$ )	$(OUR)_p \cdot 10^4$ ( $mol/m^3 \cdot s$ )
0	1,45	0,173
5,5	1,31	8,38
10	1,25	11,8
12,5	1,24	12,8
15,8	1,23	13,0
18,8	1,23	12,2
21,5	1,22	10,6
22,7	1,22	9,72
24	1,22	8,56
29	1,22	2,53

**Tabla 3.43.** Valores calculados de  $(k_{La})_p$  y  $(OUR)_p$  obtenidos durante el crecimiento del microorganismo llevado a cabo a **550 rpm** a partir del perfil de oxígeno.

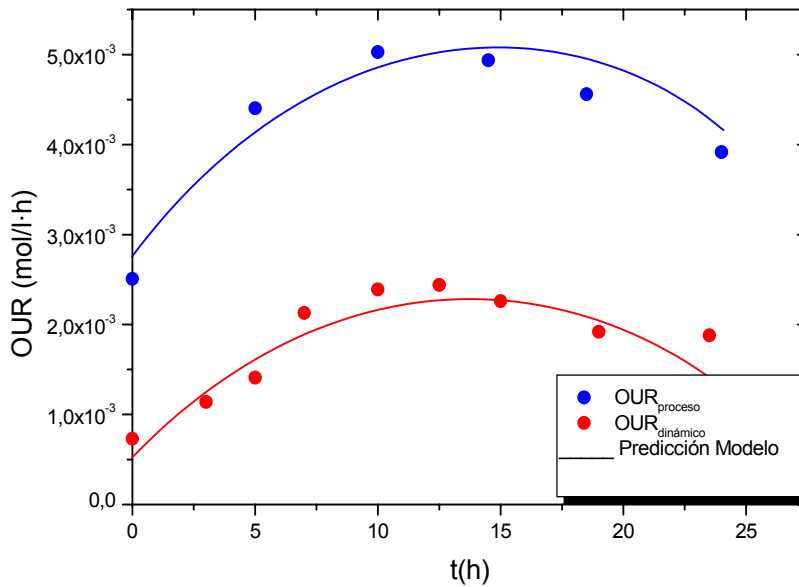
$t$ (h)	$(k_{La})_p \cdot 10^2$ ( $s^{-1}$ )	$(OUR)_p \cdot 10^4$ ( $mol/m^3 \cdot s$ )
0	3,75	4,21
3,5	3,21	8,41
6,2	2,98	10,4
10	2,83	12,2
15	2,75	13,2
20	2,71	12,9
22,5	2,71	12,3
24,5	2,70	11,6
30	2,69	9,27

Como se puede observar en las Tablas 3.40 a 3.43, el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno en el proceso, calculado por predicción con modelo teórico propuesto,  $(k_La)_p$  varía a lo largo del crecimiento debido al aumento de la concentración de biomasa, siendo mayor en las primeras horas del crecimiento, ya que el consumo específico de oxígeno es mayor, como quedó patente con anterioridad al representar el factor de aumento con la concentración de biomasa en la Figura 3.35. En cuanto a la velocidad de consumo de oxígeno en el proceso,  $(OUR)_p$  se observa la misma tendencia que en el caso de su obtención mediante el método dinámico, aumentando durante la fase de latencia y exponencial de crecimiento hasta un valor máximo aproximadamente a la mitad de la fase exponencial, y una disminución posterior debido a una disminución de la demanda de oxígeno. En las Figuras 3.36 a 3.39 se recogen, de forma comparativa, los valores obtenidos de la velocidad de consumo de oxígeno ( $OUR$ ) a partir de los dos métodos empleados (método dinámico y medida en proceso) en el presente trabajo para todos los experimentos realizados. En todas ellas se puede observar que los valores obtenidos a partir del método dinámico son menores que aquellos que se han obtenido del cálculo a partir del perfil de oxígeno (o del proceso, como también se ha denominado).

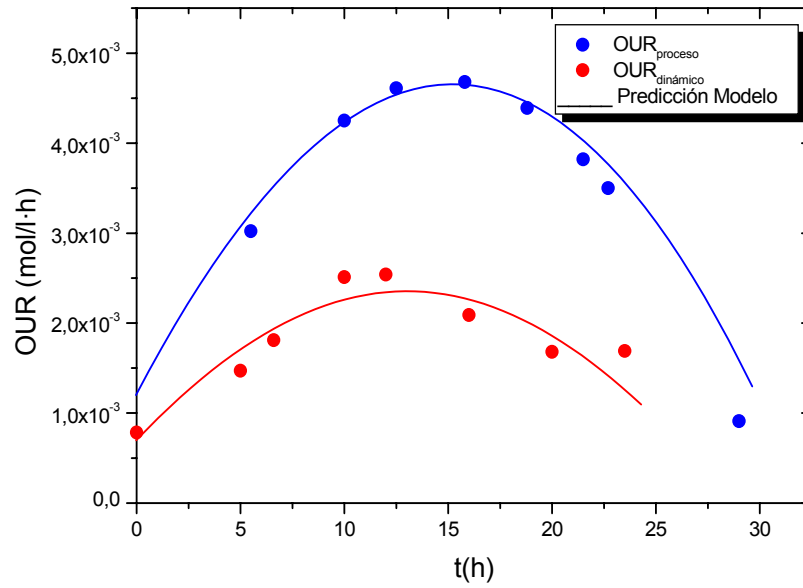
En la Figura 3.40 y en la Tabla 3.44 se recogen los parámetros  $m_{O_2}$  e  $Y_{O_X}$  obtenidos del ajuste a la ecuación [3.14] para los distintos experimentos y para ambos valores de  $OUR$ . En la citada figura queda patente que, mientras que los valores obtenidos por ambos métodos y para todos los experimentos en el caso de  $m_{O_2}$  son los mismos, no sucede así en los valores obtenidos para  $Y_{O_X}$ . Los valores de este parámetro obtenidos a partir del perfil de oxígeno, son, en todos los casos, superiores a los correspondientes al método dinámico, por lo que el mayor consumo de oxígeno identificado en este último caso parece estar relacionado con el desarrollo de la capacidad desulfurante durante el crecimiento.



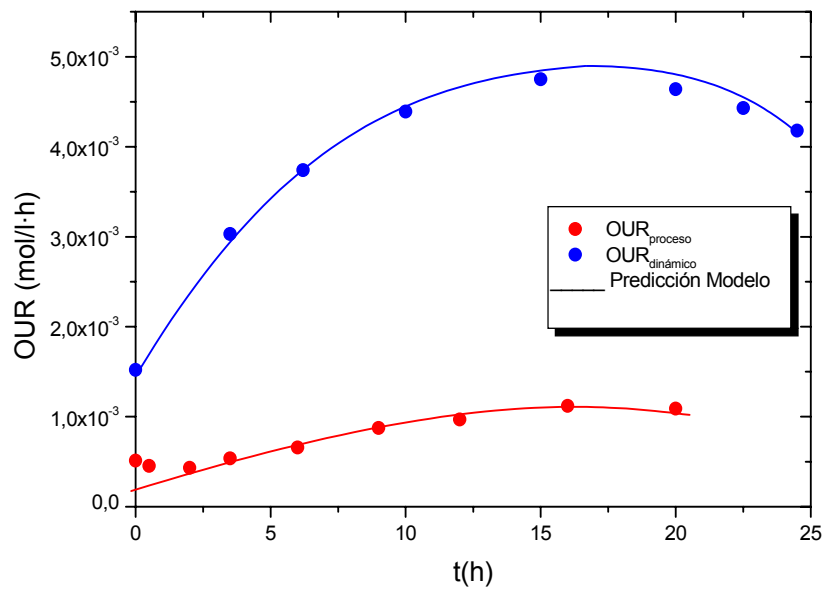
**Figura 3.36.** Comparación de los valores de *OUR* obtenidos en el experimento realizado a **150 rpm** mediante el método dinámico y a partir del perfil de oxígeno durante el crecimiento.



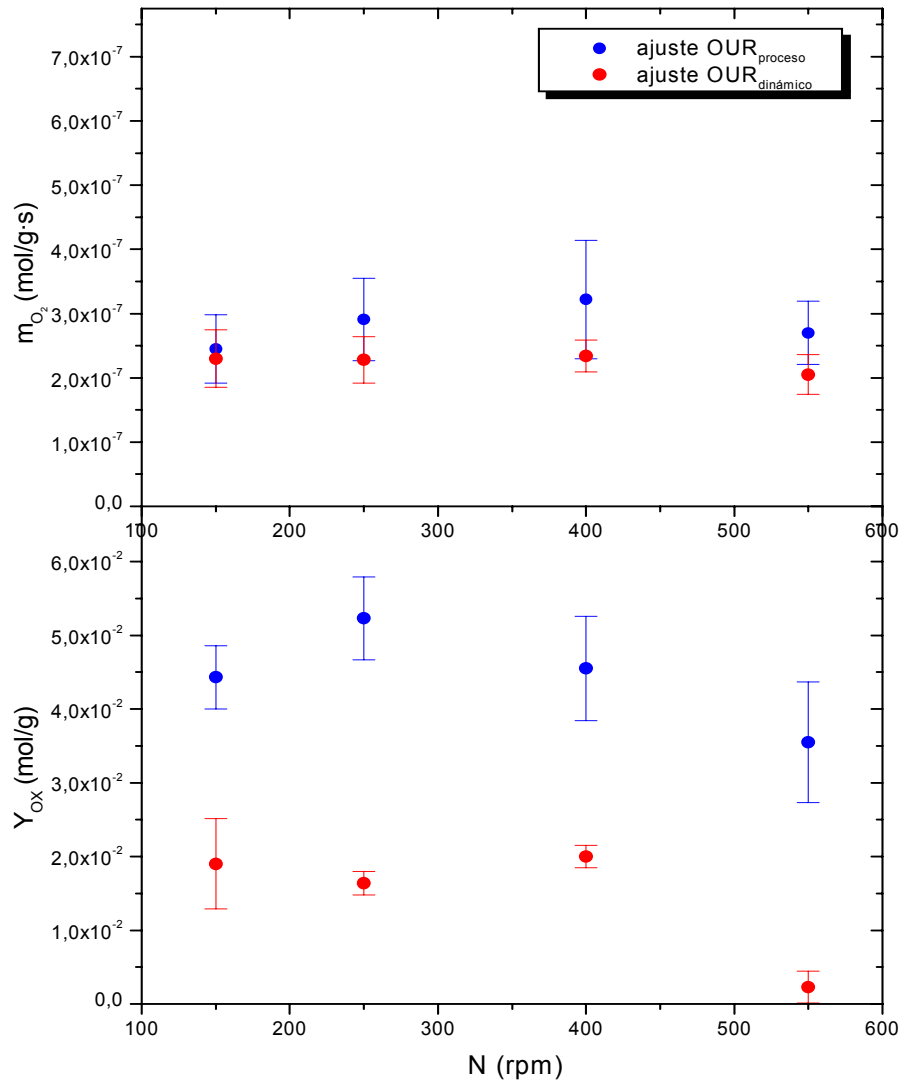
**Figura 3.37.** Comparación de los valores de *OUR* obtenidos en el experimento realizado a **250 rpm** mediante el método dinámico y a partir del perfil de oxígeno durante el crecimiento.



**Figura 3.38.** Comparación de los valores de *OUR* obtenidos en el experimento realizado a **400 rpm** mediante el método dinámico y a partir del perfil de oxígeno durante el crecimiento.



**Figura 3.39.** Comparación de los valores de *OUR* obtenidos en el experimento realizado a **550 rpm** mediante el método dinámico y a partir del perfil de oxígeno durante el crecimiento.



**Figura 3.40.** Comparación de los parámetros  $m_{o_2}$  e  $Y_{ox}$  obtenidos por ajuste mediante regresión no lineal en simple respuesta de los valores experimentales de  $OUR_{dinámico}$  y  $OUR_{proceso}$ .

**Tabla 3.44.** Parámetros obtenidos del ajuste de los valores de  $(OUR)_p$  a la ecuación [3.13] en simple respuesta y valores de los parámetros estadísticos tabulados para un nivel de confianza del 95%.

<b>N (rpm)</b>		<b>150</b>	<b>250</b>	<b>400</b>	<b>550</b>
<b><math>m_{O_2}</math> (mol/L·s)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	$2,45 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,53 \cdot 10^{-7}$	$2,91 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,64 \cdot 10^{-7}$	$3,22 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,92 \cdot 10^{-7}$	$2,70 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,49 \cdot 10^{-7}$
	<b>t de Student</b>	48,3	54,2	42,3	73,6
<b><math>Y_{Ox}</math> (mol O<sub>2</sub>/gX)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	0,044 $\pm 0,004$	0,052 $\pm 0,006$	0,046 $\pm 0,007$	0,036 $\pm 0,008$
	<b>t de Student</b>	27,9	29,3	21,9	17,3
<b>F de Fischer</b>		1156	9564	4589	5135
<b>SRC</b>		$3,57 \cdot 10^{-11}$	$4,23 \cdot 10^{-10}$	$8,15 \cdot 10^{-9}$	$5,12 \cdot 10^{-10}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,20	2,23	2,18	2,20
	<b>F de Fischer</b>	3,49	3,71	3,35	3,49

Esta observación puede explicarse por el hecho de que, al medir experimentalmente la velocidad de consumo de oxígeno mediante la técnica dinámica,  $(OUR)_d$ , deteniéndose la entrada de oxígeno en el sistema durante un corto período de tiempo, el microorganismo se encuentra en una situación extraña, en la que nota un descenso muy acusado del oxígeno, dejando de comportarse de forma “normal”, y entra en una situación de *stress*. Por el principio de *Economía Celular*, un microorganismo utiliza su energía en realizar las funciones más primarias, como son el crecimiento y el mantenimiento. Sin embargo, ante esta situación de *stress* a la que se ve sometido, el microorganismo deja de realizar actividades secundarias de su metabolismo. Esto explica el hecho de que la velocidad de consumo de oxígeno es menor cuando se lleva a cabo la técnica dinámica de medida que cuando se calcula mediante la evolución de oxígeno disuelto durante el crecimiento. En este caso, el consumo de oxígeno se destina no sólo al mantenimiento y crecimiento, sino que hay que tener en cuenta el consumo de oxígeno debido a la producción, en este caso de la capacidad desulfurante. Por tanto en la ecuación [3.14] se debe tener en cuenta ese consumo adicional de oxígeno debido a la producción de capacidad desulfurante,  $(OUR)_x$  obteniendo entonces la ecuación:

$$OUR_p = OUR_d + OUR_x = m_{O_2} C_x + Y_{OX} \frac{dC_x}{dt} + Y_{OBDS} \frac{dX_{BDS}}{dt} \quad [3.65]$$

donde  $Y_{OBDS}$  se define como rendimiento de oxígeno en capacidad desulfurante.

Como ya se ha comentado anteriormente en el apartado 3.4.2 de esta Memoria, la capacidad de desulfuración se ha considerado como un producto parcialmente asociado al crecimiento, aumentando a partir de un cierto tiempo de crecimiento y disminuyendo a partir de la fase estacionaria, lo cual se explica a través de los parámetros del modelo  $\alpha$  y  $\beta$ . Éste último parámetro, sin embargo, no debe ser considerado en la expresión que describe la velocidad de consumo de oxígeno, ya que la pérdida de capacidad desulfurante ocurre sin que exista variación en la concentración de biomasa ni en la concentración de oxígeno disuelto. Por lo tanto, la expresión que describe  $(OUR)_p$ , se puede simplificar de la siguiente manera:



$$(OUR)_p = m_{O_2}C_x + Y_{OX} \frac{dCx}{dt} + Y_{OBDS} \cdot \left( \alpha \frac{dCx}{dt} \right) \quad [3.66]$$

de donde se obtiene que:

$$(OUR)_p = m_{O_2}C_x + (Y_{OX} + Y_{OBDS} \cdot \alpha) \frac{dCx}{dt} \quad [3.67]$$

Por lo tanto, la evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el crecimiento del microorganismo, queda descrita por la ecuación [3.68]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - m_{O_2}C_x - (Y_{OX} + Y_{OBDS} \cdot \alpha) \frac{dCx}{dt} \quad [3.68]$$

Para obtener el parámetro  $\alpha$ , necesario para describir la evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el crecimiento, se ha aplicado el modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante, propuesto en el apartado 3.4.2 de esta Memoria y se han ajustado por regresión no lineal en simple respuesta, los datos experimentales de porcentaje de desulfuración. Se han obtenido parámetros cinéticos y estadísticos, que se recogen en la Tabla 3.44. Como se puede observar en dicha tabla, en todos los casos, los parámetros estadísticos obtenidos son significativos para el nivel de confianza impuesto. También se puede observar que se obtienen valores muy parecidos de  $\alpha$  en todos los experimentos realizados.

Se han ajustado los valores experimentales de  $(OUR)_p$  a la ecuación [3.66] mediante regresión no lineal en simple respuesta, utilizando los valores de  $\alpha$  calculados anteriormente y mostrados en la Tabla 3.45, y fijando los parámetros  $m_{O_2}$  e  $Y_{OX}$  obtenidos del ajuste de los valores de  $(OUR)_d$  a la ecuación [3.14], de forma que la única respuesta que se calcula es  $Y_{OBDS}$ . Los valores obtenidos de este parámetro se resumen en la Tabla 3.46, junto con los parámetros estadísticos y los valores tabulados de t de Student y F de Fischer para un nivel de confianza del 95%. En dicha Tabla se puede observar que los parámetros calculados tienen significado estadístico para un nivel de confianza del 95%. En cuanto al valor del

parámetro  $m_{O_2}$ , el modelo predice que el consumo de oxígeno debido al mantenimiento del microorganismo, permanece constante independientemente de las condiciones de transporte durante el crecimiento, así como el parámetro  $Y_{OX}$ , correspondiente al rendimiento de oxígeno en biomasa, mientras que el parámetro  $Y_{OBDS}$ , que describe el rendimiento de oxígeno en capacidad desulfurante, depende de la velocidad de transferencia de oxígeno disuelto, y por tanto, es distinto para cada uno de los experimentos realizados. En este caso, el máximo se encuentra en los experimentos realizados a 250 y 400 rpm, y el valor mínimo se produce cuando se trabaja a 550 rpm, indicando que el consumo de oxígeno destinado al desarrollo de la capacidad desulfurante del microorganismo durante el crecimiento es mayor al utilizar velocidades de agitación entre 250 y 400 rpm, lo cual está de acuerdo con los datos experimentales de concentración de oxígeno disuelto y porcentaje de desulfuración, que muestran que cuando se emplean velocidades de agitación de 250 y 400 rpm, la capacidad desulfurante es alta, mientras que la concentración de oxígeno disuelto en el medio no disminuye por debajo del 20%. Sin embargo, a 150 rpm, la concentración de oxígeno disuelto llega a hacerse cero durante la fase exponencial de crecimiento, y desarrolla la misma capacidad desulfurante que en los casos anteriores, de forma que el rendimiento en capacidad desulfurante es menor. Al trabajar a 550 rpm, la capacidad desulfurante desarrollada es muy pequeña, por lo que también el  $Y_{OBDS}$  es mínimo.

En las Figuras 3.36 a 3.39 se muestran los valores de  $OUR$  predichos por el modelo en el caso de calcular dicha velocidad de consumo de oxígeno empleando el método dinámico y empleando la medida en proceso, observándose en ambos casos que el ajuste es muy bueno y, por tanto, que el modelo es capaz de predecir muy bien los valores experimentales.

En la Figura 3.41 se muestra, para los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación, la evolución de la concentración de oxígeno disuelto experimental y la calculada mediante ajuste por regresión a la ecuación [3.68]. En dicha Figura se puede observar que, a medida que se incrementa la velocidad de agitación, aumenta la concentración de oxígeno disuelto debido a un incremento en la velocidad de transporte, y se comprueba que el modelo propuesto es capaz de predecir los valores de concentración de oxígeno disuelto durante el

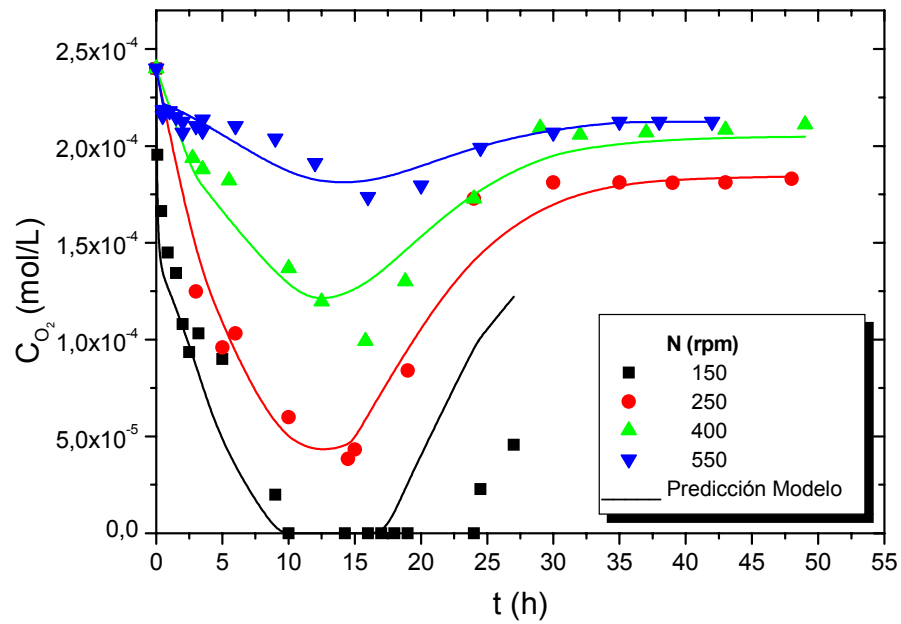
crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 en el intervalo de velocidades de agitación estudiado.

**Tabla 3.45.** Parámetros cinéticos y estadísticos del modelo de desarrollo de la capacidad desulfurante para los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación. El valor tabulado de los parámetros estadísticos es para un nivel de confianza del 95%.

<b>N (rpm)</b>		<b>150</b>	<b>250</b>	<b>400</b>	<b>550</b>
<b><math>\alpha</math></b> (%D·L/g)	<b>Valor del Parámetro</b>	132,2 ±17,2	101,2 ±15,8	101,8 ±14,3	92,64 ±14,2
	<b>t de Student</b>	18,18	14,85	16,08	15,52
<b><math>\beta</math></b> (%D·L/g·h)	<b>Valor del Parámetro</b>	1,29 ±0,41	1,03 ±0,39	0,25 ±0,13	1,13 ±0,42
	<b>t de Student</b>	7,51	6,10	4,17	6,39
<b>F de Fischer</b>		399,9	341,3	605,1	341,9
<b>SRC</b>		$4,2 \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,17	2,18	2,23	2,20
	<b>F de Fischer</b>	3,49	3,49	3,71	3,49

**Tabla 3.46.** Parámetros del modelo y estadísticos obtenidos del ajuste de los valores de  $(OUR)_p$  a la ecuación [3.65]. El valor tabulado de los parámetros estadísticos es para un nivel de confianza del 95%.

<b>N (rpm)</b>		<b>150</b>	<b>250</b>	<b>400</b>	<b>550</b>
<b><math>Y_{OBDS}</math> (mol O<sub>2</sub>/%BDS)</b>	<b>Valor del Parámetro</b>	$3,40 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,43 \cdot 10^{-4}$	$4,18 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,45 \cdot 10^{-4}$	$3,98 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,69 \cdot 10^{-4}$	$1,98 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,52 \cdot 10^{-4}$
	<b>t de Student</b>	30,63	49,23	102,9	55,63
<b>F de Fischer</b>		8491	3658	5604	6596
<b>SRC</b>		$1,16 \cdot 10^{-2}$	$1,77 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	2,17	2,18	2,23	2,20
	<b>F de Fischer</b>	3,49	3,49	3,71	3,49



**Figura 3.41.** Evolución de la concentración de oxígeno disuelto experimental y calculada por el modelo de consumo de oxígeno propuesto, a diferentes velocidades de agitación durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8.

## ***4. ESTUDIO de la BIODESULFURACIÓN de DBT***

#### **4. ESTUDIO de la BIODESULFURACIÓN de DBT**

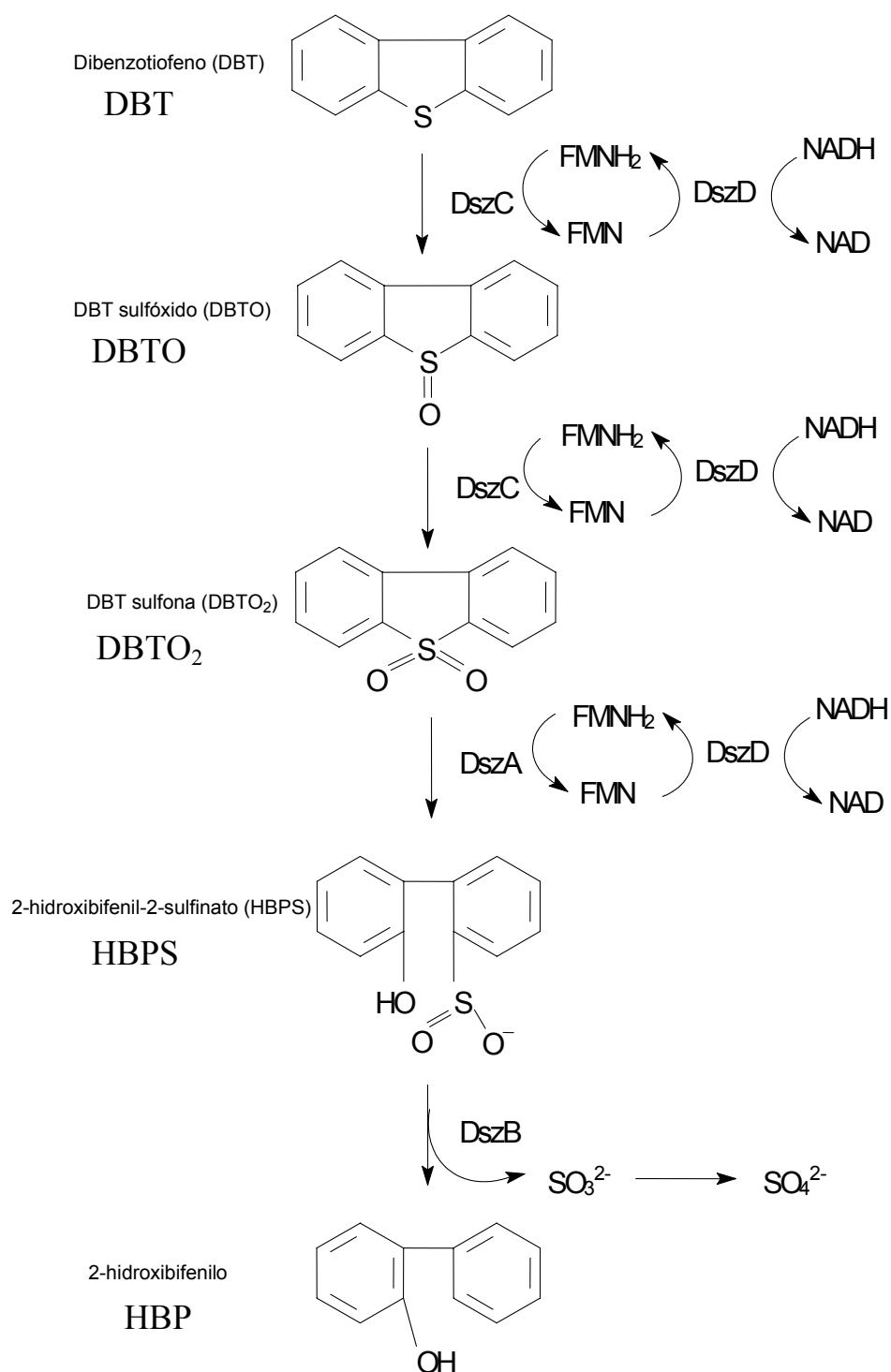
La biodesulfuración de dibenzotiofeno (DBT) mediante el microorganismo *R. erythropolis* IGTS8 es la segunda etapa del desarrollo del proceso estudiado en este trabajo. Como ya se ha comentado anteriormente en el apartado 3 de esta Memoria, un proceso de biodesulfuración está compuesto de dos etapas. La primera de ellas es la producción del biocatalizador o crecimiento del microorganismo elegido para llevar a cabo la eliminación del azufre; esta etapa, en la que debe desarrollar la capacidad desulfurante, ha sido ya estudiada en cuanto al medio de crecimiento y a las condiciones de operación utilizadas durante dicho crecimiento en el apartado anterior, en el que también se ha establecido un modelo cinético para la descripción de la velocidad de crecimiento y de la acumulación de capacidad desulfurante. La segunda etapa es la biodesulfuración en sí, realizada por el microorganismo que ha sido crecido durante la primera etapa en las condiciones óptimas para ello. En esta etapa, el biocatalizador se introduce en un reactor junto con el producto a desulfurar, aire y agua, de forma que los compuestos azufrados se transforman en compuestos sin azufre, y éste se segrega a la fase acuosa. Así, el estudio de esta fase del desarrollo del proceso es clave para la obtención de un proceso de desulfuración óptimo que

sea repetitivo y controlable. En la literatura no se ha encontrado ningún precedente de estudio sistematizado de la influencia de la forma de conservación del microorganismo, ni de la influencia de ciertas variables en esta etapa de biodesulfuración, por lo que dicho estudio se aborda en este apartado. El estudio se ha llevado a cabo utilizando DBT como compuesto modelo por sus características respecto a la dificultad de eliminación. Además, dicho estudio se ha realizado en fase acuosa, como primera aproximación al desarrollo de la citada etapa en un sistema de tres fases (aire, agua y fase orgánica).

Para llevar a cabo la etapa de biodesulfuración por parte del microorganismo, es básico conocer el mecanismo por el cual éste es capaz de eliminar selectivamente el átomo de azufre de la molécula modelo DBT. En la literatura se ha propuesto que se realiza mediante una ruta que se produce en el metabolismo interno del microorganismo *R. erythropolis* IGTS8, llamada ruta 4S (Kilbane, 1992), que consigue metabolizar el DBT en cuatro pasos, transformándolo al final de la ruta en 2-hidroxibifenil (HBP) y sulfito, que es eliminado finalmente al medio.

En la Figura 4.1 se muestra un esquema de la ruta 4S, en el que se puede ver cómo ocurre la eliminación selectiva del átomo de azufre después de cuatro reacciones en serie. Los pasos de esta ruta, como ya se ha comentado, están catalizados por cuatro enzimas: DszC, DszA, DszD y DszB. Las dos primeras en actuar son monooxigenasas y necesitan la presencia de la enzima DszD para catalizar las dos primeras reacciones de la ruta, y la cuarta enzima, la DszB, cataliza la última reacción. Así, se metaboliza el DBT, transformándolo en 2-hidroxibifenilo (HBP) a través de dibenzotiofeno sulfóxido primero (DBTO) y dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>) y ácido 2-hidroxibifenil 2-sulfínico (HBPS) después, y formando sulfito como subproducto (Gray y col., 1996). La última reacción de la ruta parece ser el paso limitante, al ser la más lenta de todas ellas (McFarland y col., 1998; Ohshiro y col., 1999; Pacheco y col., 1999). Estas enzimas se encuentran codificadas por los cuatro genes *dszC*, *dszA*, *dszD* y *dszB*, contenidos en el genoma de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Los genes *dszA*, *dszB* y *dszC* están controlados por un promotor sencillo (Oldfield y





**Figura 4.1.** Ruta 4S de desulfuración de DBT llevada a cabo por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

col., 1997), de forma que la producción de las enzimas que catalizan la ruta 4S se induce por DBT y otros compuestos análogos, mientras que se reprime cuando están presentes sulfato u otros compuestos con azufre en su molécula (Li y col., 1996; Oldfield y col., 1997). Además, se ha observado que el último compuesto de la ruta (HBP), inhibe el crecimiento del microorganismo y la desulfuración (Nekodzuka y col., 1997).

Por otra parte, el oxígeno incorporado en cada uno de estos pasos es también de mucha importancia, ya que es esencial para llevar a cabo la oxidación de DBT hasta HBPS. El oxígeno molecular que actúa como oxidante es activado por las enzimas monooxigenasas DszA y DszC en cada uno de los pasos de la ruta en que actúan, a la vez que la enzima DszD acopla la oxidación de NADH con la reducción de FMN (Gray y col., 1996; Oldfield y col., 1997). Por último, hay que tener en cuenta que el microorganismo, al utilizar esta ruta de desulfuración, consigue mantener intactos todos los enlaces C-C de la molécula de DBT, por lo que es importante destacar que la capacidad calorífica del combustible permanece intacta tras el proceso de biodesulfuración.

Para conseguir que este proceso se produzca en las condiciones óptimas, se debe realizar un estudio de las condiciones de operación empleadas durante la desulfuración. Se debe estudiar, por lo tanto, la forma en que influyen dichas condiciones en la realización de la ruta 4S por parte del microorganismo y, consecuentemente, en la formación de HBP a partir de DBT, es decir, en la capacidad desulfurante del microorganismo. En este trabajo se aborda este estudio empleando diferentes temperaturas y diferentes condiciones de aporte de oxígeno durante el proceso desulfuración, observando su influencia en la capacidad desulfurante y la velocidad de desulfuración de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Tras realizar estudios previos de conservación del biocatalizador antes de ser utilizado como tal y poder realizar experimentos repetitivos, se ha llevado a cabo el estudio de las condiciones de operación durante la etapa de desulfuración de DBT realizada por el microorganismo. Para ello, se ha utilizado un biocatalizador procedente de una primera etapa de crecimiento y se han probado diferentes temperaturas y aireaciones del medio: se han utilizado tres valores

diferentes de temperatura (28, 30 y 32°C) y cuatro condiciones de aporte de oxígeno al medio (se han realizado tres experimentos en fermentador, con aireación a través de un difusor, a velocidades de agitación de 100, 200 y 500 rpm, y un experimento en incubadora orbital a 210 rpm), estudiando su influencia en el desarrollo de la ruta 4S en el microorganismo y, por tanto, en la capacidad desulfurante de éste. Para ello, se han obtenido datos experimentales de las concentraciones de los compuestos de la ruta 4S frente al tiempo, utilizando la forma de operación conocida como *resting cells*.

Finalmente, se ha propuesto un modelo cinético de la biodesulfuración. De este tema no se ha encontrado tampoco ningún precedente en la literatura. Para ello se han obtenido datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S a lo largo del tiempo en un experimento en *resting cells* con biocatalizador procedente de distintas horas de crecimiento. El modelo cinético debe ser capaz de describir la variación de la concentración de los compuestos de la ruta 4S a lo largo del tiempo y a distintas horas de crecimiento del biocatalizador (con distinta capacidad desulfurante). Para llegar a proponer un modelo cinético de la biodesulfuración, se ha utilizado la metodología típica del estudio cinético de las redes de reacciones químicas. Esta metodología comprende distintos pasos que hay que llevar a cabo:

- Estudio estequiométrico del sistema (en este caso, la ruta 4S), la proposición de un esquema de reacción, que en este caso ya ha sido estudiado anteriormente (Gray y col., 1996; Oldfield y col., 1997). El estudio estequiométrico del sistema es muy útil en un sistema de redes de reacciones porque de él se obtiene el número de compuestos clave, el número de relaciones independientes entre los compuestos y la variación de composición del sistema, una vez que se conoce la variación de los compuestos clave.
- Formulación de un modelo cinético combinando el esquema de reacción y las ecuaciones cinéticas de las reacciones que tienen lugar en el sistema.

- Discriminación entre los diferentes modelos que se han propuesto a través del cálculo de los parámetros de cada uno de los modelos. Tras formular el modelo, los parámetros cinéticos se calculan por regresión de los datos experimentales de los compuestos clave, como se ha descrito en el apartado 2.5 de esta Memoria.

Finalmente, se ha realizado una validación del modelo observando los parámetros estadísticos que se obtienen de la regresión y observando si la influencia de las variables en los valores de los parámetros cinéticos del modelo es razonable. De esta forma se obtiene, ajustando por regresión no lineal, la evolución de la concentración de los compuestos clave, y se puede obtener, mediante simulación, la evolución de la concentración de los compuestos no clave.

#### **4.1. ESTUDIOS PREVIOS**

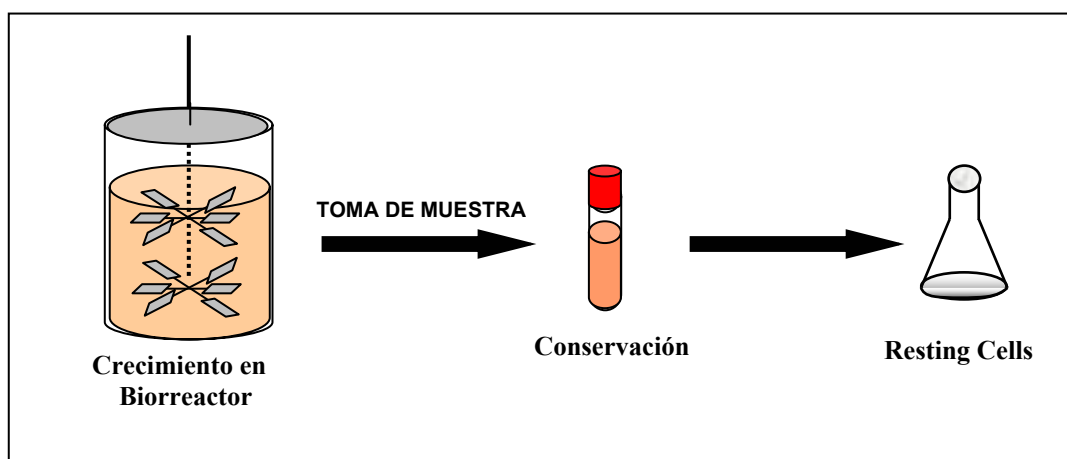
Los estudios previos se han llevado a cabo para obtener un biocatalizador procedente de la primera etapa de crecimiento en condiciones estándar. El método de estandarización que se obtenga de estos estudios previos debe ser capaz de proporcionar resultados comparativos en los experimentos en que se estudia la influencia de las condiciones de operación en la biotransformación de DBT.

El microorganismo debe ser conservado, ya que no existe continuidad entre las dos etapas ya comentadas del desarrollo del proceso, es decir, en primer lugar se obtiene el microorganismo en las condiciones óptimas, y más adelante es utilizado como biocatalizador para llevar a cabo la biotransformación de DBT.

Para realizar este estudio se ha probado la influencia de la temperatura y del medio de conservación del microorganismo en su capacidad desulfurante. Así, una vez crecido el microorganismo, se ha probado conservarlo a  $-18^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$ , y en el caso de mantenerlo a  $-18^{\circ}\text{C}$ , se han probado glicerol al 50% y suero salino al 99% como medios de conservación. Posteriormente, se ha realizado un ensayo de *resting cells* en incubadora orbital para comprobar cómo afectan estos métodos de conservación a la capacidad de biotransformación de DBT por el

microorganismo. El procedimiento utilizado se recoge, de forma esquemática, en la Figura 4.2, mientras que en la Tabla 4.1 se indican los experimentos realizados y en la Figura 4.3 se muestran los datos experimentales obtenidos en forma gráfica.

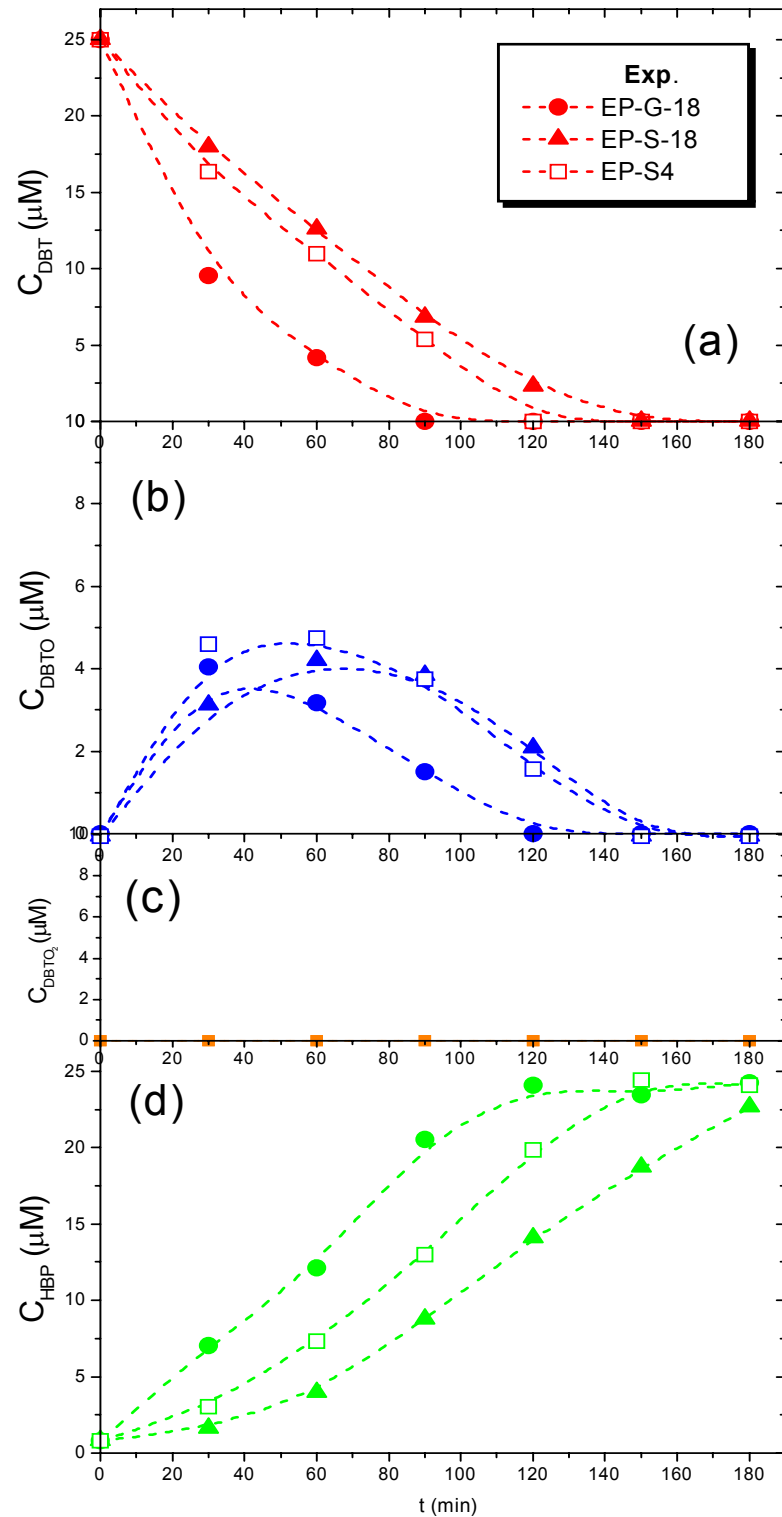
La citada figura muestra los resultados experimentales obtenidos en los tres experimentos. En ella se puede observar la variación de la concentración de los compuestos de la ruta 4S a lo largo del tiempo del ensayo de *resting cells*. Se puede apreciar que el porcentaje final de desulfuración obtenido es muy similar en los tres casos, ya que se alcanza aproximadamente la misma concentración final de HBP. Sin embargo, se observan diferencias en cuanto a la variación en las concentraciones de los compuestos a lo largo del experimento. Así, el DBT se consume más rápido en el caso de utilizar glicerol al 50% como medio de conservación, siendo la temperatura en este caso de  $-18^{\circ}\text{C}$ . En cuanto al  $\text{DBTO}_2$ , se observa una menor acumulación y, finalmente, con respecto al HBP, el producto final, se forma más rápido para después estabilizarse en un valor constante al cabo de 120 minutos. Cuando se conserva el microorganismo a  $4^{\circ}\text{C}$ , el consumo de DBT es algo más lento, se acumula más  $\text{DBTO}_2$ , y se forma HBP un poco más lentamente. En el caso de conservarlo a  $-18^{\circ}\text{C}$  en suero salino, el consumo de DBT y la formación de HBP es más lenta que en cualquiera de los otros dos casos. Se puede observar que la concentración de  $\text{DBTO}_2$ , en todos los casos, es inapreciable, lo cual tiene que ser debido a la diferencia de velocidad entre las reacciones de formación y de consumo de  $\text{DBTO}_2$ . Cuando la velocidad de formación es mucho menor que la de consumo, no se observa acumulación de ese compuesto.



**Figura 4.2.** Esquema del procedimiento llevado a cabo para estudiar la influencia de la forma de conservación de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en la capacidad desulfurante.

**Tabla 4.1** Experimentos realizados para estudiar la influencia de la forma de conservación del microorganismo en su capacidad desulfurante.

<b>Experimento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Medio de Conservación</b>
EP-G-18	-18°C	Glicerol 50%
EP-SS-18	-18°C	Suero Salino 99%
EP-SS4	4°C	Suero Salino 99%



**Figura 4.3.** Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la forma de conservación del microorganismo.

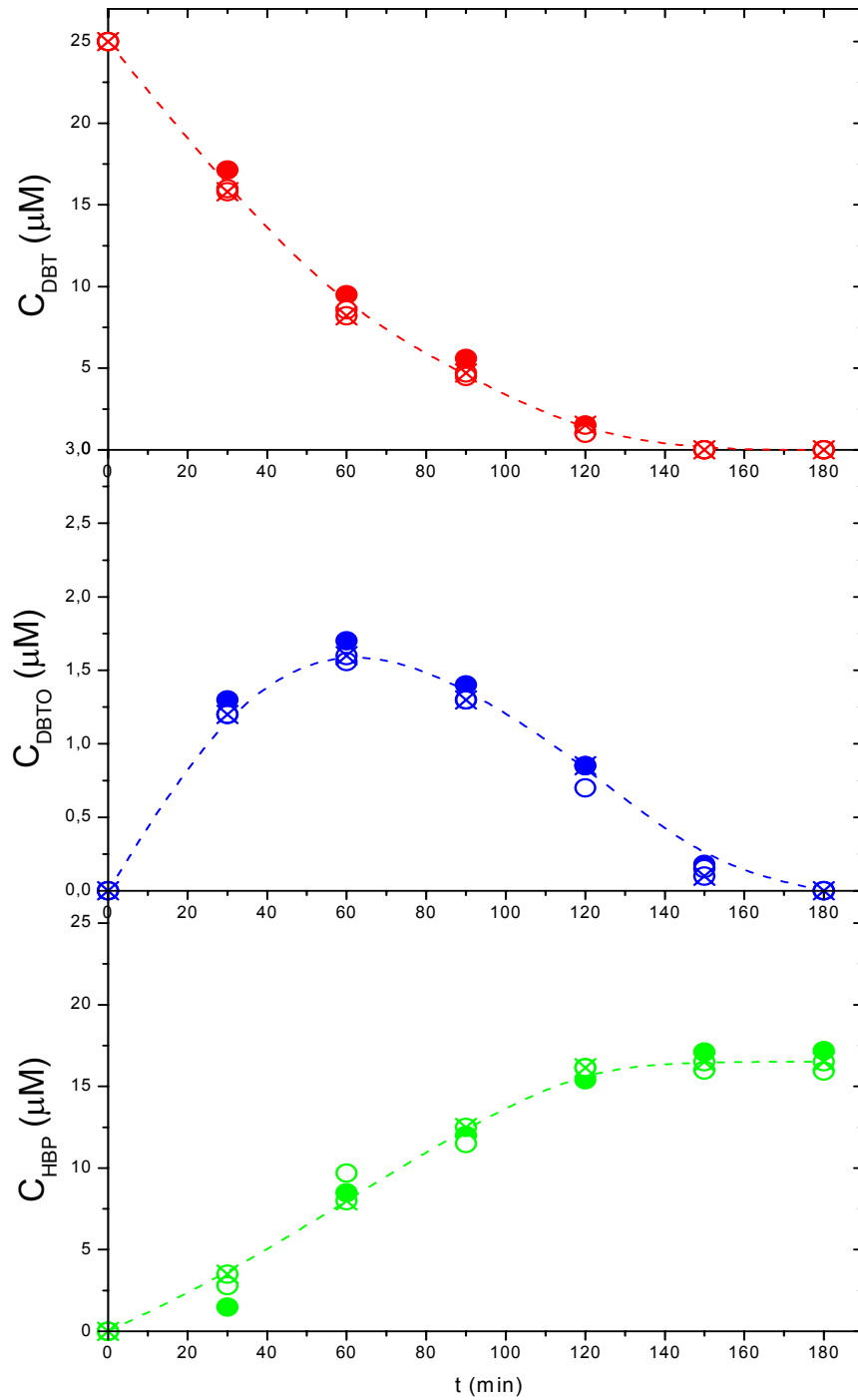
- a) Concentración de DBT
- b) Concentración de DBTO
- c) Concentración de DBTO<sub>2</sub>
- d) Concentración de HBP.

La diferencia entre los experimentos realizados a  $-18^{\circ}\text{C}$  parece deberse a que, al mantener el microorganismo a esa temperatura, cuando se utiliza suero salino como medio de conservación, se forman cristales de hielo que dañan la envoltura celular, mientras que si se usa glicerol, éste no llega a congelarse a esa temperatura, los cristales de hielo no llegan a formarse y no se daña la membrana externa de las células. Cuando se conserva el microorganismo a  $4^{\circ}\text{C}$  se obtienen peores resultados que cuando se mantiene a  $-18^{\circ}\text{C}$ , y esto puede ser debido a que los cofactores necesarios para llevar a cabo la ruta 4S se degradan apreciablemente con el tiempo a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , haciendo que la capacidad desulfurante del microorganismo se vea disminuida.

En consecuencia, a partir de estos experimentos, se eligió como método estándar de conservación la temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  y la disolución de glicerol al 50% como medio de conservación, ya que de esta manera el microorganismo conserva mejor su capacidad desulfurante para los posteriores experimentos de biodesulfuración de DBT.

Para comprobar la reproducibilidad del método de conservación, se realizaron tres experimentos diferentes, utilizando células obtenidas en las mismas condiciones de crecimiento, y conservadas según el método estandarizado descrito en este apartado. La Figura 4.4 muestra gráficamente la evolución de los compuestos DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP en los experimentos realizados. La Tabla 4.2 muestra los valores de las concentraciones de dichos compuestos con el tiempo, así como el valor medio de los experimentos realizados y la desviación estándar, cuyos valores indican que existe repetitividad y reproducibilidad en la medida. Por lo tanto, se puede decir que el método de conservación propuesto a lo largo de este apartado es un buen método de estandarización para que las células obtenidas durante la etapa de crecimiento del microorganismo puedan ser utilizadas tras su conservación para realizar la segunda etapa de biodesulfuración de DBT sin pérdida de reproducibilidad.





**Figura 4.4.** Evolución de los compuestos de la ruta de desulfuración utilizando células de la misma edad de crecimiento y conservadas según el método estandarizado a  $-18^{\circ}\text{C}$  en una solución de glicerol al 50%.

**Tabla 4.2.** Valores experimentales, medios y desviación estándar para comprobar la reproducibilidad del método de conservación de las células.

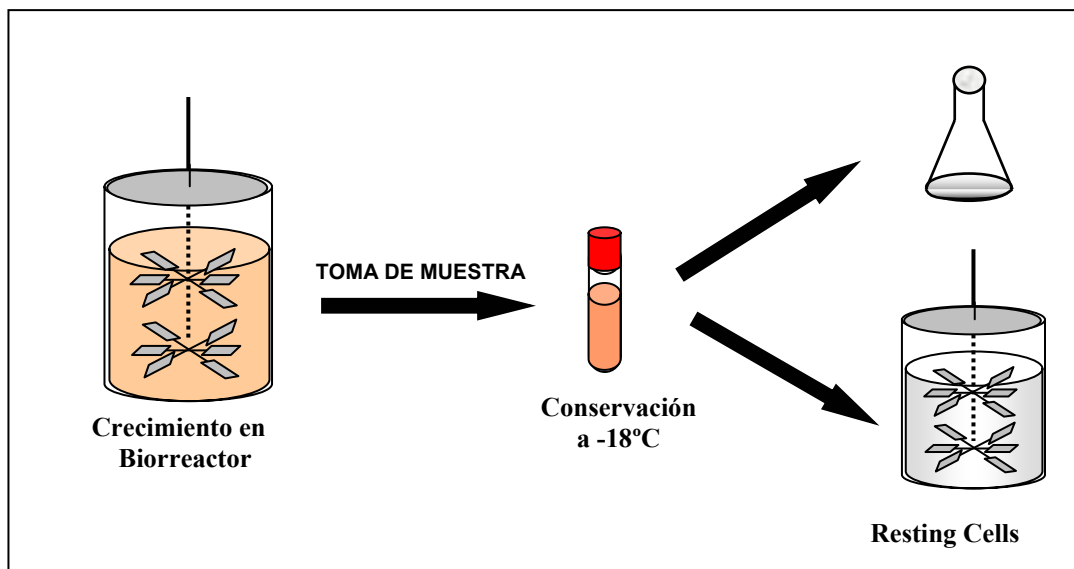
Compuesto	t (min)	C ( $\mu\text{M}$ )			Valor Medio	Desviación Estándar
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
DBT	0	25,0	25,0	25,0	25,0	0
	30	17,1	16,0	15,8	16,3	0,72
	60	9,50	8,57	8,20	8,76	0,67
	90	5,60	4,50	4,70	4,93	0,59
	120	1,50	1,00	1,50	1,33	0,29
	150	0	0	0	0	0
	180	0	0	0	0	0
HBP	0	0	0	0	0	0
	30	2,48	2,80	3,50	2,93	0,52
	60	8,50	9,70	8,00	8,73	0,87
	90	12,0	11,5	12,5	12,0	0,50
	120	15,4	16,1	16,1	15,9	0,43
	150	17,1	16,0	16,5	16,5	0,55
	180	17,2	15,9	16,5	16,5	0,63
DBTO	0	0	0	0	0	0
	30	1,30	1,20	1,20	1,23	0,06
	60	1,70	1,56	1,60	1,62	0,07
	90	1,40	1,30	1,30	1,33	0,06
	120	0,85	0,70	0,85	0,80	0,09
	150	0,18	0,15	0,10	0,14	0,04
	180	0	0	0	0	0

#### 4.2. ESTUDIO de las CONDICIONES de OPERACIÓN

Como ya se ha comentado anteriormente, en este apartado se ha estudiado la influencia de las condiciones de operación en la etapa de biodesulfuración de DBT por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Con respecto al estudio de la influencia de la temperatura, se han utilizado tres valores diferentes durante los experimentos de *resting cells* llevados a cabo en incubadora orbital: 28, 30 y 32°C. En cuanto al estudio de la influencia de la aeración y, por tanto, también del transporte de oxígeno en la etapa de biodesulfuración, se han realizado cuatro experimentos: uno de ellos en incubadora orbital, y los otros tres en fermentador comercial, utilizando diferentes velocidades de agitación (100, 200 y 500 rpm).

El procedimiento experimental utilizado en este estudio es el que se determinó en el apartado anterior, y se recoge de forma esquemática en la Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Esquema del procedimiento llevado a cabo para estudiar la influencia de las condiciones de operación en la etapa de biodesulfuración de DBT por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

#### **4.2.1. Influencia de la Temperatura**

La influencia de la temperatura en la etapa de biodesulfuración de DBT se ha estudiado en el intervalo de temperaturas de 28 a 32°C, realizando los experimentos anteriormente citados a 28, 30 y 32°C, como se resume en la Tabla 4.3. La temperatura afecta a la velocidad a la que se producen las reacciones de la ruta 4S porque influye fuertemente en las enzimas que catalizan estas reacciones. Además, cada enzima se encuentra afectada de una manera por la temperatura, cada enzima posee un valor óptimo de temperatura en el que la actividad es máxima. Así, aunque en la literatura se han encontrado trabajos en los que se estudia la influencia de la temperatura en cada una de las enzimas de la ruta (Nakayama, 2002), no se puede hacer una predicción precisa de la influencia de la temperatura en el conjunto global de las reacciones que se dan. Se ha encontrado que la temperatura de 30°C es la más utilizada en la literatura para los experimentos de desulfuración, por lo que se ha elegido como valor central dentro del intervalo de valores estudiados.

Estos experimentos se han realizado en matraces Erlenmeyer de 250 mL en incubadora orbital a una velocidad de agitación de 210 rpm, mediante el procedimiento explicado en el punto 2.3.5 de la presente Memoria, utilizado para realizar el análisis de la capacidad desulfurante del microorganismo.

**Tabla 4.3.** Experimentos realizados para estudiar la influencia de la influencia de la temperatura en la etapa de biodesulfuración de DBT.

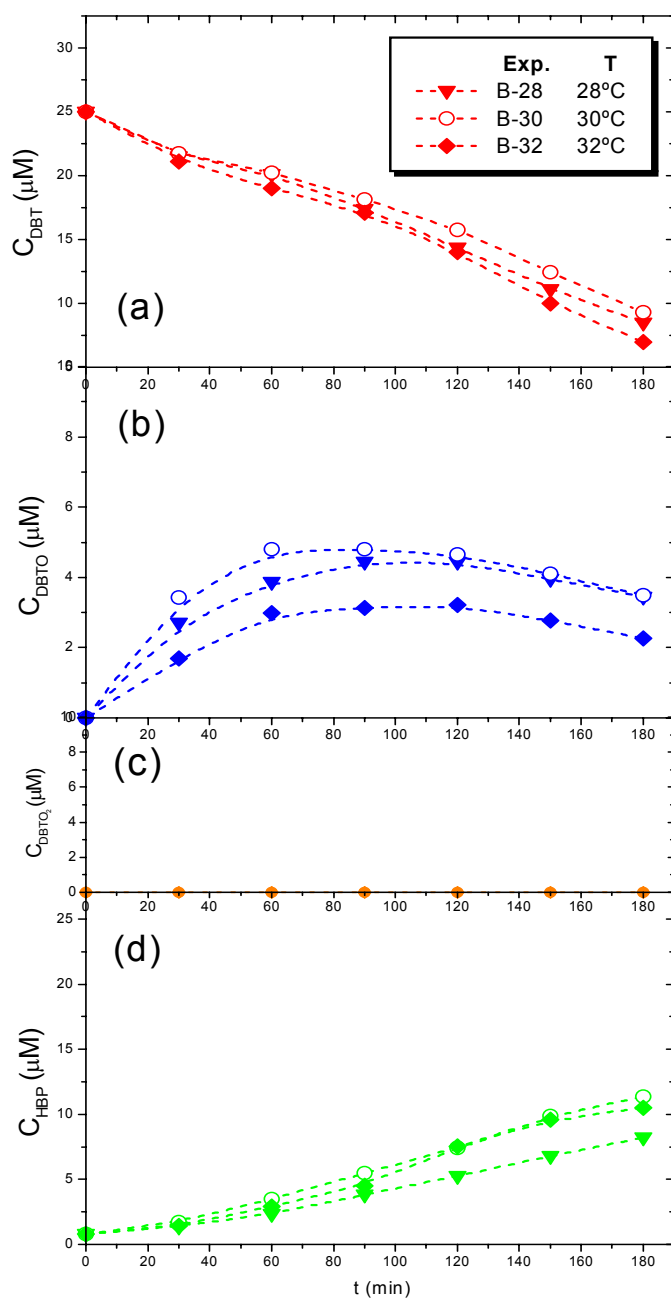
<b>Experimento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Reactor utilizado</b>
B-28	28°C	Incubadora Orbital
B-30	30°C	Incubadora Orbital
B-32	32°C	Incubadora Orbital

En la Figura 4.6 se pueden observar los resultados obtenidos en este estudio. En dicha figura se representa la concentración de los diferentes compuestos de la ruta 4S a lo largo del ensayo de desulfuración. En cuanto al consumo de DBT, es muy similar en los tres casos, por lo que parece que la temperatura apenas afecta a la primera enzima de la ruta, la DszC, en cuanto a su

afinidad por el sustrato y en cuanto a su constante de actividad. Sin embargo, si se observa la concentración de DBTO, existe una pequeña diferencia, a 28 y a 30°C se produce una mayor acumulación, mientras que a 32°C la concentración es algo menor. Esto implica que la diferencia de velocidad entre la producción y el consumo de este compuesto es mayor a 32°C, probablemente debido a una mayor afinidad de la enzima DszC por el sustrato a esta temperatura, ya que antes se ha comprobado que la enzima no se encuentra afectada en su constante cinética por la temperatura en el intervalo estudiado. Por otra parte, al igual que en lo encontrado en el estudio de la forma de conservación del microorganismo, la concentración de DBTO<sub>2</sub> es siempre nula a lo largo del tiempo, lo cual es indicativo de la gran velocidad potencial de la reacción catalizada por la enzima DszA, mucho mayor que la segunda reacción catalizada por la enzima DszC. Finalmente, de la evolución de la concentración de HBP a lo largo del experimento, se extrae que a 28°C la velocidad a la que se forma este último compuesto de la ruta 4S es algo menor, aunque bastante similar, que en el caso de operar a 30 o 32°C. Así, se puede concluir que la capacidad desulfurante es muy similar en este intervalo de temperaturas de 28 a 32°C, aunque se puede decir que a 30 y 32°C se obtiene un porcentaje de desulfuración algo mayor que a la menor temperatura.

#### **4.2.2. Influencia del Transporte de Oxígeno**

En este apartado se ha estudiado la influencia de la velocidad de aporte de oxígeno al medio, es decir, del transporte de oxígeno del aire al medio líquido en la etapa de biodesulfuración de DBT. El oxígeno cumple un papel, que puede ser importante, en esta etapa, al igual que en la anterior etapa de crecimiento del microorganismo, ya que es necesario para llevar a cabo las sucesivas oxidaciones que se dan en la ruta 4S por parte de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA. Además, es esencial también para el mantenimiento del microorganismo, que se encuentra en reposo en esta etapa pero necesita un aporte de oxígeno, aunque mucho menor que en el caso del crecimiento. Al encontrarse en reposo, necesita el oxígeno para llevar a cabo reacciones relacionadas con el metabolismo secundario, siendo una de ellas la formación de HBP a partir del DBT presente en el medio.



**Figura 4.6.** Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la temperatura en la etapa de biodesulfuración.

- a) Concentración de DBT
- b) Concentración de DBTO
- c) Concentración de DBTO<sub>2</sub>
- d) Concentración de HBP.

En la literatura no se ha encontrado ningún trabajo en que se realice un estudio de la influencia de la aireación/transferencia de oxígeno en esta etapa. En el presente trabajo se ha abordado dicho estudio llevando a cabo cuatro experimentos, que se resumen en la Tabla 4.4. El primero de ellos se ha realizado en matraz Erlenmeyer en incubadora orbital a 210 rpm mediante el procedimiento utilizado en el apartado anterior. Los otros tres han sido realizados en fermentador comercial de 2L de volumen de trabajo, según el procedimiento detallado en el punto 2.3.5 de la presente Memoria. En este caso, para estudiar la influencia de la forma de introducción de oxígeno al medio, se han utilizado tres velocidades de agitación diferentes: 100, 200 y 500 rpm, manteniendo el mismo caudal de aire (2L/min) constante a lo largo del experimento.

**Tabla 4.4.** Experimentos realizados para estudiar la influencia de la influencia de la aeración/transporte en la etapa de biodesulfuración de DBT.

<b>Experimento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Reactor utilizado</b>
B-I	30°C	Incubadora Orbital
B-F100	30°C	Fermentador Comercial
B-F200	30°C	Fermentador Comercial
B-F500	30°C	Fermentador Comercial

En los cuatro experimentos se ha medido la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del mismo, además de la concentración de los compuestos de la ruta 4S. Adicionalmente se ha medido el consumo específico de oxígeno durante el experimento por medio de la técnica que se resume a continuación, y que ya ha sido anteriormente descrita de forma más detallada en el apartado 3.5 de la presente Memoria:

A distintos intervalos de tiempo, se retira la aeración del medio y se toman datos de concentración de oxígeno disuelto: de esta forma, la disminución en los valores de concentración de oxígeno disuelto será debida exclusivamente al consumo del mismo por parte del microorganismo, ya que no se está aportando ni retirando oxígeno del medio de ninguna otra

manera, por lo tanto se cumple la ecuación planteada en el capítulo anterior (ec. [3.15]):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2} - C_{O_2}^*) - q_{O_2} C_X \quad [4.1]$$

donde  $C_{O_2}$  es la concentración de oxígeno disuelto,  $k_L a$  es el coeficiente de transferencia de oxígeno en el medio,  $C_{O_2}^*$  es la concentración de saturación,  $q_{O_2}$  es el consumo específico de oxígeno del microorganismo, y  $C_X$  es la concentración de biomasa.

Al no existir aeración en el medio, como ya se comentó (ec. [3.16]):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -q_{O_2} C_X \quad [4.2]$$

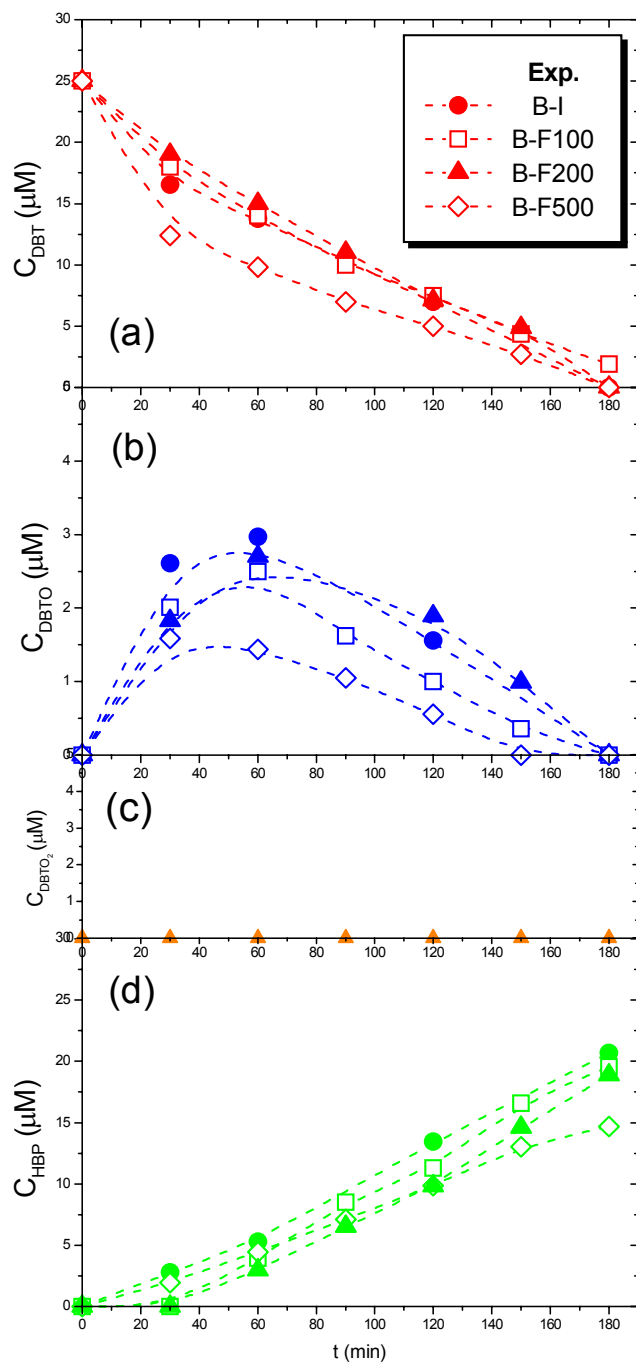
Por tanto, el consumo específico,  $q_{O_2}$ , se puede obtener de la pendiente de la recta que se obtiene al representar  $C_{O_2}$  vs. tiempo cuando se retira la aeración del medio.

En la Figura 4.7 se recogen los resultados obtenidos en este estudio. Si se observa la gráfica en que se representa la concentración de oxígeno disuelto, se puede ver que dicha concentración aumenta al aumentar el transporte de oxígeno en el medio a través del aumento en la velocidad de agitación. Así, se ve claramente que la concentración de oxígeno es mayor en incubadora orbital que en fermentador comercial, y mayor en este caso al trabajar a 500 rpm. En el caso de utilizar una velocidad de agitación de 100 rpm, se llega incluso a un valor de cero en la concentración de oxígeno disuelto aproximadamente a 40 minutos de tiempo de reacción, para luego aumentar ligeramente y mantenerse en un valor casi constante del 15% de saturación. En los otros tres casos, la concentración de oxígeno disuelto presenta una disminución al principio del experimento y luego permanece constante una vez alcanzados aproximadamente 60 minutos de progreso del proceso.



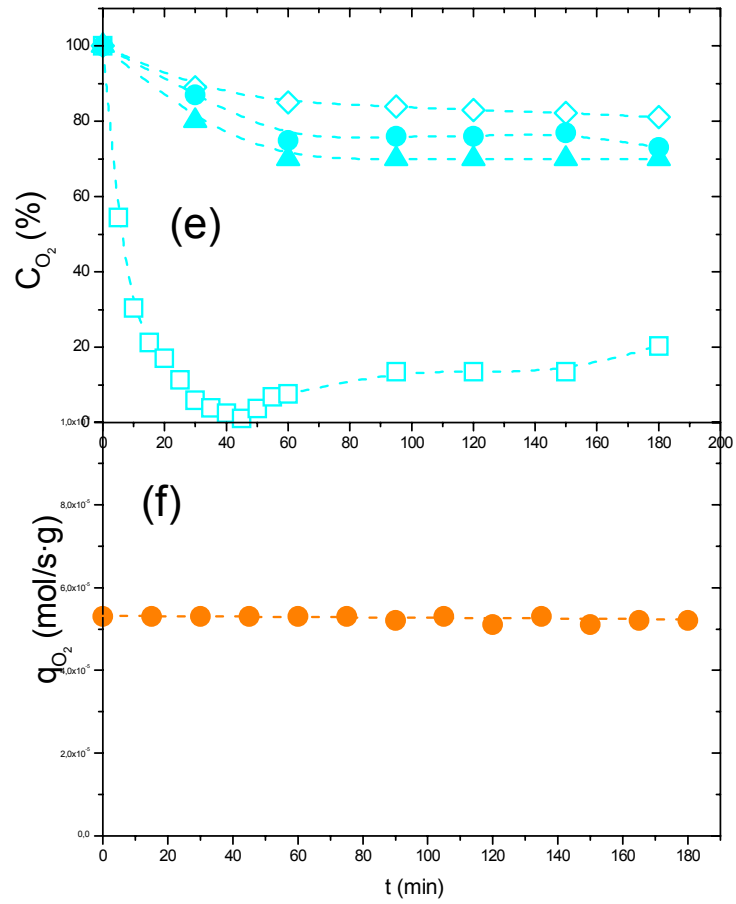
En cuanto al consumo de DBT, no se observan diferencias claras en el caso de trabajar en incubadora o en fermentador a velocidades de agitación de 100 y 200 rpm. Sin embargo, al trabajar en fermentador comercial y fijar la velocidad de agitación en 500 rpm, destaca que el consumo de DBT se hace algo más rápido. Al aumentar la concentración de oxígeno, aumenta la velocidad de la reacción de desaparición de DBT, ya que el oxígeno es uno de los sustratos de dicha reacción (como se puede ver en la Figura 4.8). Si se observa la evolución de la concentración de DBTO, se ve que la acumulación de este compuesto es también menor en el caso de trabajar a 500 rpm, cuando la concentración de oxígeno disuelto es mayor. Esto indica de nuevo un aumento en la velocidad de la segunda reacción debido a una mayor concentración de oxígeno disuelto. Sin embargo, al observar la evolución de la concentración de HBP, último compuesto de la ruta, se aprecia que la velocidad de producción de éste es algo inferior cuando se trabaja a 500 rpm y por tanto se llega a una concentración final algo menor. Por esta razón, la capacidad desulfurante del microorganismo resulta ser menor cuando la concentración de oxígeno es tan alta. Esto podría ser indicativo de que las concentraciones altas de oxígeno disuelto afectan negativamente a la enzima DszB, que cataliza el paso de HBPS a HBP en la ruta, debido a una oxidación o una desactivación de la misma. Finalmente, en cuanto a la concentración de DBTO<sub>2</sub> a lo largo del experimento, ésta es nula, al igual que en todos los estudios anteriores, lo cual vuelve a indicar una velocidad de la tercera reacción de la ruta muy grande, sin verse afectada por la concentración de oxígeno disuelto.

Con respecto al consumo específico de oxígeno,  $q_{O_2}$ , durante la biodesulfuración de DBT mediante *R. erythropolis* IGTS8, en la Figura 4.7 se refleja que permanece en un valor experimental constante de, aproximadamente,  $0,53 \cdot 10^{-6}$  mol/s·g. Para comprobar qué parte de este consumo es debida al oxígeno utilizado en la ruta 4S y qué parte es debida al mantenimiento del microorganismo, se ha calculado la concentración de oxígeno estequiométrica necesaria para llevar a cabo la ruta, a partir de los valores conocidos de las concentraciones de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP. Para ello, se propone el esquema estequiométrico de reacción que muestra la Figura 4.8.



**Figura 4.7.** Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la aeración/transporte en la etapa de biodesulfuración de DBT.

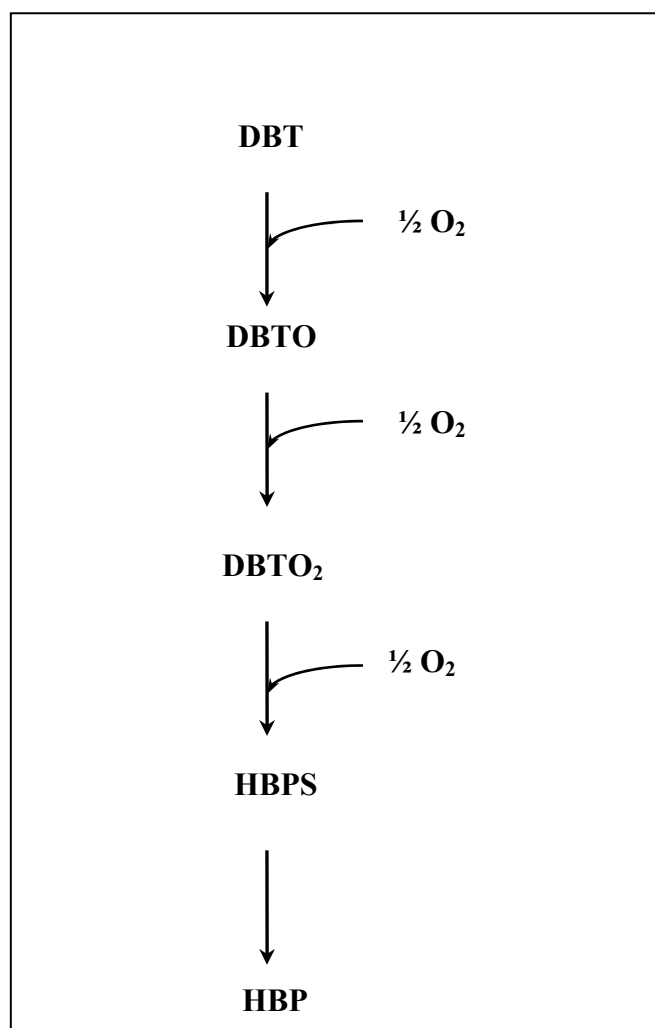
- a) Concentración de DBT
- b) Concentración de DBTO
- c) Concentración de DBTO<sub>2</sub>
- d) Concentración de HBP



**Figura 4.7 (continuación).** Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la aeración/transporte en la etapa de biodesulfuración de DBT.

- e) Concentración de oxígeno disuelto
- f) Consumo específico de oxígeno.

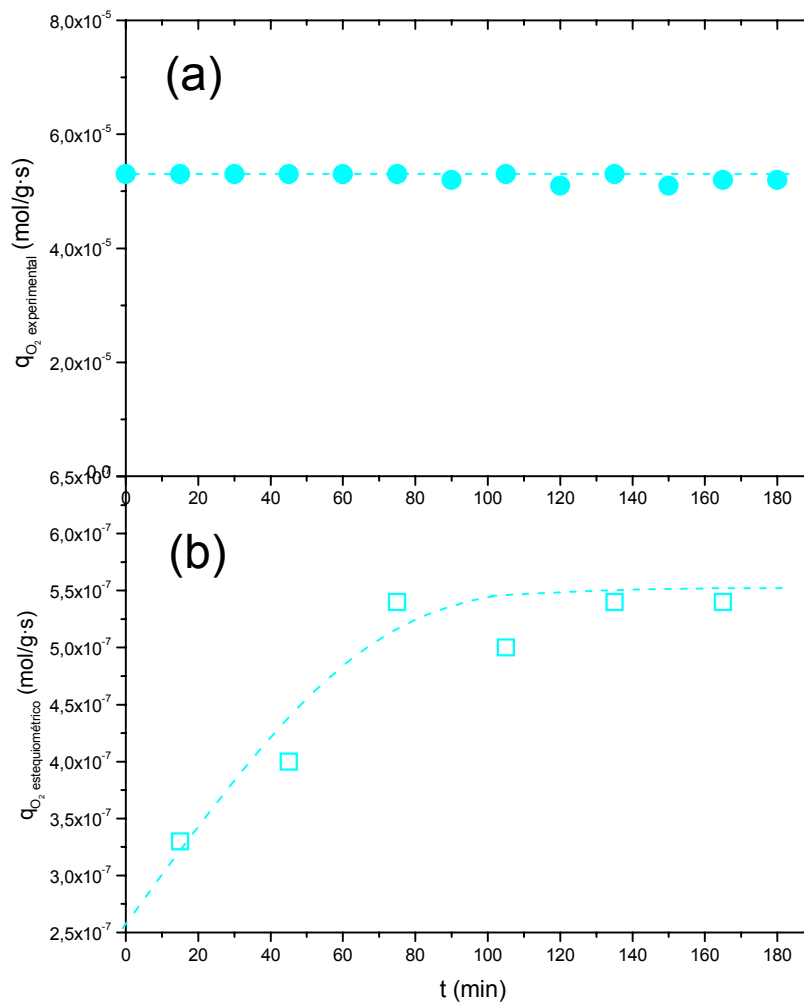
Así, conocidas las concentraciones de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP durante la etapa de biodesulfuración, se pueden calcular las concentraciones de HBPS y de oxígeno consumido a lo largo del experimento, mediante el estudio estequiométrico del sistema (este estudio se explica detalladamente en el apartado 4.3.1 de la presente Memoria). A partir de esta última, se calcula el consumo específico estequiométrico de oxígeno durante la biodesulfuración, ya que la concentración de biomasa es conocida (0,7 g/L) a lo largo de todo el experimento de biodesulfuración. Este cálculo ha sido realizado a partir de los datos experimentales obtenidos al llevar a cabo la biodesulfuración en incubadora orbital, aunque son extrapolables al caso de realizar la biodesulfuración en fermentador comercial con velocidades de agitación de 100 ó 200 rpm, ya que el microorganismo se comporta prácticamente igual en esas condiciones, como se refleja en los valores de concentración de los compuestos de la ruta 4S.



**Figura 4.8.** Esquema de reacción estequiométrica de la ruta 4S.

En la Figura 4.9 se representan los valores del consumo específico de oxígeno calculado estequiométricamente y los valores de consumo específico que se han obtenido de forma experimental mediante el método anteriormente comentado. Se observa que el valor experimental es mucho mayor que el valor estequiométrico, del orden de 100 veces mayor, lo cual indica que, de todo el oxígeno que se consume durante la biodesulfuración, la casi totalidad se requiere para el mantenimiento del microorganismo. El valor experimental medio de consumo de oxígeno específico es de  $0,53 \cdot 10^{-6}$  mol/s·g, mientras que el valor calculado a partir de la estequiometría de la reacción varía entre  $0,0033 \cdot 10^{-6}$  y  $0,0054 \cdot 10^{-6}$  mol/g·s. Como ya se ha comentado anteriormente, durante la etapa de biodesulfuración, el sistema estudiado en este trabajo está compuesto por células en reposo (*resting cells*) es decir, el microorganismo no aumenta su concentración celular como en el caso de la etapa de crecimiento, pero precisa de oxígeno en el medio para mantenerse llevando a cabo reacciones del metabolismo secundario (entre ellas, la biodesulfuración de DBT). Esto explica, además, el hecho de que el consumo específico de oxígeno permanezca constante durante la biodesulfuración, ya que la cantidad de oxígeno que se consume para llevar a cabo la ruta 4S es tan pequeña que no llega a afectar el consumo global de oxígeno, debido principalmente al mantenimiento.

De estos datos se concluye que no existe una diferencia significativa entre realizar la etapa de biodesulfuración en incubadora orbital y en fermentador comercial, siempre que en este último caso, se trabaje a velocidades de agitación bajas, entre 100 y 200 rpm. Por otro lado, el consumo observado de oxígeno disuelto en el medio es debido principalmente al mantenimiento del microorganismo para llevar a cabo las reacciones del metabolismo secundario, ya que esta etapa consiste en un sistema de células en reposo, en que no se produce aumento de biomasa, no hay crecimiento del microorganismo.



**Figura 4.9.** Consumo específico de oxígeno durante la etapa de biodesulfuración.

- a) Consumo específico de oxígeno experimental
- b) Consumo específico de oxígeno estequiométrico

### **4.3. MODELO CINÉTICO de la BIODESULFURACIÓN**

En la etapa de biodesulfuración de DBT, al igual que en la de crecimiento del microorganismo *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, es necesario realizar un estudio cinético de la misma, para poder describir matemáticamente la evolución de los compuestos de la ruta 4S.

En la literatura no existe ningún trabajo en que se haya realizado un estudio cinético de la biodesulfuración, o se haya propuesto un modelo cinético capaz de describirla. Se ha experimentado siempre como test de desulfuración o para llevar a cabo la determinación de los compuestos participantes en la ruta, pero sin realizar estudio cinético alguno. Además, muchos autores no realizan la etapa de crecimiento y la de biodesulfuración por separado, sino que miden la desulfuración durante el crecimiento en DBT (Omori y col., 1992; Kilbane y col., 1992; Wang y Krawiec, 1994 y 1996; Omori y col., 1995; Ohshiro y col., 1996; Honda y col., 1998; Setti y col., 1999; Folsom y col., 1999; Yan y col., 2000); otros autores lo hacen por separado, llevando a cabo la desulfuración en condiciones de *resting cells* (Olson y col., 1993; Gallagher y col., 1993; Oldfield y col., 1997; Konishi y col., 1997; Kaufman y col., 1999; Kishimoto y col., 2000; Onaka y col., 2000; Maghsoudi y col., 2001; Kobayashi y col., 2001; Matsui y col., 2001); otros trabajos, por el contrario, llevan a cabo el proceso de desulfuración en sistemas libres de células (Gray y col., 1996; Xi y col., 1997; Ohshiro y col., 1999; Nakayama y col., 2002), con extractos celulares, para realizar estudios de actividades enzimáticas. La mayoría de los autores no realizan un estudio cinético de las velocidades de crecimiento y de producción. Wang y Krawiec (1996) obtuvieron un modelo de crecimiento para *R. erythropolis* N1-36, basado en la ecuación de Monod, empleando un sistema continuo, y determinaron los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento de las células, la constante de afinidad por el sustrato y el coeficiente de rendimiento en biomasa) en el caso en que la fuente de azufre (DBTO<sub>2</sub>) era limitante. Gray y col. (1996) realizaron un estudio cinético de la ruta de desulfuración y supusieron un modelo de reacción en dos etapas consecutivas para las dos primeras reacciones; propusieron las siguientes ecuaciones cinéticas en su forma integral, es decir, con las dos reacciones de orden 1:

$$C_{DBT} = C_{DBT,0} \exp(-k_1 t) \quad [4.3]$$

$$C_{DBTO} = \frac{C_{DBTO,0} k_1}{k_2 - k_1} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad [4.4]$$

$$C_{DBTO_2} = C_{DBTO_2,0} \left\{ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} [k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t)] \right\} \quad [4.5]$$

Ajustaron los datos experimentales a este modelo y obtuvieron que los valores de las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  eran 0,06 y 0,5  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente, lo que indicaba que la segunda etapa era unas 10 veces más rápida que la primera. De una forma similar, Nakayama y col. (2002) y Watkins y col. (2003) supusieron también un modelo cinético de producción, obteniendo así parámetros cinéticos para ese modelo. Como puede apreciarse, no estudiaron todas las reacciones y supusieron todas de primer orden.

En este apartado se lleva a cabo la descripción matemática de la biodesulfuración de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, a través de la evolución de los compuestos de la ruta 4S, considerando dicha ruta como una reacción múltiple (4 reacciones en serie). Para ello, se ha realizado un estudio estequiométrico del sistema, obteniendo así el número de compuestos clave del mismo, el número de reacciones independientes entre los compuestos, y la forma de calcular la variación de composición del sistema conocido el cambio de los compuestos clave. Después se ha formulado el modelo mediante el uso de diferentes ecuaciones cinéticas, obtenidas aplicando el método de las velocidades de reacción en su forma diferencial, y se han calculado los parámetros cinéticos de dichas ecuaciones aplicando el método de las velocidades de reacción en su forma integral mediante regresión no lineal en simple respuesta. Más adelante, se ha aplicado el método de las velocidades de producción para obtener los parámetros cinéticos con significación estadística, utilizando los anteriores valores como parámetros iniciales, mediante una regresión no lineal, en este caso en múltiple respuesta. Finalmente, se ha llevado a cabo una validación del modelo propuesto. En la Figura 4.10 se muestra un esquema de los pasos llevados a cabo para la determinación del modelo cinético de la biodesulfuración.



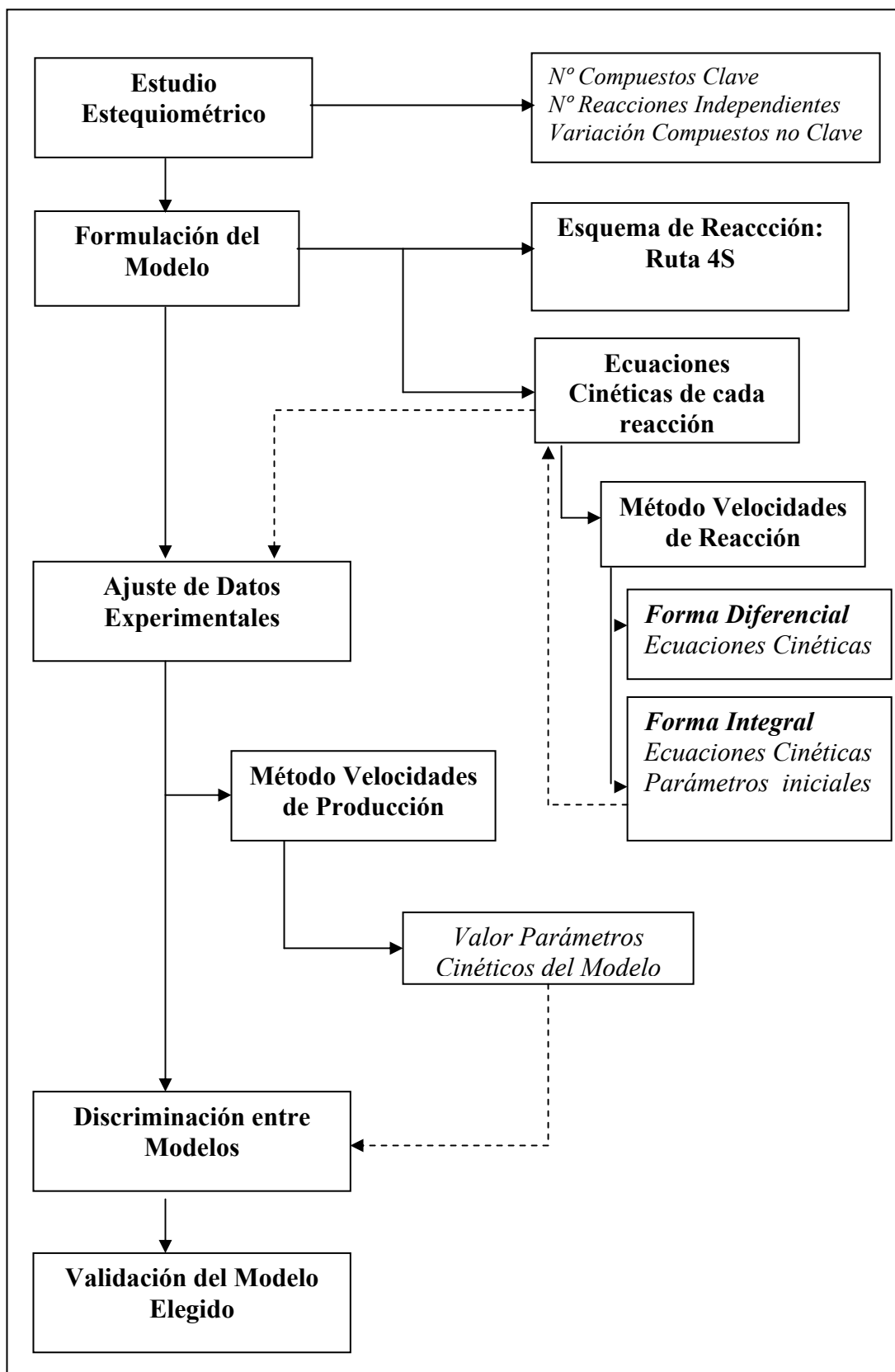


Figura 4.10. Esquema de los pasos seguidos en la determinación del Modelo Cinético de la Biodesulfuración.

### **4.3.1. Resultados de los Experimentos Cinéticos**

Para realizar el ajuste al modelo cinético de la biodesulfuración, se han utilizado distintos experimentos, correspondientes a distintas horas de crecimiento del microorganismo: 10, 24, 33, 48 y 58 h de crecimiento, es decir, con distinta capacidad desulfurante y por lo tanto, diferentes actividades enzimáticas. Las células obtenidas en la etapa de crecimiento, una vez transcurrido el tiempo comentado, se conservaron en las condiciones óptimas para mantener su capacidad desulfurante, como ya se ha indicado anteriormente en el apartado 4.1.1 de la presente Memoria. Los experimentos de crecimiento se llevaron a cabo en fermentador comercial, a una temperatura de 30°C, agitación variable de 100-300 rpm, caudal de aire de 2 L/min y concentración inicial de biomasa de 0,15 g/L. Los experimentos de biodesulfuración se han llevado a cabo en incubadora orbital, a 30°C, equivalentes, como ya se comprobó en el apartado 4.2.2 de la presente Memoria, a experimentos realizados en fermentador comercial, utilizando velocidades de agitación entre 100 y 200 rpm y caudal de aeración de 1L/min. El procedimiento experimental utilizado en este estudio se recoge de forma esquemática en la Figura 4.5.

La Tabla 4.5 resume los experimentos que se han analizado en este apartado para llevar a cabo la obtención del modelo cinético.

**Tabla 4.5** Experimentos realizados para la obtención del modelo cinético de la biodesulfuración.

<b>Experimento</b>	<b>t<sub>G</sub> (h)</b>	<b>Reactor utilizado</b>
B-M10	10	Incubadora Orbital
B-M24	24	Incubadora Orbital
B-M33	33	Incubadora Orbital
B-M48	48	Incubadora Orbital
B-M58	58	Incubadora Orbital

Las Tablas 4.6 a 4.10 muestran los datos experimentales de concentración de los compuestos clave obtenidos en estos experimentos.

**Tabla 4.6.** Datos experimentales obtenidos en el experimento **B-M10** realizado con células obtenidas tras 10 h de crecimiento en incubadora orbital.

<i>t (min)</i>	<i>C<sub>DBT</sub></i>	<i>C<sub>DBTO</sub></i>	<i>C<sub>DBTO2</sub></i>	<i>C<sub>HBP</sub></i>
0	25,0	0	0	0
10	21,5	0	0	0
20	19,0	0	0	0
30	17,5	0	0	0
40	16,4	0	0	0
50	15,5	0	0	0
60	15,0	0	0	0
70	14,8	0	0	0
80	14,5	0	0	0
90	14,5	0	0	0

**Tabla 4.7.** Datos experimentales obtenidos en el experimento **B-M24** realizado con células obtenidas tras 24 h de crecimiento en incubadora orbital.

<i>t (min)</i>	<i>C<sub>DBT</sub></i>	<i>C<sub>DBTO</sub></i>	<i>C<sub>DBTO2</sub></i>	<i>C<sub>HBP</sub></i>
0	25,0	0	0	0
10	18,0	2,3	0	0,4
20	14,0	2,7	0	0,8
30	11,3	2,9	0	1,3
40	10,0	2,9	0	1,9
50	9,0	2,9	0	2,6
60	9,3	2,8	0	3,3
70	8,5	2,7	0	3,3
80	8,0	2,6	0	4,1
90	7,5	2,4	0	5,8

**Tabla 4.8.** Datos experimentales obtenidos en el experimento **B-M33** realizado con células obtenidas tras 33 h de crecimiento en incubadora orbital.

<i>t (min)</i>	<i>C<sub>DBT</sub></i>	<i>C<sub>DBTO</sub></i>	<i>C<sub>DBTO2</sub></i>	<i>C<sub>HBP</sub></i>
0	25,0	0	0	0
10	17,4	1,9	0	1,0
20	12,5	3,0	0	1,7
30	8,8	3,7	0	5,0
40	7,2	3,7	0	3,5
50	5,9	3,4	0	4,5
60	5,0	3,0	0	5,7
70	4,4	2,5	0	7,0
80	4,0	2,0	0	8,8
90	3,3	1,6	0	10,9

**Tabla 4.9.** Datos experimentales obtenidos en el experimento **B-M48** realizado con células obtenidas tras 48 h de crecimiento en incubadora orbital.

<i>t (min)</i>	<i>C<sub>DBT</sub></i>	<i>C<sub>DBTO</sub></i>	<i>C<sub>DBTO2</sub></i>	<i>C<sub>HBP</sub></i>
0	25,0	0	0	0
10	12,7	0,2	0	2,6
20	6,5	1,1	0	4,4
30	3,4	1,4	0	5,9
40	1,6	0,9	0	7,3
50	0,8	0,5	0	8,7
60	0,5	0,2	0	10,0
70	0,2	0	0	11,4
80	0,1	0	0	12,7
90	0	0	0	13,9

**Tabla 4.10.** Datos experimentales obtenidos en el experimento **B-M58** realizado con células obtenidas tras 58 h de crecimiento en incubadora orbital.

<i>t (min)</i>	<i>C<sub>DBT</sub></i>	<i>C<sub>DBTO</sub></i>	<i>C<sub>DBTO2</sub></i>	<i>C<sub>HBP</sub></i>
0	25,0	0	0	0
10	20,5	1,8	0	0
20	17	2,5	0	0,2
30	13,3	3,7	0	0,6
40	12,0	3,4	0	1,3
50	10,0	3,6	0	2,4
60	8,4	3,2	0	5,0
70	7,0	3,9	0	4,9
80	6,0	4,0	0	6,2
90	4,3	4,3	0	7,3

### **4.3.2. Estudio Estequiométrico de la Ruta 4S**

El estudio estequiométrico de la ruta 4S se ha llevado a cabo a través de la matriz estequiométrica de elementos-especies, **B** (Schubert y Hofmann, 1976), tras aplicar el algoritmo de Gauss-Jordan.

En la ruta 4S de biodesulfuración intervienen los siguientes compuestos: DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub>, HBPS, HBP, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. La matriz **B** se puede escribir según la ecuación [4.6]:

$$B = \begin{pmatrix} & SO_3^{2-} & H_2O & O_2 & HBPS & DBT & DBTO & DBTO_2 & HBP \\ H & 0 & 0 & 0 & 12 & 12 & 12 & 12 & 12 \\ S & 0 & 2 & 0 & 9 & 8 & 8 & 8 & 9 \\ O & 3 & 1 & 2 & 3 & 0 & 1 & 2 & 1 \\ C & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad [4.6]$$

Aplicando el algoritmo de Gauss-Jordan, la matriz **B** se puede escribir, en su forma escalonada-reducida, como muestra la ecuación [4.7]:

$$B = \begin{pmatrix} & SO_3^{2-} & H_2O & O_2 & HBPS & DBT & DBTO & DBTO_2 & HBP \\ H & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ S & 0 & 1 & 0 & 0 & -1/4 & 1/4 & 3/4 & 1/2 \\ O & 0 & 0 & 1 & 0 & 1/2 & 1/2 & 1/2 & 0 \\ C & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \quad [4.7]$$

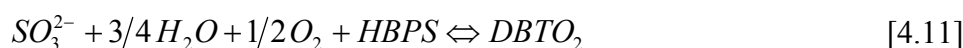
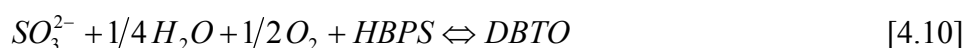
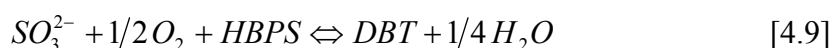
Así, se obtiene que el rango de la matriz es 4, con lo que el número de componentes clave se obtiene mediante la ecuación [4.8], resultando 4 componentes clave:

$$NCC = N_S - R_B \quad [4.8]$$

donde *NCC* es el número de compuestos clave, *N<sub>S</sub>* es el número de especies, y *R<sub>B</sub>* es el rango de la matriz **B**.

Como posible grupo de componentes clave, se pueden elegir los 4 siguientes: DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP.

De esta matriz **B** se obtienen, además, 4 posibles reacciones independientes, que pueden venir dadas, por ejemplo, por las ecuaciones [4.9] a [4.12]:



Y la variación de los compuestos no clave, se puede calcular de acuerdo a las ecuaciones [4.13] a [4.16]:

$$\Delta n_{SO_3^{2-}} = -\Delta n_{DBT} - \Delta n_{DBTO} - \Delta n_{DBTO_2} \quad [4.13]$$

$$\Delta n_{H_2O} = 1/4 \Delta n_{DBT} - 1/4 \Delta n_{DBTO} - 3/4 \Delta n_{DBTO_2} - 1/2 \Delta n_{HBP} \quad [4.14]$$

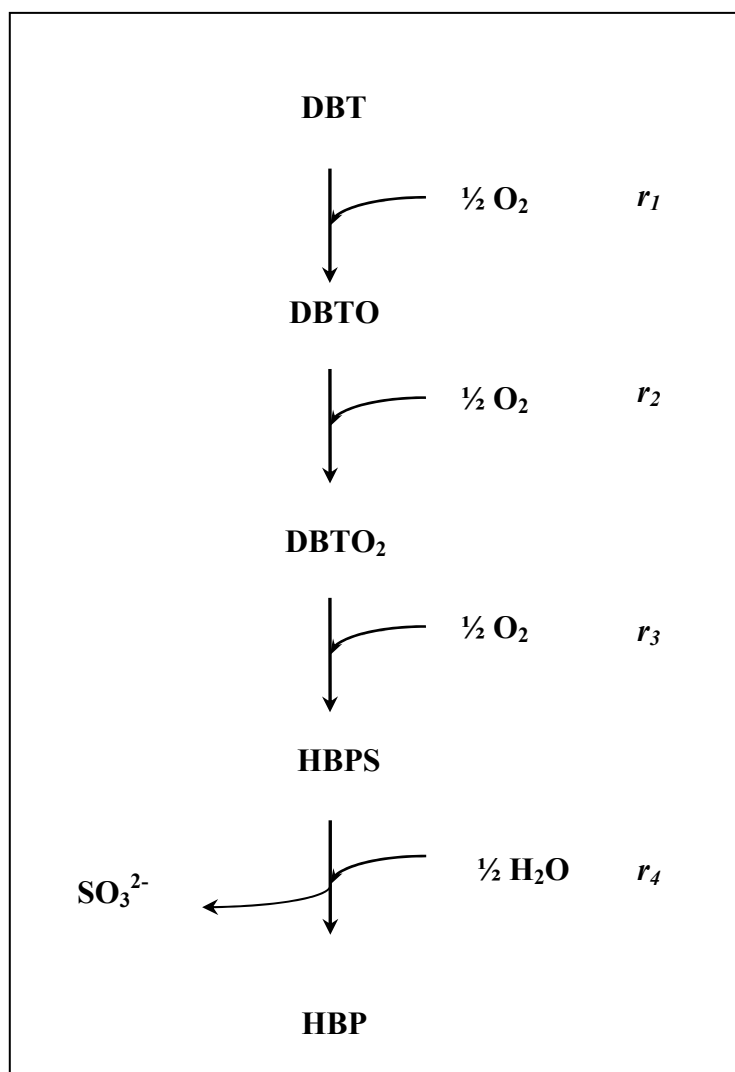
$$\Delta n_{O_2} = -1/2 \Delta n_{DBT} - 1/2 \Delta n_{DBTO} - 1/2 \Delta n_{DBTO_2} \quad [4.15]$$

$$\Delta n_{HBPS} = -\Delta n_{DBT} - \Delta n_{DBTO} - \Delta n_{DBTO_2} - \Delta n_{HBP} \quad [4.16]$$

En este caso, el esquema de reacción viene dado por la ruta 4S, que ya ha sido dilucidada por distintos autores (Gray y col., 1996; Oldfield y col., 1997). Este esquema de reacción, ajustado estequiométricamente, se muestra en la Figura 4.11, y ha sido el único considerado en este trabajo.

El número de reacciones en el esquema de reacción debe ser igual o mayor que el número de compuestos clave, aunque cuando es mayor pueden existir problemas a la hora de ajustar resultados experimentales, ya que se suelen obtener valores negativos para alguno de los parámetros del modelo (García-Ochoa y col.,

1990). En este caso, hay 4 reacciones que componen el esquema de reacción y, como ya se ha comentado más arriba, 4 componentes clave, por lo tanto, las 4 reacciones son linealmente independientes.



**Figura 4.11.** Esquema de reacción estequiométrica (ruta 4S).



### 4.3.3. Formulación del Modelo

La formulación del modelo cinético, una vez adoptado un esquema de reacción, implica la proposición de las ecuaciones cinéticas de cada una de las reacciones que componen dicho esquema de reacción (en este caso, la ruta 4S).

Las siguientes ecuaciones relacionan las magnitudes que se pueden medir (velocidades de producción de los compuestos) con las que hay que determinar (velocidades de reacción) (García-Ochoa y Romero ,1993):

$$R_j = \sum_{i=1}^{NR} \nu_{ij} \cdot r_i; (j = 1, \dots, NC) \quad [4.17]$$

donde  $R_j$  son las velocidades de producción de los compuestos clave,  $r_i$  las velocidades de reacción de la ruta 4S, y  $\nu_{ij}$  los coeficientes estequiométricos de los compuestos clave en cada una de las reacciones.

Integrando, según el método propuesto por Himmelblau y col. (1967), se obtienen las ecuaciones:

$$C_{ij} - C_{j0} = \sum_{i=1}^{NR} \nu_{ij} \int_0^t r_i dt; (j = 1, \dots, NC) \quad [4.18]$$

donde  $C_j$  son las concentraciones de los compuestos clave.

Para llevar a cabo la formulación del modelo cinético que describe matemáticamente la evolución de los compuestos de un esquema de reacción dado, se puede aplicar el método de las velocidades de reacción, o el método de las velocidades de producción. El **método de las velocidades de producción** se basa en aplicar las ecuaciones [4.17] a los compuestos clave del sistema. Para la resolución de estas ecuaciones, se puede utilizar el método diferencial o el método integral de cálculo. El primero se basa en aplicar la ecuación [4.17] a los

compuestos clave del sistema, obteniendo un sistema de ecuaciones diferenciales que se puede expresar en forma matricial como:

$$\mathbf{R} = \nu \cdot \mathbf{r} \quad [4.19]$$

García-Ochoa y col. (1989b y 1990b) han puesto de manifiesto la clara ventaja que presentan los métodos integrales frente a los diferenciales, cuando se dispone, como en este caso, de datos de concentración con el tiempo. Esto es debido, fundamentalmente, a la mayor precisión de los métodos numéricos de integración frente a los de derivación. La resolución del modelo, utilizando el método integral de cálculo, está basada en la aplicación de la ecuación [4.18] a los compuestos clave del sistema, obteniendo entonces un sistema de ecuaciones integrales, que se puede expresar matricialmente de la siguiente forma:

$$\mathbf{C} = \nu \cdot \mathbf{r}_s \quad [4.20]$$

donde  $\mathbf{r}_s$  representa las integrales de las funciones de las velocidades de reacción (García-Ochoa y Romero, 1993).

En el caso de este estudio, la matriz  $\nu$  para los compuestos clave, considerando como esquema de reacción la ruta 4S, quedaría como muestra la ecuación [4.21]:

$$\nu = \begin{matrix} [1] \\ [2] \\ [3] \\ [4] \end{matrix} \begin{pmatrix} DBT & DBTO & DBTO_2 & HBP \\ -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad [4.21]$$

El **método de las velocidades de reacción** se puede aplicar cuando  $\nu$  es cuadrada, es decir, cuando el número de componentes clave es igual al número de reacciones en el esquema, como en el caso de este estudio, de la ecuación [4.19] se puede deducir:

$$\mathbf{r} = \nu^{-1} \cdot \mathbf{R} \quad [4.22]$$

Es decir, las velocidades de reacción se pueden calcular a partir de las velocidades de producción de cada uno de los compuestos clave:

$$r_j = \sum_{i=1}^{NR} \nu_{ij} \cdot \frac{dC_j}{dt} ; (j = 1, \dots, NC) \quad [4.23]$$

Para la resolución del sistema se puede emplear, también en este caso, el método diferencial o el método integral de cálculo. Siguiendo el método diferencial de cálculo, se aplicaría la ecuación [4.22], teniéndose que calcular las velocidades de producción,  $R_j$ , para cada uno de los compuestos clave. Esto se realizaría por ajuste de los datos experimentales de concentración a una función de tiempo conocida, derivando numéricamente, obteniendo así valores discretos de  $R_j$  (ecuación [4.23]).

Aunque la ecuación [4.22] es sólo aplicable cuando  $\nu$  es cuadrada, es decir, cuando el número de componentes clave es igual al número de reacciones en el esquema, el método basado en las velocidades de reacción presenta ventajas, tanto desde un punto de vista de cálculo como desde el punto de vista conceptual. Para aplicar este método en su variedad integral, hay que realizar la transformación de la ecuación [4.22] en la ecuación [4.24]:

$$r_s = \nu^T \cdot C \quad [4.24]$$

La aplicación de esta ecuación a los componentes clave del modelo cinético conduce a grupos de ecuaciones que permiten calcular los parámetros cinéticos por medio de una regresión simple de forma individual para cada reacción. Una vez conocidas las ecuaciones cinéticas, aplicando este método de las velocidades de reacción, es necesario calcular los parámetros realizando un ajuste en múltiple respuesta, es decir, obteniendo los parámetros por regresión de los datos experimentales con todas las ecuaciones a la vez, lo que se realiza mediante la aplicación del método de las velocidades de producción.

En este trabajo se han aplicado los dos métodos anteriormente citados de las velocidades de reacción y de producción.

Las velocidades de producción de cada uno de los compuestos clave, según el esquema de reacción, se pueden expresar como:

$$\begin{aligned}R_{DBT} &= -r_1 \\R_{DBTO} &= r_1 - r_2 \\R_{DBTO_2} &= r_2 - r_3 \\R_{HBP} &= r_4\end{aligned}\tag{4.25}$$

Aplicando el método de las velocidades de reacción, el sistema de ecuaciones diferenciales queda de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}r_1 &= -R_{DBT} \\r_2 &= -R_{DBT} - R_{DBTO} \\r_3 &= -R_{DBT} - R_{DBTO} - R_{DBTO_2} \\r_4 &= R_{HBP}\end{aligned}\tag{4.26}$$

que, en su forma integral, sería:

$$\begin{aligned}r_{S1} &= \int_0^t r_1 dt = -\Delta C_{DBT} \\r_{S2} &= \int_0^t r_2 dt = -\Delta C_{DBT} - \Delta C_{DBTO} \\r_{S3} &= \int_0^t r_3 dt = -\Delta C_{DBT} - \Delta C_{DBTO} - \Delta C_{DBTO_2} \\r_{S4} &= \int_0^t r_4 dt = \Delta C_{HBP}\end{aligned}\tag{4.27}$$

con todas las integrales definidas, con límites de 0 a t.

En este caso, la concentración de DBTO<sub>2</sub> es siempre nula, como ya se ha comentado en los apartados anteriores, por lo que no se puede determinar la velocidad de la reacción más rápida,  $r_3$ , y hay que imponer la siguiente condición:

$$r_2 = r_3\tag{4.28}$$

Se obtiene así un sistema de tres ecuaciones diferenciales, o integrales, dependiendo del método utilizado.

Los antecedentes que se encuentran en la literatura proponen ecuaciones de tipo potencial para las tres primeras reacciones de la ruta (desaparición de DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub>), como ya se ha comentado anteriormente. En este trabajo se ha utilizado el método de las velocidades de reacción en su forma diferencial para obtener la forma de las ecuaciones cinéticas de las reacciones de la ruta 4S, de manera que, una vez obtenidas las velocidades de cada una de las reacciones del esquema mediante la ecuación [4.23], se han propuesto ecuaciones cinéticas para cada reacción mediante la representación gráfica de las velocidades de reacción frente a la concentración de cada sustrato, observando, según la forma de esta representación, la ecuación cinética que ajustaría las velocidades de reacción en función de la concentración de los compuestos del esquema de reacción. Tras obtener así las ecuaciones cinéticas de cada reacción (ecuaciones [4.32], [4.33] y [4.34], que se muestran después), se ha aplicado el método de las velocidades de reacción en su forma integral para calcular los parámetros cinéticos de las ecuaciones propuestas, por regresión en simple respuesta de las ecuaciones [4.35], [4.36] y [4.37] (que también se muestran más adelante). Este método es el que se ha utilizado para el cálculo de parámetros porque conlleva menos error (García-Ochoa y col., 1998) debido al tipo de datos experimentales de que se dispone (datos de tipo integral, es decir, de concentración / tiempo). Finalmente, se ha aplicado el método de las velocidades de producción para, con el modelo cinético propuesto (compuesto por las ecuaciones [4.52], [4.53] y [4.54], mostradas más adelante), basado en las ecuaciones cinéticas obtenidas anteriormente, calcular los parámetros cinéticos utilizando como parámetros iniciales los obtenidos del método de velocidades de reacción en su forma integral.

#### **4.3.4. Método de las Velocidades de Reacción**

##### ***4.3.4.1. Aplicación del Método Diferencial***

Como ya ha sido comentado, el método de las velocidades de reacción se puede aplicar utilizando las ecuaciones de las velocidades de reacción en forma diferencial o integral. En este apartado se ha aplicado el método diferencial, por lo que se han calculado las velocidades de producción,  $R_j$ , para cada uno de los compuestos clave. Ajustando los datos experimentales a una función de tiempo conocida, se ha derivado ésta numéricamente y se han obtenido los valores de  $R_j$ . Las funciones de tiempo que se han utilizado para ajustar las concentraciones de los compuestos clave han sido las que muestran las ecuaciones [4.29], [4.30] y [4.31] para DBT, DBTO y HBP, respectivamente:

$$C_{DBT} = a + b \cdot \exp(-t / c) \quad [4.29]$$

$$C_{DBTO} = a' \cdot \exp(b' \cdot t) \cdot t^{c'} \quad [4.30]$$

$$C_{HBP} = a'' \cdot \exp(b'' \cdot t) \cdot t^{c''} \quad [4.31]$$

Así, el sistema está compuesto por el sistema de ecuaciones [4.26], donde las velocidades de producción son las derivadas numéricas de las ecuaciones [4.29] a [4.31].

Para proponer las ecuaciones cinéticas correspondientes a cada reacción, se han representado las velocidades de reacción, calculadas mediante las ecuaciones [4.26], frente a la concentración de sustrato de cada una de ellas. En las Figuras 4.12 a 4.16 se puede ver dicha representación gráfica.

En cuanto a la **reacción 1** (oxidación de DBT a DBTO), se puede observar en las Figuras 4.12 a 4.16, que sigue una cinética de tipo potencial de orden 1, representada por la ecuación [4.32], ya que para todas las horas de crecimiento, se obtiene una línea recta de pendiente positiva cuando se representa la velocidad de la reacción,  $r_l$ , frente a la concentración de sustrato, en este caso, DBT, así que la función de la composición para esta velocidad de reacción parece ser:

$$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT} \quad [4.32]$$

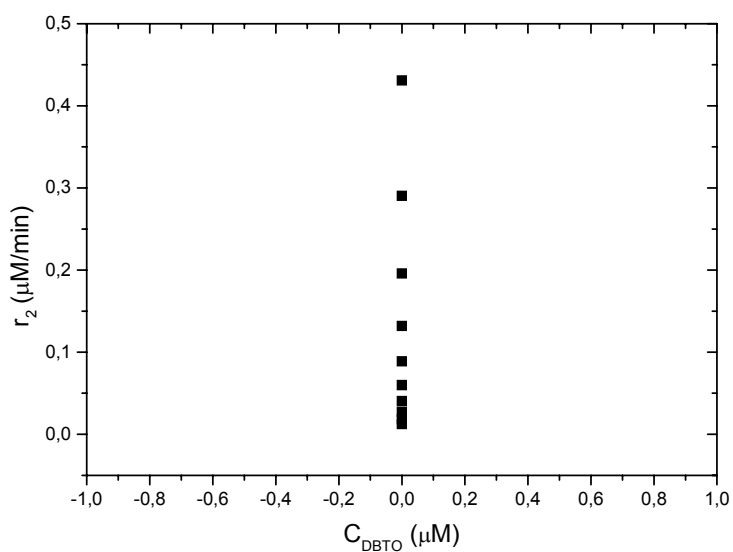
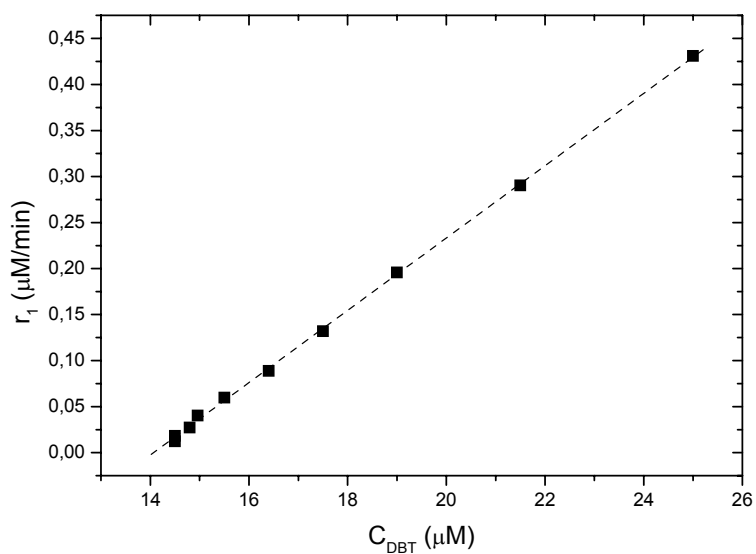
En el caso de la **reacción 2** (oxidación de DBTO a DBTO<sub>2</sub>), se aprecia en las Figuras 4.12 a 4.16 que la velocidad de reacción  $r_2$  no corresponde a una cinética de tipo potencial, como se puede observar al representar dicha velocidad frente a la concentración de DBTO. Tampoco corresponde a una curva típica de una ecuación hiperbólica. En este caso, se puede ver que la velocidad de la reacción aumenta al aumentar la concentración de sustrato, hasta llegar a un valor en que dicha velocidad de reacción aumenta aunque disminuye la concentración de DBTO. Por lo tanto, la velocidad de la reacción,  $r_2$ , se debe encontrar influenciada por la presencia de otros compuestos de la ruta. Esto puede ser indicativo de que existe un efecto negativo en la reacción por presencia del producto de la reacción. En el caso de la reacción 2, el producto es DBTO<sub>2</sub>, compuesto que no se observa en ninguno de los experimentos llevados a cabo, por lo que el efecto negativo puede estar causado por el producto de la reacción siguiente, HBPS. Para comprobar que este efecto está provocado por la presencia de HBPS, en la Figura 4.17 se ha representado la velocidad de la reacción,  $r_2$ , junto con las concentraciones de sustrato y producto,  $C_{DBTO}$  y  $C_{HBPS}$ , frente al tiempo del experimento, para un tiempo de crecimiento de 24h, representativo de todos los demás. En dicha Figura se observa que  $r_2$  disminuye a lo largo del tiempo, a pesar de que la concentración de DBTO permanece aproximadamente constante, lo cual puede ser debido al aumento de concentración de HBPS. Así, en la Figura 4.18 se ha representado la velocidad de la reacción,  $r_2$ , frente al cociente de concentraciones  $C_{DBTO}/C_{HBPS}$ , obteniendo una representación de tipo hiperbólico, lo cual demuestra que la función que corresponde a la velocidad de esta reacción es la que tiene en cuenta un efecto de inhibición por producto, es decir:

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}} \quad [4.33]$$

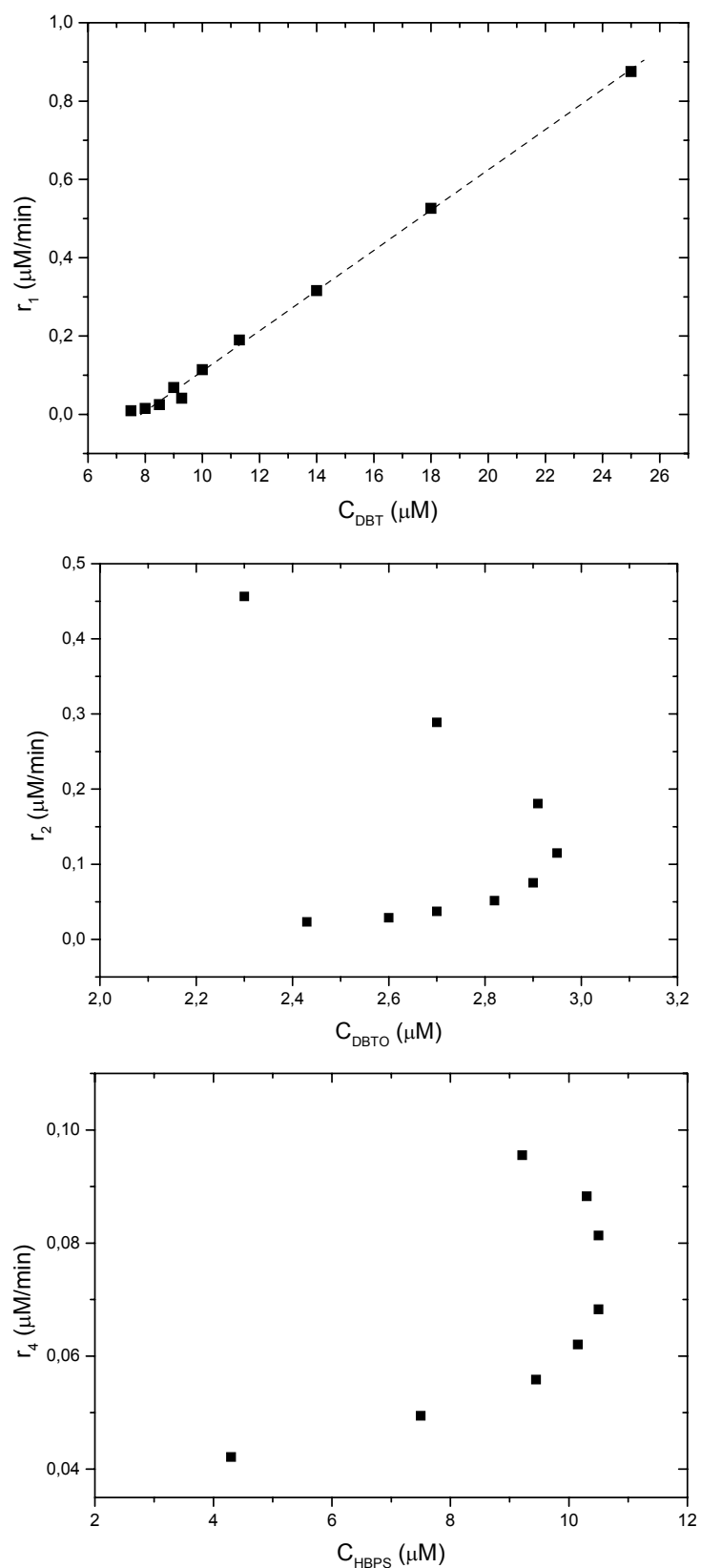
En cuanto a la **reacción 4** (hidrólisis de HBPS a HBP), en las Figuras 4.12 a 4.16, se representa la velocidad de dicha reacción frente a la concentración de sustrato, HBPS, observándose que, en este caso, tampoco se corresponde con una cinética de tipo potencial, ni de tipo hiperbólico respecto a la concentración de sustrato, si no que la velocidad de la reacción 4 se encuentra también influenciada por la concentración de otro compuesto. Para comprobar esta influencia se ha representado en la Figura 4.19 la velocidad de la reacción,  $r_4$ , y las concentraciones de sustrato y producto de esta reacción,  $C_{HBPS}$  y  $C_{HBP}$ . En esta Figura se observa que la velocidad de la reacción aumenta al aumentar la concentración de HBPS, y sigue aumentando incluso cuando la concentración de sustrato empieza a disminuir, lo cual puede deberse a un efecto autocatalítico por parte del HBP. Así, al representar la velocidad de la reacción frente al producto de concentraciones  $C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$ , se obtiene una línea recta de pendiente positiva, como se puede comprobar en la Figura 4.20, lo cual demuestra este efecto positivo del HBP sobre la velocidad de la reacción 4. Por lo tanto, en este caso, se propone la siguiente ecuación cinética para la reacción 4:

$$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP} \quad [4.34]$$

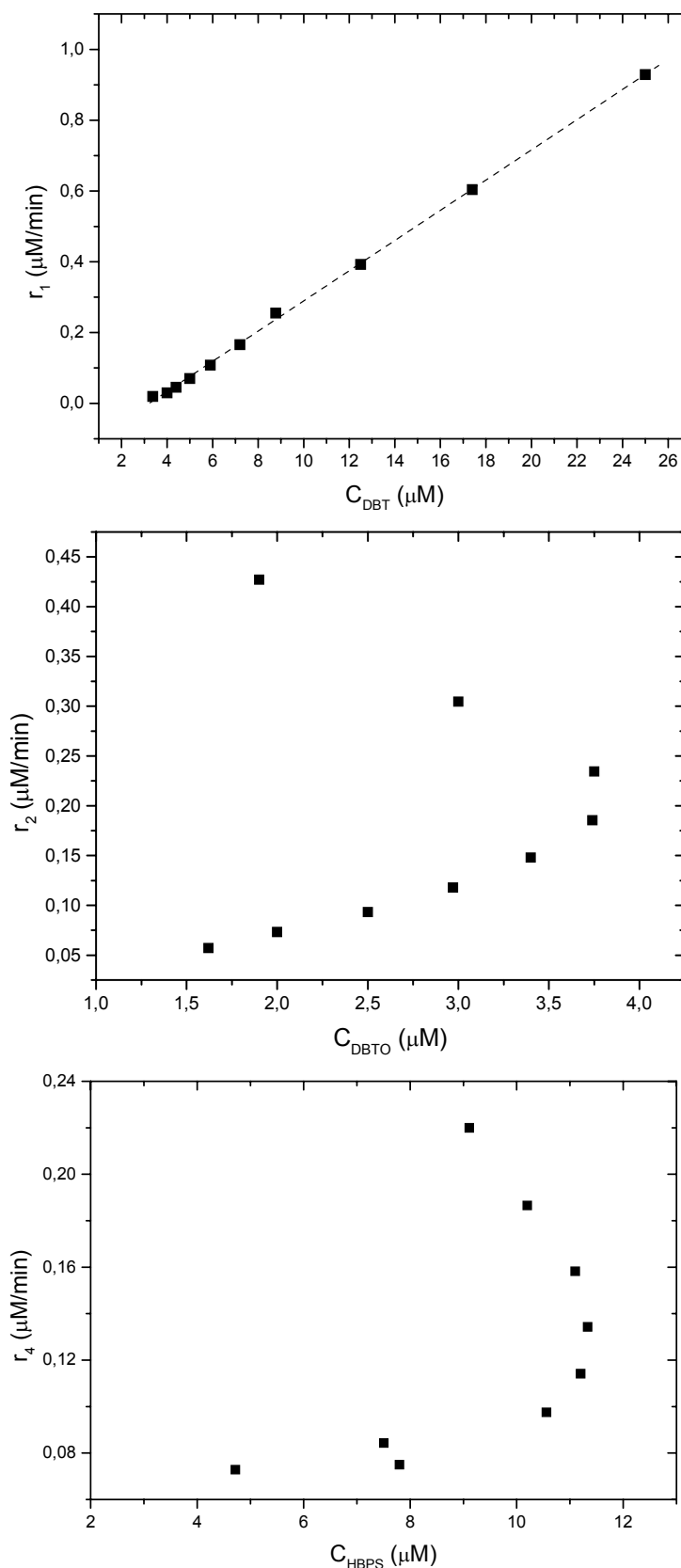




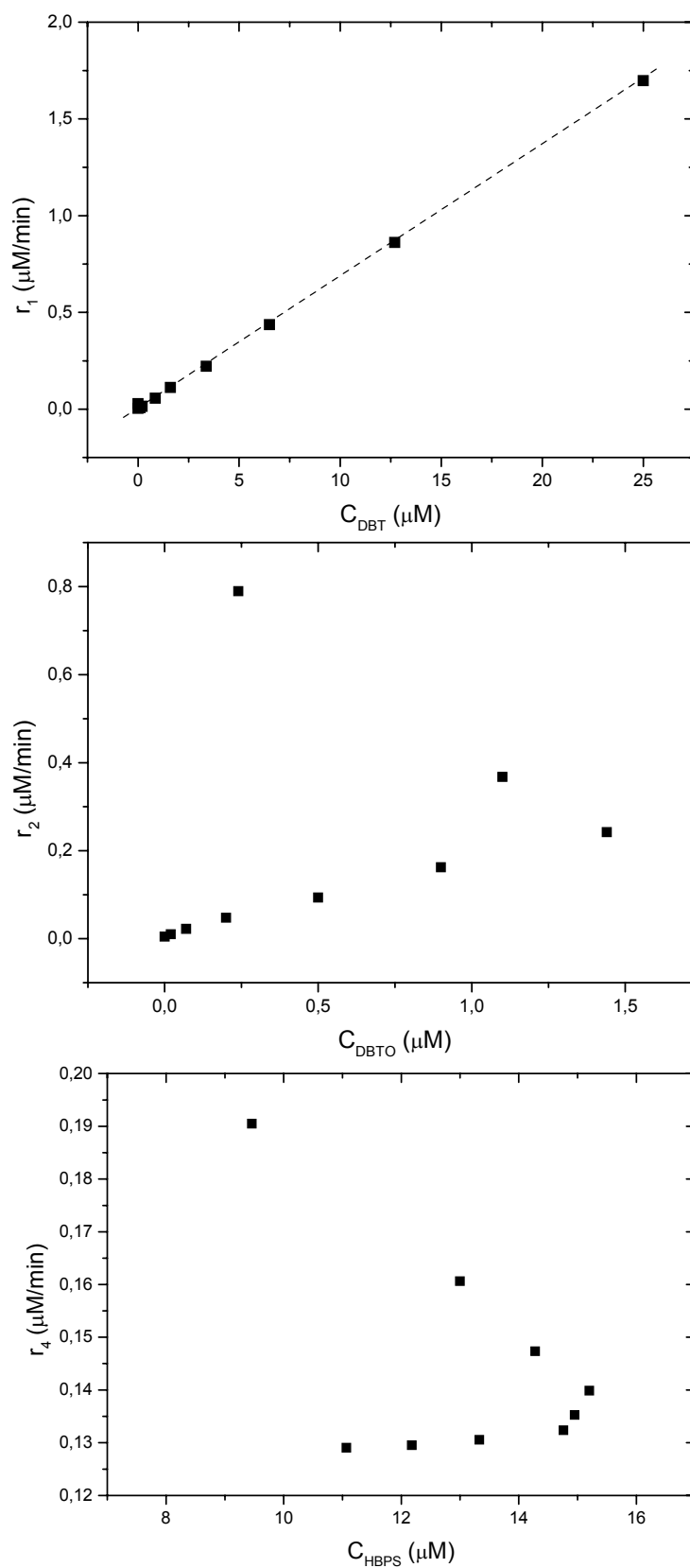
**Figura 4.12.** Representación gráfica de las velocidades de reacción ( $r_1$  y  $r_2$ ) vs. concentraciones de los diferentes sustratos, correspondientes al experimento **B-M10**, obtenidas aplicando el **método diferencial** de cálculo.



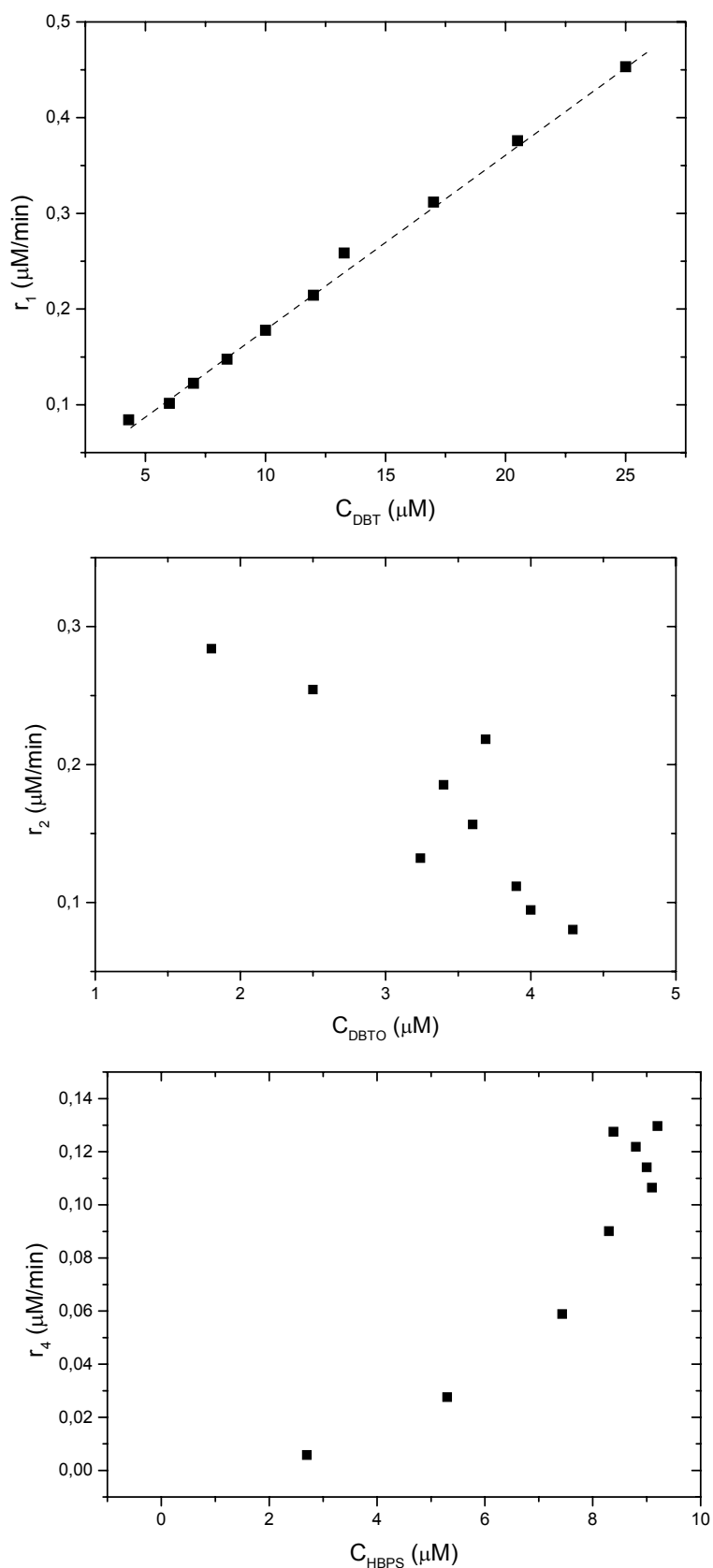
**Figura 4.13.** Representación gráfica de las velocidades de reacción ( $r_1$ ,  $r_2$  y  $r_4$ ) vs. concentraciones de los diferentes sustratos, correspondientes al experimento **B-M24**, obtenidas aplicando el **método diferencial** de cálculo.



**Figura 4.14.** Representación gráfica de las velocidades de reacción ( $r_1$ ,  $r_2$  y  $r_4$ ) vs. concentraciones de los diferentes sustratos, correspondientes al experimento **B-M33**, obtenidas aplicando el **método diferencial** de cálculo.



**Figura 4.15.** Representación gráfica de las velocidades de reacción ( $r_1$ ,  $r_2$  y  $r_4$ ) vs. concentraciones de los diferentes sustratos, correspondientes al experimento **B-M48**, obtenidas aplicando el **método diferencial** de cálculo.



**Figura 4.16.** Representación gráfica de las velocidades de reacción ( $r_1$ ,  $r_2$  y  $r_4$ ) vs. concentraciones de los diferentes sustratos, correspondientes al experimento **B-M58**, obtenidas aplicando el **método diferencial** de cálculo.

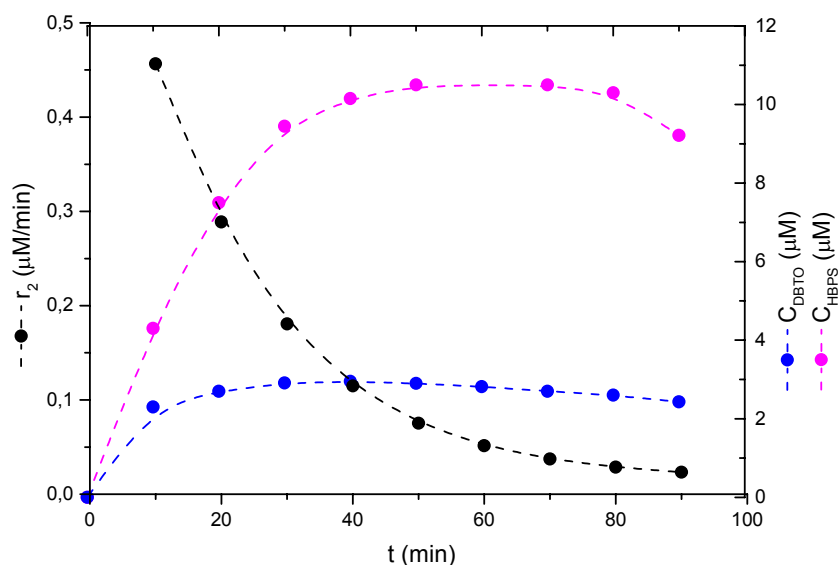


Figura 4.17. Representación gráfica de la velocidad de reacción  $r_2$ , junto con las concentraciones de DBTO y HBPS, correspondientes al experimento B-M24.

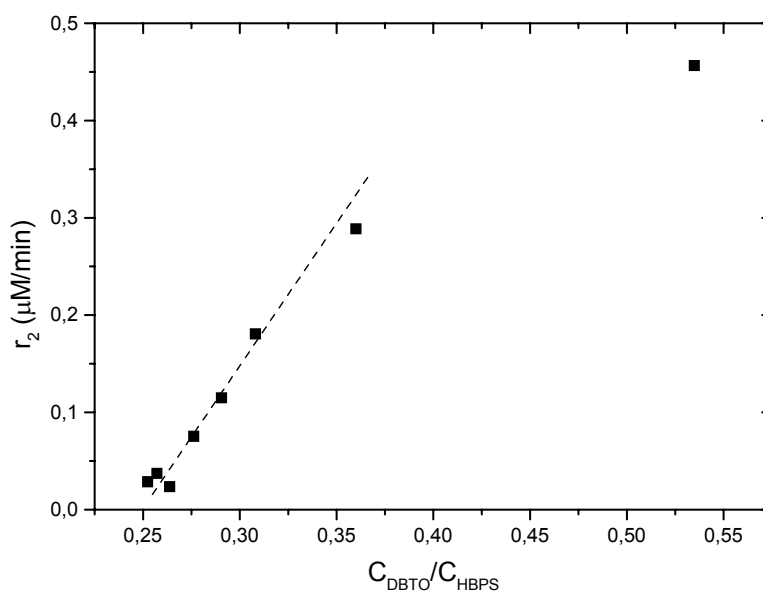
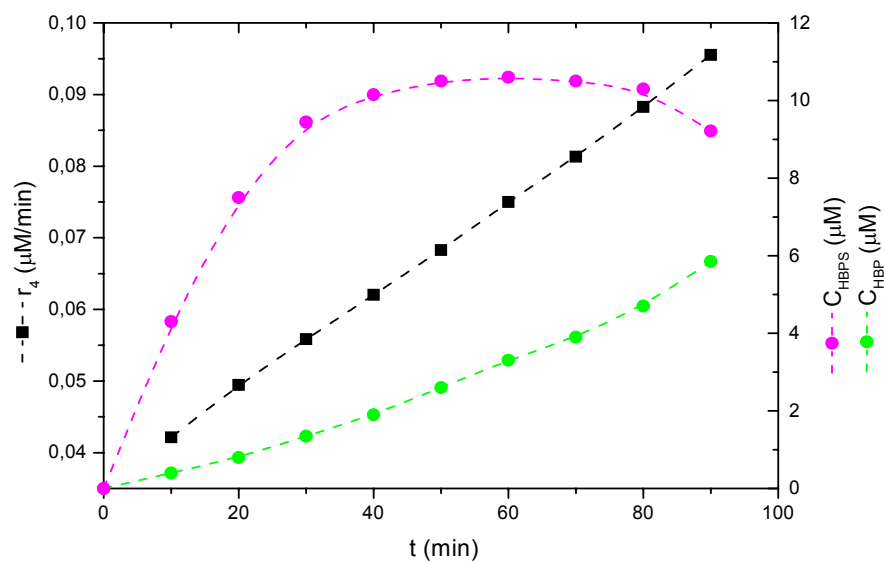
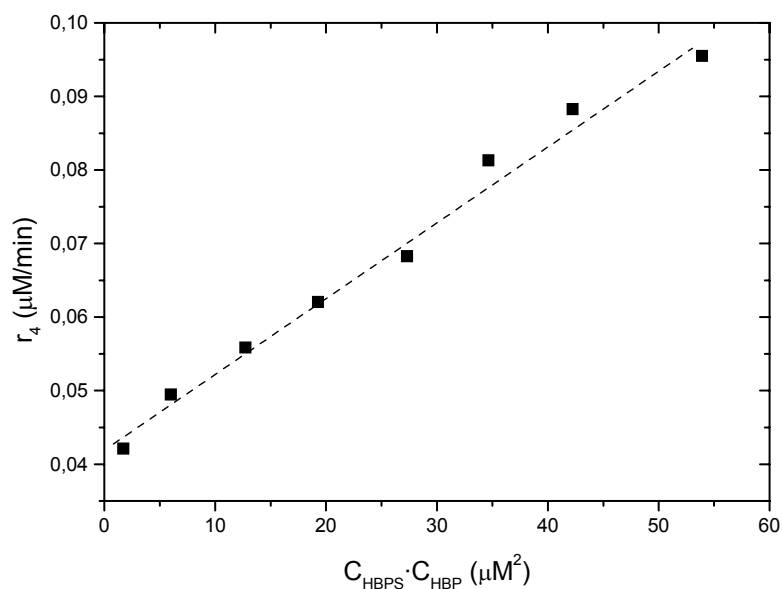


Figura 4.18. Representación gráfica de la velocidad de reacción  $r_2$  vs.  $C_{\text{DBTO}}/C_{\text{HBPS}}$ , correspondiente al experimento B-M24, obtenida aplicando el método diferencial de cálculo.



**Figura 4.19.** Representación gráfica de la velocidad de reacción  $r_4$ , junto con las concentraciones de HBPS y HBP, correspondientes al experimento **B-M24**.



**Figura 4.20.** Representación gráfica de la velocidad de reacción  $r_4$  vs.  $C_{\text{HBPS}} \cdot C_{\text{HBP}}$ , correspondiente al experimento **B-M24**, obtenida aplicando el **método diferencial** de cálculo.

#### **4.3.4.2. Aplicación del Método Integral**

Se ha aplicado el método integral de cálculo, utilizando el sistema de ecuaciones [4.27]. Como ya se ha comentado, la ventaja que presentan los métodos integrales frente a los diferenciales, cuando se dispone, como en este caso, de datos de concentración con el tiempo, es la mayor precisión de los métodos numéricos de integración frente a los de derivación (García-Ochoa y col., 1989b, 1990b). Por esa razón, en este trabajo se ha aplicado el método integral para calcular los parámetros cinéticos de las ecuaciones cinéticas que parecen razonables tras aplicar el método diferencial. Para ello, se han calculado las integrales de las velocidades de reacción, lo que se hace ajustando los datos experimentales de concentración de los compuestos clave a una función de tiempo conocida (ecuaciones [4.29] a [4.31]) e integrando numéricamente. Por otro lado, para calcular los parámetros cinéticos, las velocidades de reacción del sistema de ecuaciones [4.27] se han sustituido por las ecuaciones que se han ido eligiendo por aplicación del método diferencial, y los parámetros se han calculado mediante regresión en simple respuesta, lineal o no lineal, dependiendo del caso. El sistema de ecuaciones a resolver está compuesto por las ecuaciones [4.35], [4.36] y [4.37]:

$$r_{S1} = \int r_1 dt = -\Delta C_{DBT} = \int k_1 C_{DBT} dt \quad [4.35]$$

$$r_{S2} = \int r_2 dt = -\Delta C_{DBT} - \Delta C_{DBTO} = \int \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}} dt \quad [4.36]$$

$$r_{S4} = \int r_4 dt = -\Delta C_{HBP} = \int k_4 C_{HBPS} \cdot C_{HBP} dt \quad [4.37]$$

Los resultados obtenidos para las integrales de las velocidades de reacción,  $r_{Si}$ , aplicando el método integral de cálculo se muestran en las Tablas 4.11 a 4.15, en las que se resumen los parámetros cinéticos y los parámetros estadísticos (t de Student, F de Fischer) obtenidos del ajuste en simple respuesta. Además, se muestra un parámetro estadístico relacionado con la suma de residuos al cuadrado (SRC), que se define como:

$$SRC_r = \frac{\sum (y - y_e)^2}{\sum y_e^2} 100 \quad [4.38]$$



También se muestran en estas tablas los valores tabulados de los parámetros estadísticos (t de Student y F de Fischer) correspondientes a los grados de libertad y número de parámetros del ajuste en cada caso, para un nivel de confianza del 95%. En dichas tablas se observa que se cumplen los criterios estadísticos de discriminación de modelos cinéticos, ya que los valores de los parámetros estadísticos obtenidos por regresión son, en todos los casos, mayores que los valores tabulados para un nivel de confianza del 95%.

En las Figuras 4.21 a 4.25 se representan los valores experimentales y los valores predichos por los ajustes realizados a las ecuaciones propuestas, para las integrales de las velocidades de reacción  $r_1$ ,  $r_2$  y  $r_4$  para cada uno de los experimentos realizados con las células obtenidas a distintos tiempos de crecimiento. Se puede observar, en dichas Figuras, que las ecuaciones cinéticas propuestas para cada una de las reacciones ajustan bien los datos experimentales, excepto para las células obtenidas a 10 h de crecimiento en la reacción 2, ya que en estas células existe una desviación del comportamiento con respecto a los demás casos. Así, se puede decir que el primer paso de la ruta 4S (oxidación de DBT a DBTO) sigue una cinética de tipo potencial de orden 1, es decir, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Por otra parte, la segunda reacción de la ruta de desulfuración (oxidación de DBTO a DBTO<sub>2</sub>) sigue una cinética hiperbólica en la que el producto de la tercera reacción, HBPS, presenta un efecto de inhibición sobre la velocidad de la reacción. Por último, la última reacción de la ruta 4S (hidrólisis de HBPS a HBP) se rige por una cinética de tipo potencial de orden 2, en la que la velocidad de la reacción es directamente proporcional al producto de las concentraciones de HBPS y HBP, es decir, el producto de la reacción, HBP, ejerce un efecto autocatalítico sobre dicha reacción.

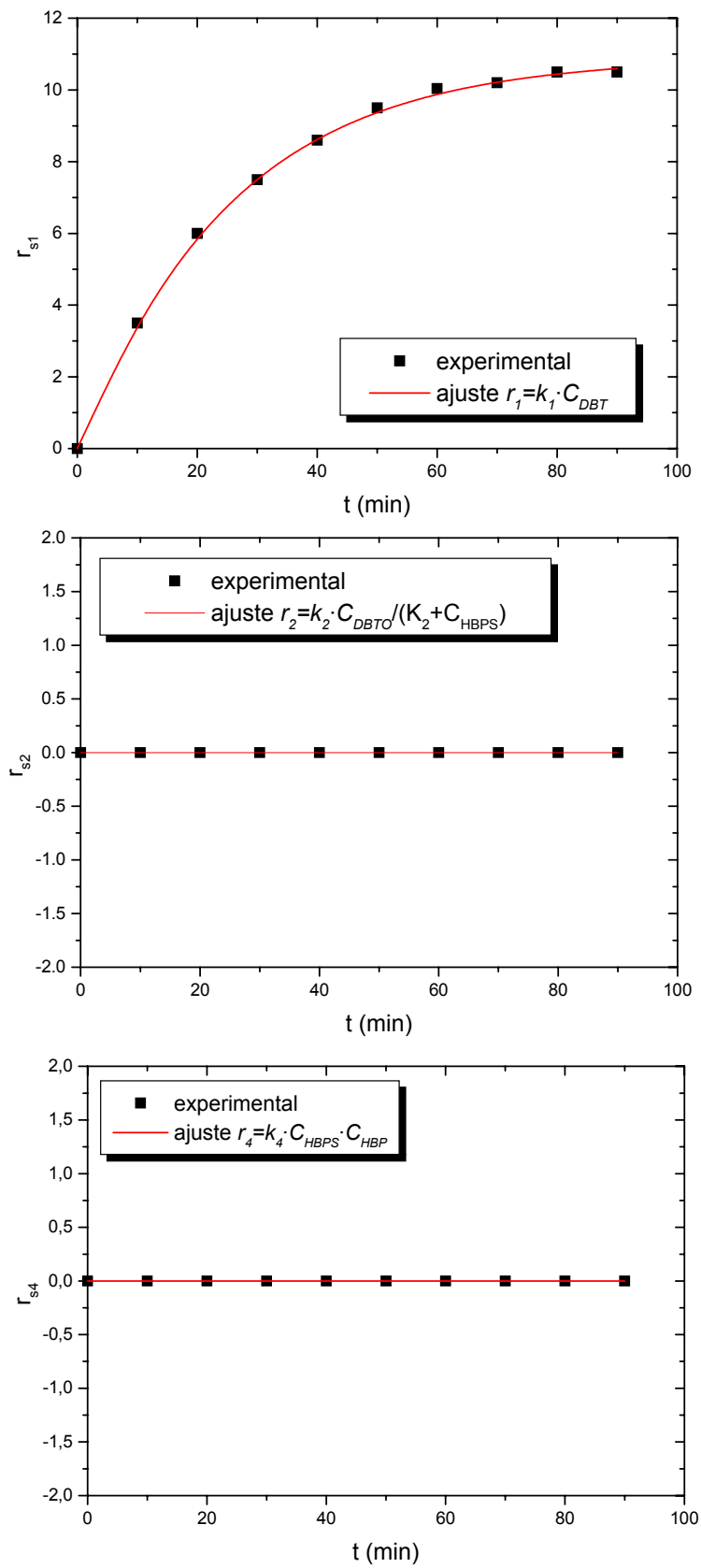


Figura 4.21. Ajuste de los datos correspondientes al experimento B-M10 en simple respuesta, utilizando el método integral de cálculo.

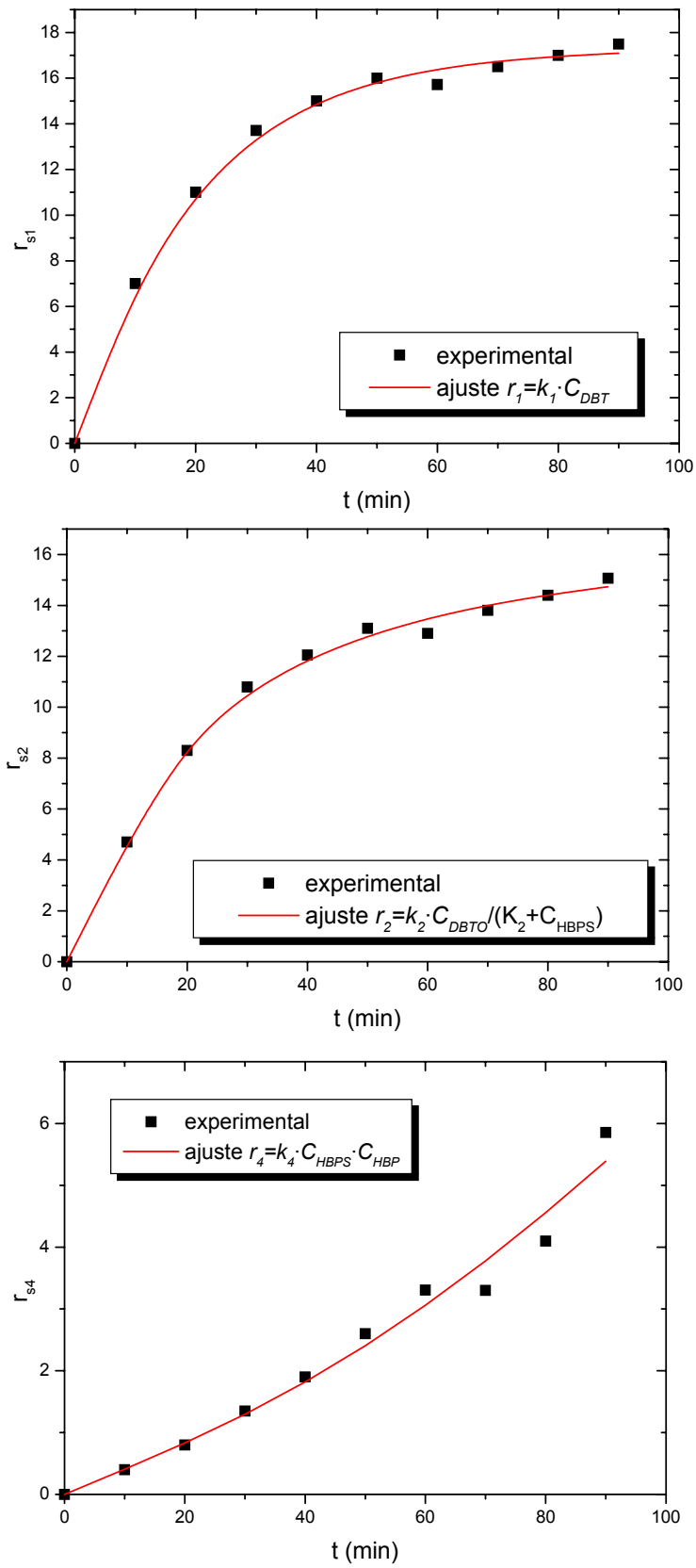


Figura 4.22. Ajuste de los datos correspondientes al experimento B-M24 en simple respuesta, utilizando el método integral de cálculo.

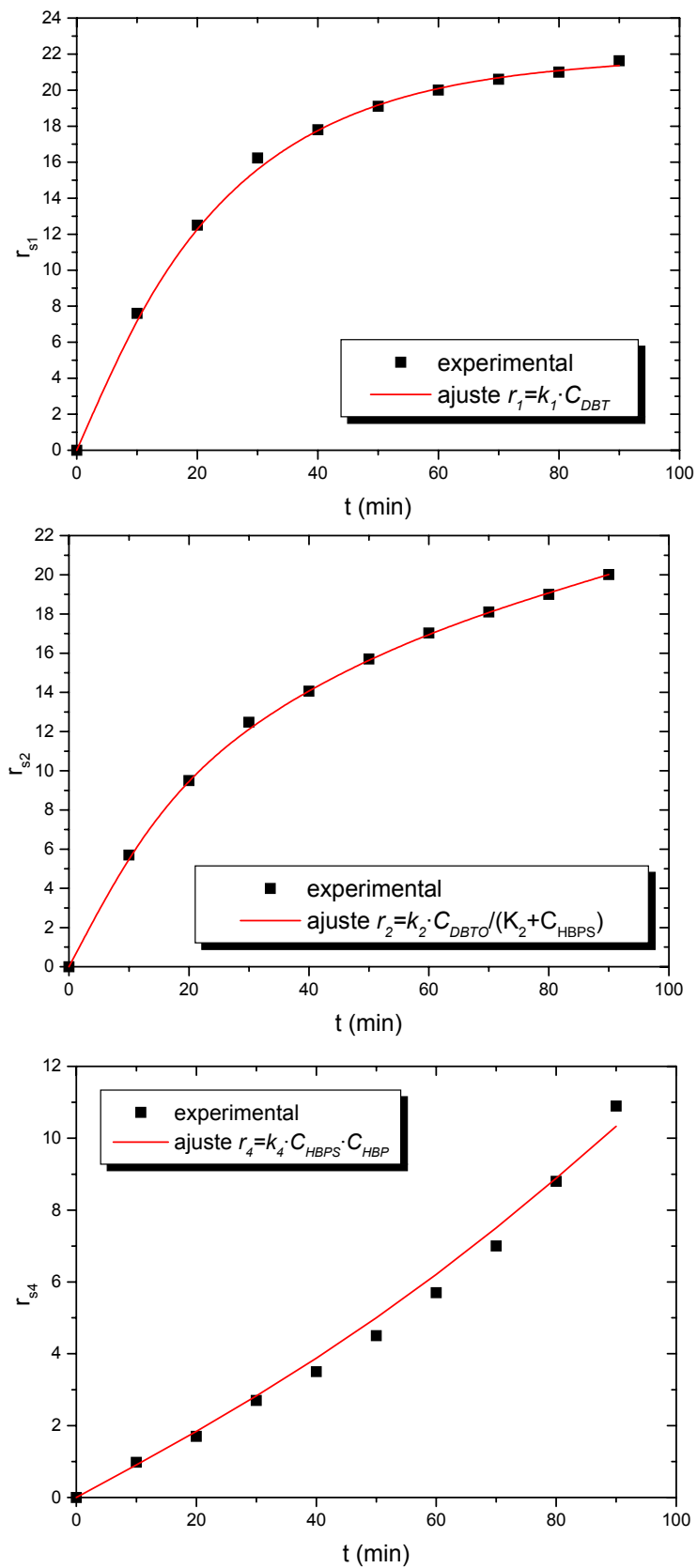


Figura 4.23. Ajuste de los datos correspondientes al experimento B-M33 en simple respuesta, utilizando el método integral de cálculo.

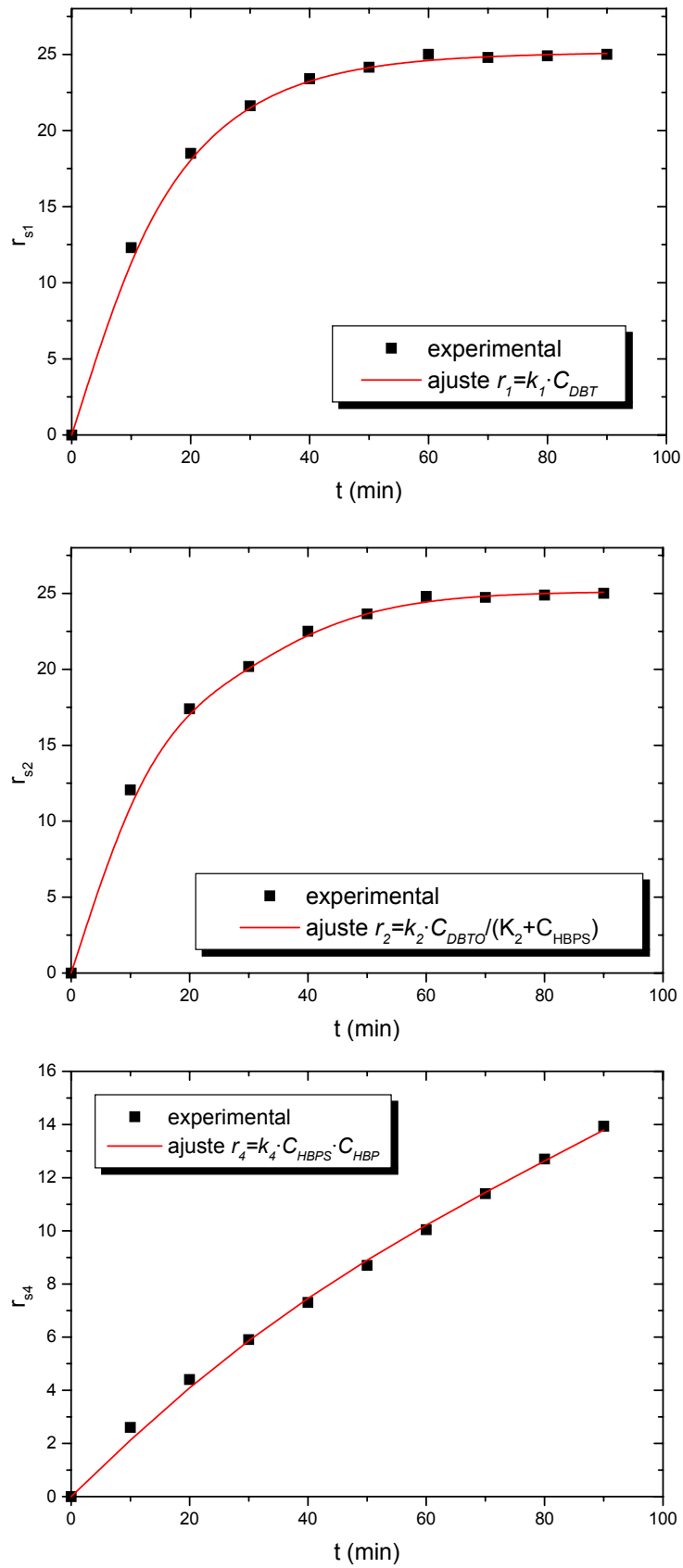


Figura 4.24. Ajuste de los datos correspondientes al experimento B-M48 en simple respuesta, utilizando el método integral de cálculo.

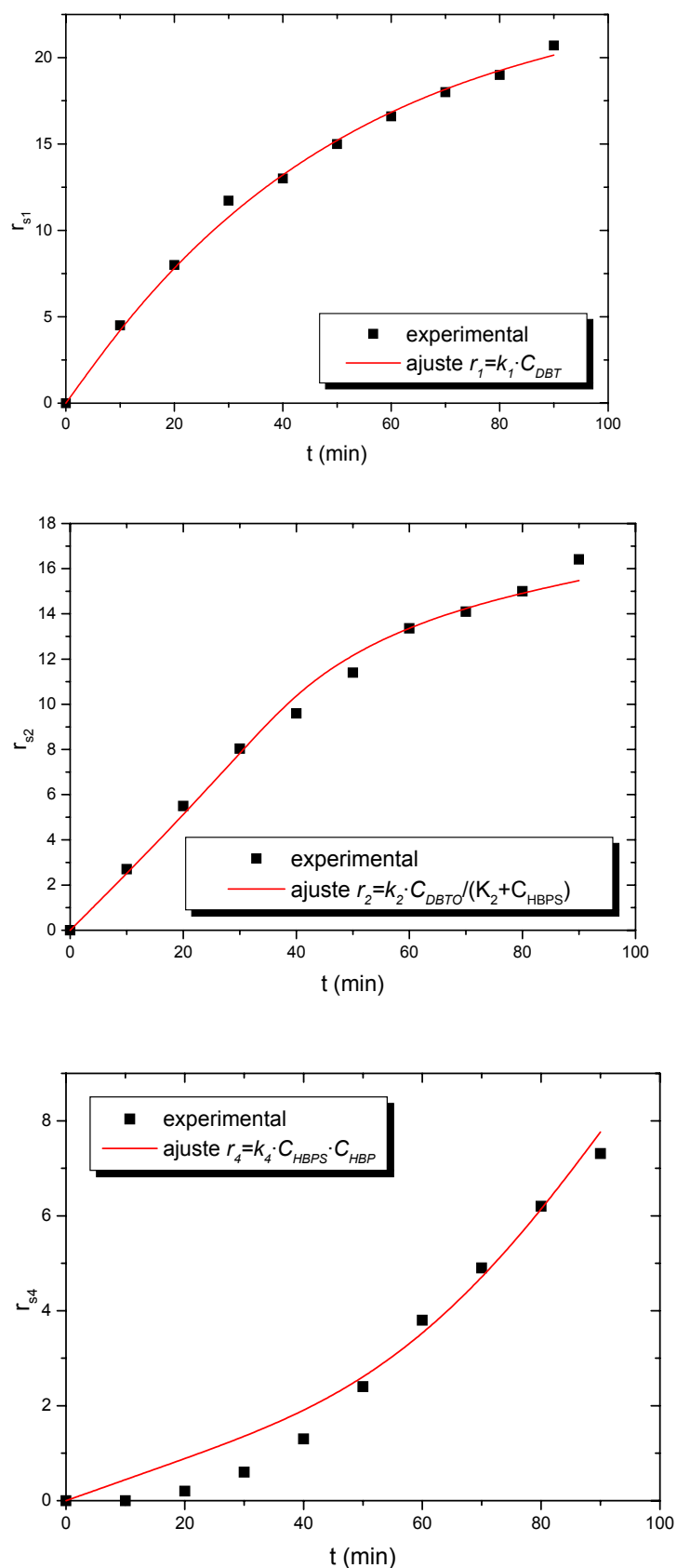


Figura 4.25. Ajuste de los datos correspondientes al experimento B-M58 en simple respuesta, utilizando el método integral de cálculo.

**Tabla 4.11.** Parámetros cinéticos y estadísticos calculados por ajuste lineal de los datos del experimento **B-M10** en simple respuesta por el **método integral**. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			<b>Calc</b>	<b>Tab</b>	<b>Calc</b>	<b>Tab</b>	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	<b><i>k</i><sub>1</sub></b>	$3,27 \cdot 10^{-2} \pm 0,09 \cdot 10^{-2}$	77,7	2,26	46400	5,12	0,6
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	<b><i>k</i><sub>2</sub></b>	$7,55 \cdot 10^1 \pm 1,50 \cdot 10^1$	11,4	2,31	129	4,46	0
	<b><i>K</i><sub>2</sub></b>	$4,79 \pm 1,50$	15,7				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	<b><i>k</i><sub>4</sub></b>	$1,43 \cdot 10^{-5} \pm 0,67 \cdot 10^{-5}$	4,70	2,26	52,6	5,12	0

**Tabla 4.12.** Parámetros cinéticos y estadísticos calculados por ajuste lineal de los datos del experimento **B-M24** en simple respuesta por el **método integral**. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub> (%)</i>
			<b>Calc</b>	<b>Tab</b>	<b>Calc</b>	<b>Tab</b>	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	<b><math>k_1</math></b>	$3,97 \cdot 10^{-2} \pm 0,22 \cdot 10^{-2}$	40,5	2,26	9621	5,12	2,7
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	<b><math>k_2</math></b>	$6,09 \cdot 10^{-2} \pm 0,45 \cdot 10^{-2}$	30,9	2,31	7226	4,46	2,1
	<b><math>K_2</math></b>	$4,62 \pm 0,89$	11,9				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	<b><math>k_4</math></b>	$9,13 \cdot 10^{-4} \pm 7,47 \cdot 10^{-4}$	2,82	2,26	447,5	5,12	8,5



**Tabla 4.13.** Parámetros cinéticos y estadísticos calculados por ajuste lineal de los datos del experimento **B-M33** en simple respuesta por el **método integral**. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub> (%)</i>
			<b>Calc</b>	<b>Tab</b>	<b>Calc</b>	<b>Tab</b>	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	<b><i>k</i><sub>1</sub></b>	$4,52 \cdot 10^{-2} \pm 0,12 \cdot 10^{-2}$	69,2	2,26	33528	5,12	1,1
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	<b><i>k</i><sub>2</sub></b>	$4,46 \cdot 10^{-1} \pm 0,35 \cdot 10^{-1}$	53,8	2,31	10058	4,46	0,3
	<b><i>K</i><sub>2</sub></b>	$4,98 \pm 0,62$	15,2				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	<b><i>k</i><sub>4</sub></b>	$1,25 \cdot 10^{-3} \pm 0,97 \cdot 10^{-3}$	2,75	2,26	350,6	5,12	4,8

**Tabla 4.14.** Parámetros cinéticos y estadísticos calculados por ajuste lineal de los datos del experimento **B-M48** en simple respuesta por el **método integral**. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$4,91 \cdot 10^{-2} \pm 0,07 \cdot 10^{-2}$	154	2,26	99261	5,12	0,7
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$8,87 \pm 0,05$	130	2,31	15261	4,46	0,9
	$K_2$	$5,02 \pm 0,09$	31,7				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$1,34 \cdot 10^{-3} \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$	40,8	2,26	1564	5,12	1,3

**Tabla 4.15.** Parámetros cinéticos y estadísticos calculados por ajuste lineal de los datos del experimento **B-M58** en simple respuesta por el **método integral**. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub> (%)</i>
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$1,85 \cdot 10^{-2} \pm 0,26 \cdot 10^{-2}$	16,3	2,26	5602	5,12	2,3
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$4,90 \cdot 10^{-2} \pm 0,64 \cdot 10^{-2}$	22,4	2,31	5214	4,46	6,2
	$K_2$	$4,51 \pm 0,99$	7,96				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$1,23 \cdot 10^{-3} \pm 0,47 \cdot 10^{-3}$	2,54	2,26	155,5	5,12	6,3

#### **4.3.5. Método de las Velocidades de Producción**

El método de las velocidades de producción, como ya se ha mencionado, consiste en aplicar el sistema de ecuaciones diferenciales formado por la ecuación [4.25]. Las velocidades de reacción se sustituyen, en cada caso, por las ecuaciones cinéticas obtenidas aplicando el método de las velocidades de reacción, es decir, por las ecuaciones [4.32], [4.33] y [4.34], que corresponden, respectivamente, a una cinética de tipo potencial de orden 1 para la reacción 1, de tipo hiperbólico con efecto de inhibición por HBPS para la reacción 2, y de tipo potencial de orden 2 con respecto a sustrato y producto para la reacción 4 de la ruta de desulfuración. Así, el modelo cinético queda formulado por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$R_{DBT} = -(k_1 \cdot C_{DBT}) \quad [4.39]$$

$$R_{DBTO} = k_1 \cdot C_{DBT} - \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}} \quad [4.40]$$

$$R_{HBP} = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP} \quad [4.41]$$

Aplicando este método, el ajuste para el cálculo de los parámetros se ha realizado en múltiple respuesta. En las Figuras 4.26 a 4.30 se puede ver la representación gráfica de las predicciones de las evoluciones de los compuestos clave de la ruta 4S, obtenidas del ajuste de los datos experimentales por regresión no lineal en múltiple respuesta. En estas gráficas se representan también los valores calculados para las concentraciones de DBTO<sub>2</sub> y HBPS. En el primer caso, se ha supuesto un valor nulo, ya que no se detecta por análisis en ninguna de las muestras analizadas; en el segundo caso, como quedó patente en el estudio estequiométrico del sistema objeto de estudio, la concentración de los compuestos no clave se puede obtener a partir de la concentración de los compuestos clave, por lo tanto dicha concentración se puede calcular:

$$\Delta C_{HBPS} = \Delta C_{DBT} - \Delta C_{DBTO} - \Delta C_{DBTO_2} - \Delta C_{HBP} \quad [4.42]$$

Los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos aplicando el modelo, se recogen en las Tablas 4.16 a 4.20, donde se muestran también los valores de los parámetros estadísticos tabulados para un nivel de confianza del 95%. En dichas tablas se observa que se cumplen los criterios estadísticos de discriminación de modelos cinéticos. Los criterios estadísticos están basados en la comparación de los valores de los parámetros estadísticos F de Fischer y t de Student, obtenidos del ajuste por regresión de los datos experimentales con los valores tabulados, siendo bueno aquel modelo que presente estos valores más altos que los valores tabulados para un determinado intervalo de confianza. Para realizar discriminación entre modelos, también pueden compararse los valores de la suma de residuos al cuadrado, considerando prácticamente iguales aquellos que estén por debajo del error experimental, concepto aplicable a todos los parámetros. En cuanto a los criterios físicos (o impuestos), son dos: el primero de ellos es la exigencia de obtener valores positivos de los parámetros en todos los ajustes realizados con el modelo propuesto; el segundo criterio es la observación de una variación lógica de los parámetros obtenidos en los modelos propuestos en los diferentes experimentos, es decir, con las variables que se estudian (García-Ochoa y col., 1990, 1992).

Con respecto a los criterios estadísticos, se cumplen en todos los casos, presentando los parámetros estadísticos valores mayores que los tabulados para el nivel de confianza fijado. En cuanto a los criterios físicos, se cumplen ambos, ya que no se ha obtenido ningún valor negativo para ninguno de los parámetros del modelo, y el modelo presenta una evolución coherente de sus parámetros con el tiempo.

En la Figura 4.31 se ha representado la evolución de los parámetros cinéticos obtenidos con el tiempo de crecimiento del microorganismo, utilizando el modelo cinético propuesto y aplicando los métodos de las velocidades de reacción y de producción. En dicha figura se puede observar que los valores de los parámetros obtenidos por ambos métodos son muy similares, encontrándose sólo diferencias en los intervalos de confianza de dichos parámetros (siendo éstos menores cuando se aplica el método de las velocidades de producción, en el que la regresión se realiza en múltiple respuesta y el número de datos es mayor).

En cuanto al significado físico de los parámetros del modelo, suponiendo reacciones cinéticas de tipo Michaelis-Menten, el parámetro  $k_i$  engloba el producto de la concentración de enzima que cataliza esa reacción por la constante cinética de dicha reacción. Por tanto, su valor debe ser distinto para cada una de las reacciones de la ruta 4S y para cada uno de los experimentos realizados con células de diferentes horas de crecimiento. Por otro lado, la constante  $K_2$  debe ser la misma, independientemente de la hora de crecimiento a la que se haya obtenido el biocatalizador, ya que no depende de la concentración de enzima en este caso, ni de la afinidad de la enzima por el sustrato, sino solamente del tipo de enzima.

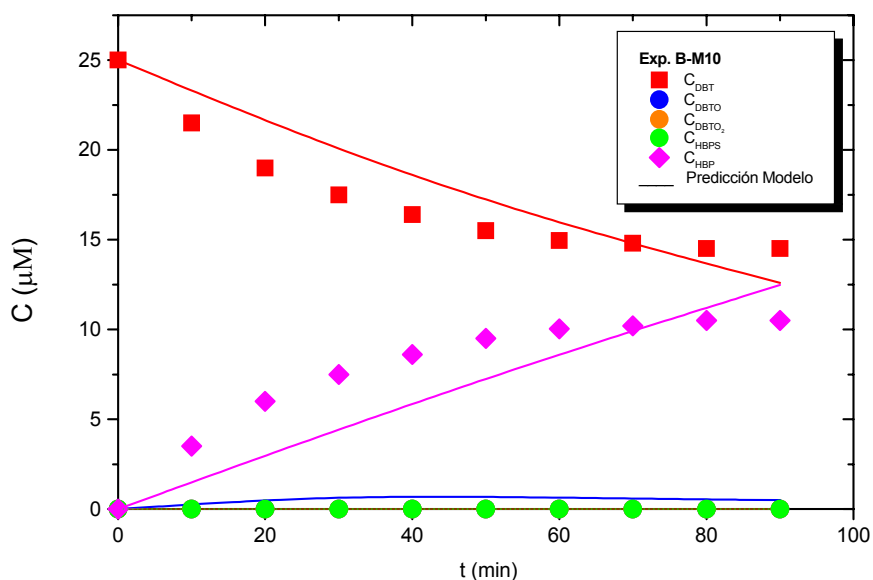
Según ambos métodos (Velocidades de Reacción y Velocidades de Producción), el modelo propuesto predice una evolución del parámetro  $k_1$  (como se observa en la Figura 4.31) con un máximo a las 48 h de crecimiento, indicando que el producto de la concentración de enzima por la constante cinética de la reacción es máximo en las células que se obtienen a ese tiempo de crecimiento, es decir, que la actividad de esa enzima es máxima en dichas células.

En cuanto al parámetro  $k_2$ , el valor obtenido en el experimento B-M10 es muy alto comparado con los demás debido a que en ese experimento,  $C_{DBTO} = 0$ , de forma que el modelo debe predecir un valor de  $k_2$  con tendencia a infinito. Sin embargo, este resultado no tiene sentido físico, por lo que no se ha considerado en la representación gráfica de la Figura 4.31. Así, en dicha figura se puede observar que el modelo predice un valor máximo del parámetro  $k_2$  valores máximos de éste a las 48 h de crecimiento, lo cual implica que la actividad de la enzima DszC es máxima a las 48 h de crecimiento.

En relación a  $k_4$ , de nuevo ambos métodos predicen un valor máximo para las células obtenidas a las 48 h de crecimiento. Ambos modelos también predicen un valor muy cercano al cero para las células obtenidas tras 10 h de crecimiento, lo que concuerda con el hecho experimental de que, utilizando estas células para llevar a cabo la biodesulfuración, no existe formación de HBP, es decir, no se da la última reacción de la ruta 4S.

En resumen, en las condiciones en que se ha estudiado la biodesulfuración de DBT con biocatalizador obtenido a distintas horas de crecimiento, el modelo predice valores máximos de  $k_i$  con las células procedentes de un cultivo llevado a cabo durante 48 h.

Finalmente, si se observan los valores de la constante  $K_2$  en la Figura 4.31, queda reflejado que es constante, independientemente de la hora de crecimiento a la que se hayan obtenido esas células, lo cual supone una evolución coherente de este parámetro con el tiempo.



**Figura 4.26.** Evolución de los compuestos de la ruta 4S obtenida por ajuste de los datos experimentales en **múltiple respuesta** correspondientes al experimento B-M10 al modelo propuesto.

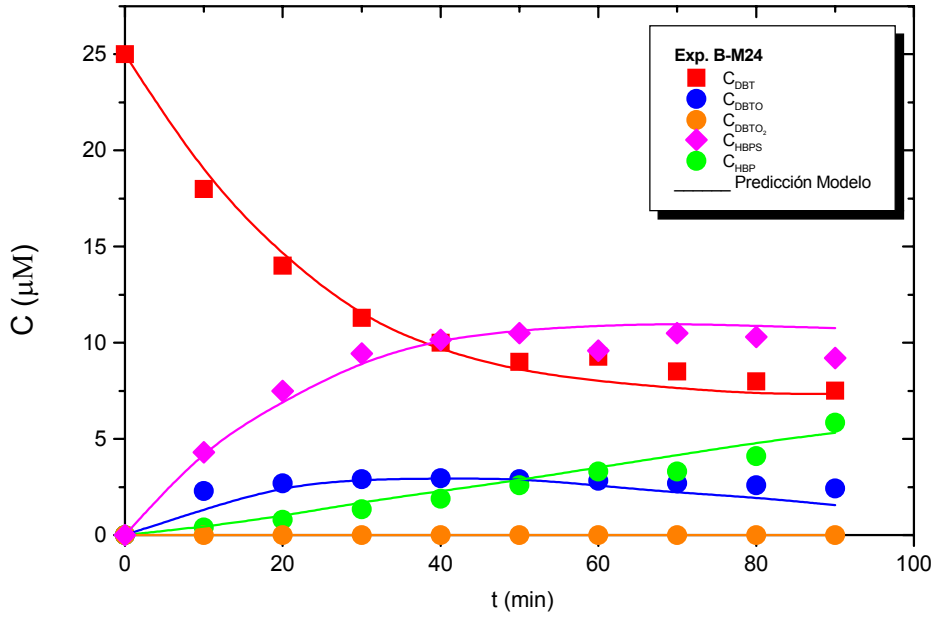


Figura 4.27. Evolución de los compuestos de la ruta 4S obtenida por ajuste de los datos experimentales en **múltiple respuesta** correspondientes al experimento **B-M24** al modelo propuesto.

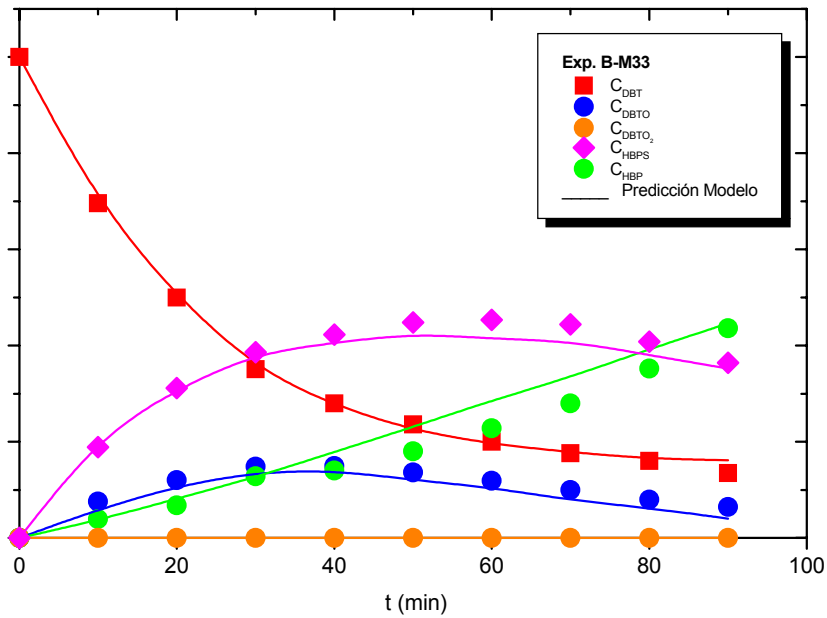
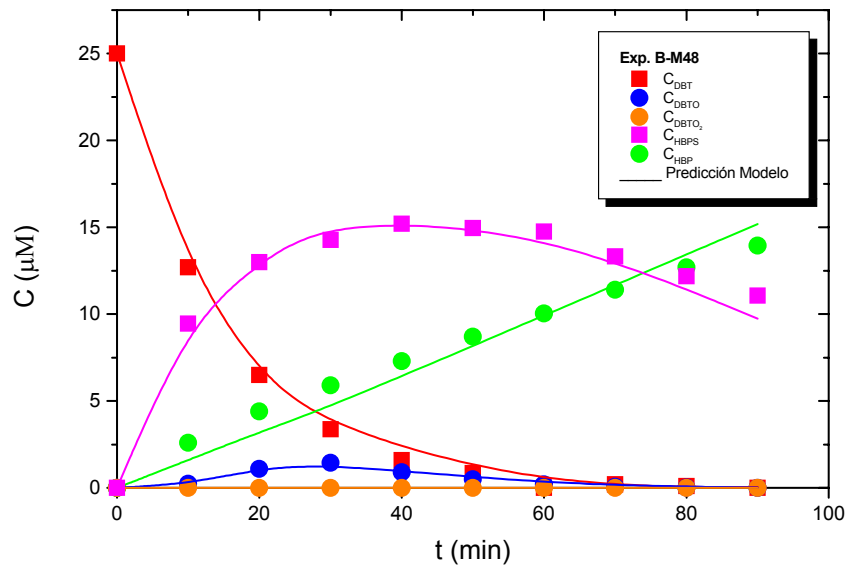
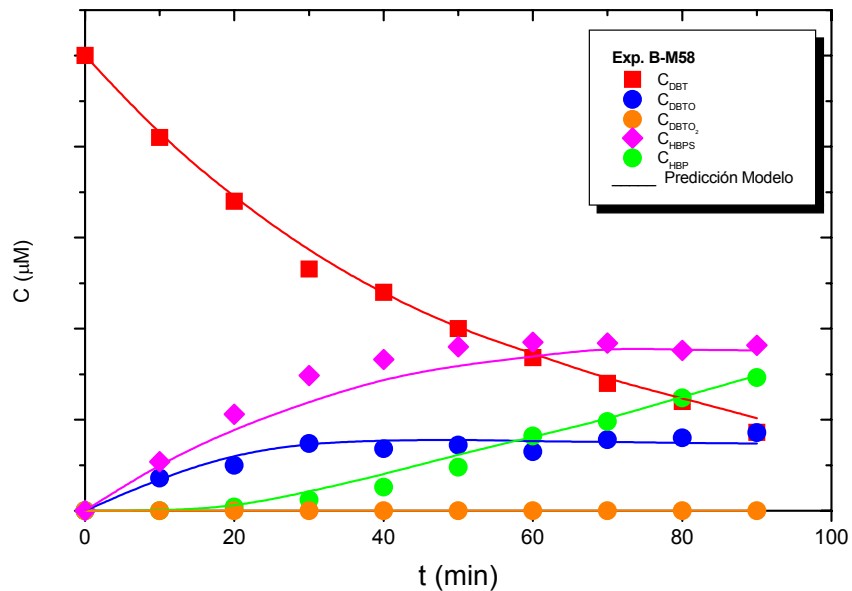


Figura 4.28. Evolución de los compuestos de la ruta 4S obtenida por ajuste de los datos experimentales en **múltiple respuesta** correspondientes al experimento **B-M33** al modelo propuesto.





**Figura 4.29.** Evolución de los compuestos de la ruta 4S obtenida por ajuste de los datos experimentales en **múltiple respuesta** correspondientes al experimento **B-M48** al modelo propuesto.



**Figura 4.30.** Evolución de los compuestos de la ruta 4S obtenida por ajuste de los datos experimentales en **múltiple respuesta** correspondientes al experimento **B-M58** al modelo propuesto.

**Tabla 4.16.** Parámetros cinéticos de calculados por ajuste de los datos del experimento **B-M10** en **múltiple respuesta** al modelo propuesto. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$3,00 \cdot 10^{-2} \pm 0,01 \cdot 10^{-4}$	$4,85 \cdot 10^4$	2,06	1453	2,74	25,8
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$76,53 \pm 10,8$	$1,24 \cdot 10^1$				
	$K_2$	$4,51 \pm 0,91$	$2,27 \cdot 10^1$				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$1,43 \cdot 10^{-5} \pm 0,07 \cdot 10^{-5}$	$6,82 \cdot 10^1$				

**Tabla 4.17.** Parámetros cinéticos calculados por ajuste de los datos del experimento **B-M24** en **múltiple respuesta** al modelo propuesto. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$3,84 \cdot 10^{-2} \pm 0,02 \cdot 10^{-4}$	$2,82 \cdot 10^4$	2,06	856,6	2,74	3,6
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$6,96 \cdot 10^{-2} \pm 0,01 \cdot 10^{-2}$	$1,71 \cdot 10^3$				
	$K_2$	$4,64 \pm 0,02$	$1,07 \cdot 10^2$				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$9,23 \cdot 10^{-4} \pm 0,07 \cdot 10^{-4}$	$6,28 \cdot 10^2$				

**Tabla 4.18.** Parámetros cinéticos calculados por ajuste de los datos del experimento **B-M33** en **múltiple respuesta** al modelo propuesto. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$4,25 \cdot 10^{-2} \pm 0,01 \cdot 10^{-5}$	$2,23 \cdot 10^5$	2,06	1236	2,74	1,9
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$3,08 \cdot 10^{-1} \pm 0,07 \cdot 10^{-1}$	$1,24 \cdot 10^2$				
	$K_2$	$4,99 \pm 0,16$	$9,69 \cdot 10^1$				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$1,09 \cdot 10^{-3} \pm 0,05 \cdot 10^{-4}$	$3,95 \cdot 10^1$				

**Tabla 4.19.** Parámetros cinéticos calculados por ajuste de los datos del experimento **B-M48** en **múltiple respuesta** al modelo propuesto. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>1-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$4,98 \cdot 10^{-2} \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$	$1,97 \cdot 10^7$	2,06	1084	2,74	0,9
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$9,05 \pm 0,01 \cdot 10^{-1}$	$4,09 \cdot 10^4$				
	$K_2$	$4,87 \pm 0,07$	$5,44 \cdot 10^3$				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$1,45 \cdot 10^{-3} \pm 0,02 \cdot 10^{-3}$	$3,95 \cdot 10^1$				

**Tabla 4.20.** Parámetros cinéticos de calculados por ajuste de los datos del experimento **B-M58** en **múltiple respuesta** al modelo propuesto. Los valores de los parámetros estadísticos tabulados se corresponden a un intervalo de confianza del 95%.

<i>Ecuación Cinética</i>	<i>Parámetros cinéticos</i>		<i>t Student</i>		<i>F Fischer</i>		<i>I-SRC<sub>r</sub></i> (%)
			Calc	Tab	Calc	Tab	
$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$	$k_1$	$1,78 \cdot 10^{-2} \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$	$8,35 \cdot 10^1$	2,06	947,9	2,74	5,4
$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$	$k_2$	$2,58 \cdot 10^{-2} \pm 0,12 \cdot 10^{-2}$	$4,80 \cdot 10^1$				
	$K_2$	$4,62 \pm 0,95$	$2,28 \cdot 10^1$				
$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$	$k_4$	$8,52 \cdot 10^{-4} \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$	$3,78 \cdot 10^2$				

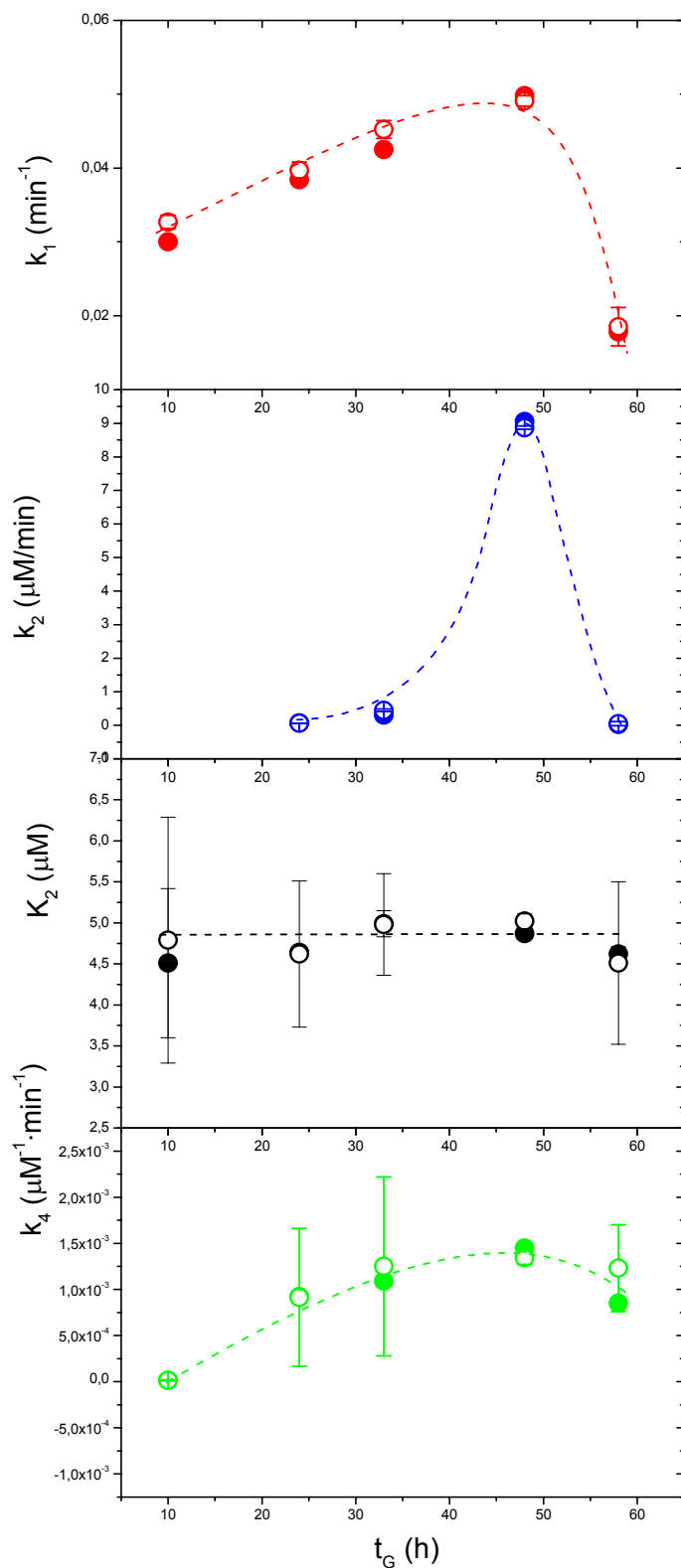


Figura 4.31. Evolución de los parámetros cinéticos del modelo de la biodesulfuración con el tiempo de crecimiento de las células,

obtenidos del ajuste de los datos experimentales al modelo cinético propuesto.

En consecuencia con lo anterior, el modelo cinético propuesto ha sido comprobado como aceptable para describir la biodesulfuración de DBT por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, ya que es el que mejor reproduce los datos experimentales de concentración de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP, los compuestos clave elegidos. Además, se puede obtener por simulación la evolución de las concentraciones de otros compuestos no clave como O<sub>2</sub> o HBPS, ya que las velocidades de producción, según el esquema de reacción de la ruta 4S, son las siguientes:

$$R_{HBPS} = r_3 - r_4 \quad [4.43]$$

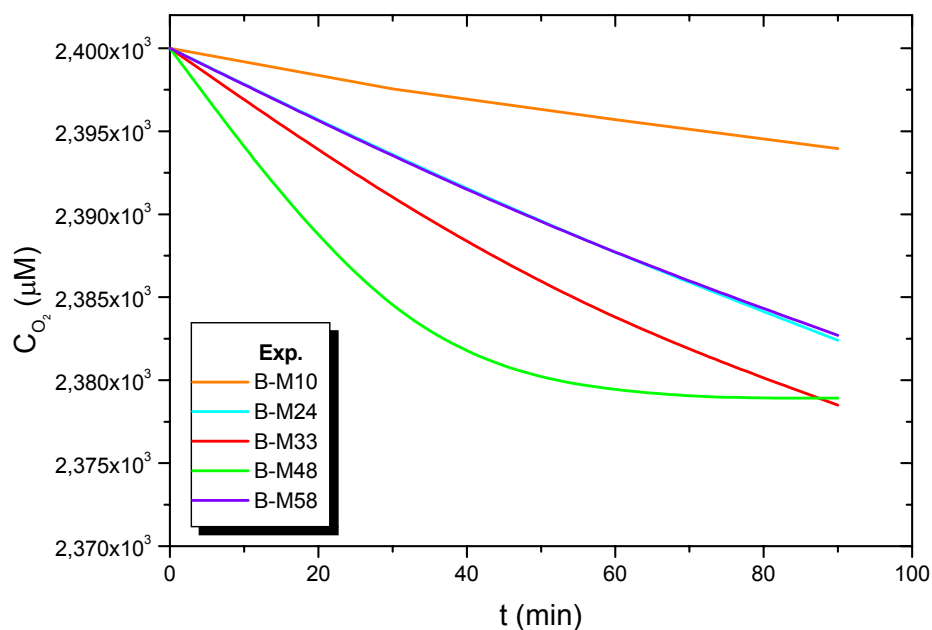
$$R_{O_2} = -1/2 r_1 - 1/2 r_2 \quad [4.44]$$

Integrando estas ecuaciones se obtiene la evolución de las concentraciones con el tiempo. En las Figura 4.26 a 4.30 se muestra la evolución de la concentración de HBPS obtenida por simulación, observándose que reproduce bien los datos de concentración de HBPS.

La evolución de la concentración de O<sub>2</sub> se muestra en la Figura 4.32. En este caso se observa que la disminución en la concentración de oxígeno debida a la ruta 4S es tan pequeña respecto al valor inicial (correspondiente a un 100% del valor de saturación) que no se podría medir por separado del consumo de oxígeno total debido también al mantenimiento celular. Esto es debido a que el consumo de oxígeno por el mantenimiento del microorganismo tiene un valor mucho mayor, como ya se comentó en el apartado 4.2.2 de esta Memoria, por lo que el consumo debido a la ruta 4S resulta inapreciable, lo cual queda patente también en la Figura 4.32. Por otro lado, esta Figura muestra una evolución de la concentración de oxígeno diferente según la hora de crecimiento a la que correspondan las células utilizadas para la biodesulfuración. Así, las células obtenidas a las 10 h de crecimiento tienen un consumo de oxígeno debido a la ruta 4S más pequeño que el resto, lo que resulta coherente con la evolución de los



compuestos de la ruta 4S en ese caso. Las células obtenidas a las 48 h de crecimiento son las que muestran un máximo en el consumo de oxígeno, lo cual es lógico, ya que en ese experimento se produce un consumo mayor de DBT y de DBTO, reacciones que requieren de un aporte de oxígeno.



**Figura 4.32.** Evolución de la **concentración de oxígeno** consumida para realizar la ruta 4S, obtenida por simulación con el modelo cinético propuesto.

#### **4.3.6. Validación del Modelo**

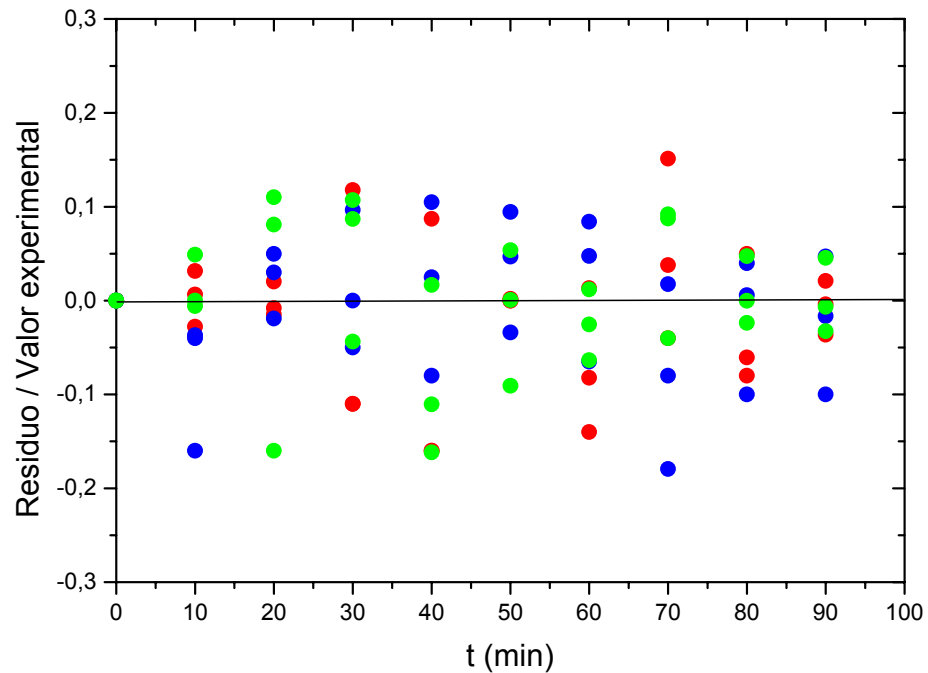
A lo largo de este apartado se han ido exponiendo los diferentes resultados obtenidos con el modelo propuesto. Finalmente, aceptando la ruta 4S para describir la biodesulfuración de DBT, se ha elegido una cinética de tipo potencial de orden 1 para la reacción 1, de tipo hiperbólico con efecto de inhibición por producto para la reacción 2 de la ruta de desulfuración, y una cinética de tipo potencial de orden 2 con respecto a sustrato y producto para la reacción 4, la última de la ruta. En el caso de la reacción 3, muy rápida, se ha supuesto que

$r_2=r_3$ , ya que la concentración de  $\text{DBTO}_2$  observada en todos los experimentos es nula, y por tanto  $r_3 \gg r_2$ , pero se da a la velocidad que marca la más lenta ( $r_2$ ).

Al aplicar este modelo a los diferentes experimentos realizados en este apartado, se han obtenido buenos resultados, el modelo cinético es capaz de describir adecuadamente las evoluciones experimentales de las concentraciones de los compuestos clave DBT, DBTO,  $\text{DBTO}_2$  y HBP. Además, mediante simulación, se puede obtener la evolución de la concentración de otros compuestos no clave, como HBPS y  $\text{O}_2$ , obteniendo en ese caso resultados coherentes.

Se han obtenido los parámetros cinéticos del modelo, calculados para cada uno de los experimentos realizados con células obtenidas a distintas horas de crecimiento, y presentan una tendencia lógica al representarlas frente a dicho tiempo.

Se ha realizado un análisis de los residuos, buscando una relación entre el valor del residuo y el valor del dato experimental, de forma que se pueda comparar los distintos residuos para los diferentes compuestos. En la Figura 4.33 se ha representado esta relación frente al tiempo de crecimiento de las células, observándose que no existe ninguna tendencia en los valores, sino que todos se encuentran dispersados al azar alrededor del cero. Por lo tanto, no existe error experimental sistemático asociado a la medida, y los datos obtenidos, utilizados en la regresión para el cálculo de los parámetros del modelo, se pueden considerar fiables. Además, el error obtenido es menor del 20%, y a menudo alrededor del 10%, que es un nivel de error muy aceptable en las medidas realizadas.



**Figura 4.33.** Representación gráfica de la relación entre los residuos y el valor experimental de la medida.

En conclusión, se puede decir que el modelo cinético propuesto es capaz de:

- Reproducir bien los resultados experimentales, en forma de concentración de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP, obtenidos en el estudio de la biodesulfuración.
- Predecir un máximo en la biodesulfuración a lo largo del tiempo de crecimiento (o edad) de las células en el intervalo estudiado.
- Predecir la influencia de la edad de las células en los parámetros cinéticos de cada una de las reacciones de la ruta 4S.
- Simular las concentraciones de HBPS y O<sub>2</sub> en los experimentos realizados con células de distintas edades.

Por tanto, el modelo cinético propuesto es válido para describir matemáticamente la biodesulfuración de DBT por *Rhododoccus erythropolis* IGTS8 a través de la evolución de los compuestos de la ruta 4S.

## ***5. RESUMEN y CONCLUSIONES***

## **5. RESUMEN Y CONCLUSIONES**

### **5.1. RESUMEN**

Los combustibles fósiles constituyen hoy en día el 60% de la energía primaria que se utiliza a nivel mundial. Sin embargo, su combustión provoca varios problemas ambientales, siendo uno de los más importantes la lluvia ácida, causante de la destrucción de bosques y lagos. La eliminación del azufre de los combustibles fósiles, o desulfuración, ha propiciado muchos estudios y desarrollos tecnológicos. El método más utilizado para la eliminación del azufre es la hidrodesulfuración (HDS), que requiere condiciones drásticas de presión y temperatura, y por tanto, altos costes de operación. Además, este método no consigue eliminar determinadas moléculas azufradas del petróleo, como ciertos compuestos tiofénicos. Estos compuestos se pueden degradar con métodos alternativos como la **biodesulfuración** (BDS), en que se utilizan microorganismos específicos como biocatalizadores, de forma que se trabaja en condiciones suaves de presión y temperatura y se reducen los costes de inversión y operación, minimizando el consumo de energía. En el futuro, se considera posible, y económicamente competitivo, someter algunas fracciones del petróleo, primero a un proceso de HDS y, posteriormente, tratar la corriente de salida mediante BDS; la fracción a la que esta posibilidad se aplicaría en primer lugar sería el gas-óleo .

En este trabajo se ha empleado *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, la bacteria más utilizada en estudios de BDS. Se ha utilizado **dibenzotiofeno** (DBT) como compuesto modelo para estudiar la capacidad desulfurante desarrollada por el microorganismo en las diferentes condiciones estudiadas.

En la literatura no se encuentran descritos trabajos en los que se lleve a cabo el estudio sistemático del medio de crecimiento, ni de las condiciones de operación para la obtención de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 como biocatalizador. En la mayoría de los trabajos se utiliza glucosa como fuente de carbono, DBT como fuente de azufre y cloruro amónico como fuente de nitrógeno. Por otro lado, la mayoría de los trabajos realizan los estudios a una temperatura de 30 °C y a un pH con valores entre 6 y 7; con respecto al oxígeno, ni siquiera se hace referencia al nivel de saturación empleado ni se han realizado estudios del transporte y consumo de oxígeno. Tampoco se encuentran en la literatura trabajos en los que se describa de forma sistemática el estudio de la biodesulfuración de DBT, sino que se ha utilizado como ensayo o para dilucidar los pasos de la ruta de desulfuración o ruta 4S (aceptada como ruta de BDS para el microorganismo utilizado). Todos estos aspectos son relevantes si se pretende implantar este proceso industrialmente.

Para el desarrollo de este trabajo ha sido necesario establecer ciertos **métodos de análisis**. En cuanto al crecimiento del biocatalizador, se han desarrollado métodos para analizar la concentración de microorganismo (absorbancia en el visible a 600 nm), fuente de nitrógeno (electrodo selectivo), fuentes de carbono y azufre (empleando HPLC para glucosa y DMSO; en el caso de ácido glutámico y ácido cítrico se empleó un kit enzimático de análisis). En cuanto a la medida de pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto, se han utilizado sensores y electrodos con sistemas de control. Con respecto al seguimiento de los compuestos de la ruta 4S de desulfuración, durante el ensayo de *resting cells* (realizado con las células obtenidas durante diferentes tiempos de crecimiento), se ha puesto a punto un método empleando de nuevo HPLC con detector UV, a partir del cual es posible analizar la evolución de DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP, compuestos que intervienen en la ruta 4S.

También ha sido necesario desarrollar un procedimiento experimental que proporcione datos repetitivos para llevar a cabo las diversas etapas: conservación y mantenimiento de la bacteria, inoculación y crecimiento, desarrollo de la capacidad desulfurante y, finalmente, la biodesulfuración, en *resting cells*, como última parte del proceso. Así, la estandarización del inóculo se consigue realizándolo en dos etapas en medio LB (Luria Bertani) antes de llevar a cabo el crecimiento de la bacteria, como se describe en detalle en el apartado 3.1.1 de la presente Memoria.

A continuación se ha llevado a cabo el **estudio del crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8** como biocatalizador. La preparación de los inóculos se ha realizado en incubadora orbital, a 210 rpm y 30 °C, empleando medio LB. Todos los experimentos de crecimiento se han realizado en biorreactor de 2 L de volumen de trabajo con un caudal de aireación de 2 L/min y en medio BSM (*Basal Salt Medium*). Los ensayos de biodesulfuración, para medir la capacidad desulfurante de las células obtenidas a diversos tiempos de crecimiento, se han llevado a cabo en incubadora orbital a 210 rpm, 30 °C y pH 8, en medio Hepes. Con respecto al medio de crecimiento, el estudio de la fuente de azufre se ha realizado, en primer lugar, comparando tres distintas fuentes de azufre: DMSO, DBT y MgSO<sub>4</sub>; en segundo lugar, se ha estudiado el efecto de la concentración de la fuente de azufre, utilizando en este caso DMSO (en concentraciones de 50, 250, 500 y 1300 μM), ya que esta fuente no reprime la expresión de los genes de la ruta 4S y que, además, permite que el microorganismo pueda metabolizarla sin emplear la maquinaria enzimática de dicha ruta. Se han estudiado también tres diferentes fuentes de carbono: glucosa, ácido glutámico y ácido cítrico, todas ensayadas en una concentración de 20 g/L. En cuanto al estudio de la fuente de nitrógeno, se ha comparado la posibilidad de utilizar ácido glutámico como fuente de carbono, adicionando o no cloruro de amonio en una concentración de 2 g/L como fuente suplementaria de nitrógeno, ya que se pensó que el ácido glutámico podría actuar a la vez como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno. Además, en este trabajo se ha realizado el estudio de las condiciones de operación durante el crecimiento u obtención del biocatalizador. Se han estudiado cinco diferentes condiciones de pH: en el caso de no controlar el valor de pH, se han



considerado los valores iniciales de 5'5, 6'7 y 8'1; y, por otro lado, para un valor de pH inicial de 6'7, se ha estudiado también el efecto de mantener constante el pH del medio con tampón Tris-HCl y con adición de NaOH diluida. Otra variable considerada ha sido la temperatura, se han realizado experimentos a 26, 28, 29, 30, 31, 32, 34 y 36°C.

Además, se ha desarrollado un **modelo cinético del crecimiento** capaz de describir matemáticamente la evolución de la concentración de biomasa y de la capacidad desulfurante acumulada durante dicho crecimiento, obteniendo unos parámetros cinéticos y estudiando su evolución en función de la composición del medio de crecimiento y de las condiciones de operación empleadas.

Por otra parte, se ha realizado el **estudio detallado del transporte y consumo de oxígeno** durante el crecimiento del microorganismo en biorreactor. Se ha aplicado el método dinámico para medir el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno,  $k_La$ , en el medio de crecimiento sin y con microorganismo  $-(k_La)_i$  y  $(k_La)_{mo}$ , respectivamente-. Se han comparado dichos coeficientes y se han observado valores mayores cuando existe microorganismo en el medio de crecimiento, lo cual demuestra la necesidad de definir un factor de aumento,  $E$ , que relacione el valor de dicho coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno en ausencia y en presencia de microorganismo. Por otra parte, se ha aplicado un modelo teórico para predecir el coeficiente de transporte de oxígeno,  $k_L$ , el área interfacial específica,  $a$ , y el factor de aumento,  $E$ , en diferentes situaciones y condiciones, que predice muy bien los resultados experimentales obtenidos en dichas situaciones empleando diversos métodos. En cuanto a la velocidad de consumo de oxígeno,  $OUR$ , se ha determinado su valor mediante dos métodos: el método dinámico ( $OUR_d$ ), y aplicando un balance de materia en el reactor, es decir, durante el proceso de crecimiento ( $OUR_p$ ). Se han ajustado los valores obtenidos a un modelo cinético que supone que el consumo de oxígeno es debido al mantenimiento y al crecimiento del microorganismo, y se han obtenido valores diferentes en ambos casos. Así, se ha propuesto un nuevo modelo cinético que es capaz de describir la evolución de  $OUR_p$  durante el crecimiento del microorganismo, introduciendo un parámetro adicional en el modelo cinético que

tiene en cuenta el consumo de oxígeno para el desarrollo de la capacidad desulfurante. De esta forma es posible explicar las diferencias encontradas en los valores de *OUR* obtenidos por los distintos métodos de medida empleados. Una vez calculadas la velocidad de transporte de oxígeno, a través del coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno,  $k_{La}$ , por un lado, y de consumo, a través de *OUR*, por otro, se ha propuesto un modelo cinético que es capaz de describir la evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 en diversas condiciones.

A continuación, se ha realizado el **estudio de la biodesulfuración de DBT** (no como método de análisis, sino como parte del proceso a desarrollar) utilizando *R. erythropolis* IGTS8 como biocatalizador del proceso. Para ello, se ha utilizado el microorganismo en *resting cells* o células en reposo. Todos los experimentos de biodesulfuración se han llevado a cabo en biorreactor, con 1 L de volumen de trabajo, y con un caudal de aireación de 1 L/min, excepto en el estudio de la influencia del transporte de oxígeno, en que se empleó también incubadora orbital. Se han llevado a cabo estudios previos, en los que se ha desarrollado un procedimiento estándar para el mantenimiento de la bacteria desde su producción (crecimiento) hasta su utilización como biocatalizador (BDS). Posteriormente, se ha realizado el estudio de la influencia de las condiciones de operación, tales como la temperatura (se han estudiado las temperaturas de 28, 30 y 32°C) y el transporte de oxígeno disuelto (llevando a cabo los experimentos en incubadora y en biorreactor, empleando en este último caso velocidades de agitación de 100, 200 y 500 rpm).

Finalmente, se ha propuesto un **modelo cinético de la biodesulfuración**, aplicando la metodología correspondiente al estudio cinético de redes de reacciones. Se ha realizado un estudio estequiométrico de la ruta de desulfuración o ruta 4S, después se ha formulado el modelo cinético y tras ello se han aplicado los métodos de velocidades de reacción y de velocidades de producción. Se ha utilizado el primero para proponer ecuaciones cinéticas para las diversas reacciones de la ruta 4S; posteriormente, se ha aplicado el segundo para determinar el mejor valor de los parámetros, de manera que se ha llegado

finalmente a un modelo matemático capaz de describir la evolución de los compuestos de la ruta 4S durante la biodesulfuración de DBT, en diversas condiciones y empleando células crecidas durante diferente tiempo, y, por tanto, con una acumulación diversa de capacidad desulfurante, es decir, de *pool* enzimático.

## **5.2. CONCLUSIONES**

Como consecuencia del trabajo realizado, obtención de las células y biodesulfuración de DBT con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

**Sobre el estudio del crecimiento del microorganismo:**

***En cuanto a la composición del medio empleado:***

- 1.a) En la mayoría de los experimentos realizados se ha observado que la capacidad para eliminar azufre de la molécula modelo, DBT, se desarrolla, de forma parcialmente asociada al crecimiento, alcanzando un valor máximo al final de la fase exponencial de crecimiento, obteniéndose células con mayor capacidad desulfurante entre las 15 y las 25 horas, según las condiciones de operación.
- 1.b) De las fuentes de azufre empleadas, la que mejor comportamiento presenta es DMSO, siendo su concentración óptima de 1,3 mM, con la que se obtiene la máxima capacidad desulfurante, a pesar de que ni la velocidad de crecimiento ni la concentración máxima de biocatalizador sean las más elevadas en estas condiciones.
- 1.c) Tanto la glucosa como el ácido glutámico, en concentración de 20 g/L, pueden emplearse como fuente de carbono para obtener un biocatalizador con una capacidad de desulfuración elevada y en un periodo de tiempo corto,

si bien hay que hacer notar que con ácido glutámico esta capacidad de desulfuración parece más estable a lo largo del crecimiento del microorganismo, aunque el consumo de carbono y de DMSO es menor cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono.

- 1.d) A pesar de que el ácido glutámico es, a la vez, una fuente de carbono y de nitrógeno para el microorganismo, se obtiene una mayor concentración de biocatalizador, y con una capacidad desulfurante mayor, en el caso del crecimiento con ácido glutámico suplementado con cloruro amónico en concentración de 2 g/L. Por lo tanto, el uso de ácido glutámico como fuente de carbono no supone una ventaja con respecto a la utilización de glucosa, ya que habría que añadir amonio en ambos casos para obtener una capacidad desulfurante alta.

***En cuanto a las condiciones de operación empleadas:***

- 2.a) El pH óptimo para llevar a cabo la obtención de biocatalizador resulta ser 6,7. Este pH debe ser controlado mediante NaOH o mediante un tampón Tris-HCl (pH 7,5) durante el crecimiento del microorganismo para que la capacidad de desulfuración del biocatalizador sea máxima y se mantenga. Por otro lado, si el control del pH se realiza mediante la adición de NaOH durante el crecimiento, se obtiene una mayor concentración de biocatalizador, por lo que ésta sería la forma óptima de operar.
- 2.b) La temperatura empleada para conseguir una producción óptima de biocatalizador se encuentra en un intervalo estrecho, entre 28 y 32 °C. Dentro de este intervalo no existe variación significativa en la concentración de biocatalizador obtenido, ni en la capacidad de desulfuración acumulada, aunque a 30 °C el valor máximo de capacidad de desulfuración se obtiene entre 2 y 6 horas antes que para el resto de las temperaturas ensayadas.

***Con respecto al transporte y consumo de oxígeno durante el crecimiento:***

- 3.a) El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se encuentra influido por la presencia de la biotransformación, de forma que es necesario definir un factor de aumento que corrija este efecto. Ambos parámetros,  $k_La$  y  $E$ , pueden ser calculados mediante el modelo teórico que se detalla en este trabajo, de forma que se puede obtener el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en presencia de biotransformación,  $K_La$ , de forma predictiva.
- 3.b) El consumo de oxígeno durante el crecimiento está destinado al mantenimiento y al crecimiento del microorganismo, así como también al desarrollo de la capacidad desulfurante, de forma que la velocidad de consumo de oxígeno durante dicho crecimiento queda descrita por la siguiente ecuación:

$$OUR = m_{O_2}C_x + Y_{OX} \frac{dC_x}{dt} + Y_{OBDS} \frac{dX_{BDS}}{dt}$$

Los valores de los parámetros se han calculado empleando los resultados obtenidos con distintas condiciones de operación.

- 3.c) Cuando este consumo de oxígeno se determina por el método dinámico, el microorganismo se encuentra en una situación de *stress* por falta de oxígeno, de forma que, en ese caso, no lleva a cabo las reacciones del metabolismo secundario, como la producción de capacidad desulfurante, haciéndose cero el parámetro  $Y_{OBDS}$ .

***En cuanto a la descripción cinética del proceso de crecimiento:***

- 4) El crecimiento del microorganismo puede ser descrito matemáticamente a través de un modelo cinético sencillo, de forma que la evolución de la concentración de biomasa, la capacidad desulfurante y la concentración de oxígeno disuelto se pueden describir mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dC_X}{dt} = (0,202 \pm 0,014) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{(1,84 \pm 0,06)}\right)$$

$$\frac{dX_{BDS}}{dt} = (127,79 \pm 18,61) \cdot \frac{dC_X}{dt} - (2,71 \pm 0,82) \cdot C_X$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{O_2}}{dt} = & K_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - (2,34 \pm 0,25) \cdot 10^{-7} C_x - \\ & - (0,020 \pm 0,0015) + (3,98 \pm 0,69) \cdot 10^{-4} \cdot (127,79 \pm 18,61) \frac{dC_x}{dt} \end{aligned}$$

Los valores de los parámetros se han calculado empleando los resultados obtenidos en las mejores condiciones. El ajuste de los resultados experimentales al modelo cinético propuesto, en muy variadas condiciones, es excelente.

#### **Sobre el estudio de la biodesulfuración de DBT:**

##### ***En cuanto a las condiciones de operación empleadas:***

- 5.a) La capacidad desulfurante del microorganismo es muy similar en el intervalo de temperaturas de 28 a 32 °C, aunque la temperatura óptima para la biodesulfuración de DBT puede establecerse en 30 °C, temperatura a la que se obtiene un porcentaje de desulfuración mayor, y en menos tiempo.
- 5.b) No existen diferencias significativas en caso de realizar la biodesulfuración en incubadora orbital o en biorreactor, empleando velocidades de agitación entre 100 y 200 rpm, siendo éstas además las condiciones óptimas en cuanto a la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Concentraciones de oxígeno mayores, afectan negativamente a la enzima DszB de la ruta de desulfuración (o ruta 4S) y, por tanto, a la última de las reacciones de la ruta, que cataliza la hidrólisis de HBPS a HBP, disminuyendo así la capacidad de desulfuración del microorganismo. Concentraciones menores hacen que el microorganismo no disponga del oxígeno necesario para llevar a cabo la ruta de desulfuración (por falta de mantenimiento adecuado).

- 5.c) El consumo de oxígeno en esta etapa es el debido principalmente al mantenimiento del microorganismo, ya que no se produce aumento de la biomasa, y las reacciones de la ruta 4S consumen muy poco.

***Con respecto a la descripción cinética del proceso de biodesulfuración:***

La biodesulfuración de DBT puede ser descrita matemáticamente mediante un modelo cinético. El método empleado en este trabajo es de gran utilidad y sencillez para la determinación de modelos cinéticos de redes de reacciones. Los pasos que se han seguido y que conforman dicho método, se explican a continuación.

- 6.a) Aplicando el método de las **velocidades de reacción en su forma diferencial**, se han obtenido las ecuaciones cinéticas de cada uno de los pasos de la ruta 4S:

$$r_1 = k_1 \cdot C_{DBT}$$
$$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{HBPS}}$$
$$r_4 = k_4 \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$$

habiendo impuesto la condición  $r_2 = r_3$  al ser siempre nula la concentración de DBTO<sub>2</sub>.

- 6.b) Aplicando el método de las **velocidades de reacción en forma integral**, por regresión no lineal en simple respuesta, se han obtenido los valores iniciales de los parámetros del modelo cinético ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $K_2$  y  $k_4$ ).
- 6.c) De la aplicación del método de las **velocidades de producción**, por regresión no lineal en múltiple respuesta, se han obtenido los valores finales de los parámetros del modelo cinético propuesto. Así, la evolución de los compuestos de la ruta de desulfuración se puede describir matemáticamente mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = -(4,98 \pm 0,05) \cdot 10^{-2} \cdot C_{DBT}$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = (4,98 \pm 0,05) \cdot 10^{-2} \cdot C_{DBT} - \frac{(9,05 \pm 0,001)C_{DBTO}}{(4,87 \pm 0,07) + C_{HBPS}}$$

$$\frac{dC_{DBTO2}}{dt} = 0$$

$$\frac{dC_{HBPS}}{dt} = \frac{(9,05 \pm 0,001)C_{DBTO}}{(4,87 \pm 0,07) + C_{HBPS}} - (1,45 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = (1,45 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \cdot C_{HBPS} \cdot C_{HBP}$$

Los valores de los parámetros de todas las ecuaciones citadas anteriormente han sido calculados en las mejores condiciones y su determinación se describe detalladamente en esta Memoria en los apartados correspondientes.



## ***6. NOMENCLATURA***

## 6. NOMENCLATURA

<i>A</i>	Área de pico en cromatograma (mV·min)
<i>Ab</i>	Absorbancia
<i>a</i>	Área interfacial específica (m <sup>-1</sup> )
<i>b</i>	Anchura de la pala en el agitador (m)
<i>a, b, c</i>	Parámetros en la ecuación [3.12] y [4.29]; Exponentes en la ecuación [3.20]
<i>B</i>	Matriz estequiométrica elementos-especies
BDS	Biodesulfuración
BSM	Medio de crecimiento basal
<i>C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub></i>	Parámetros en la Ecuación [3.11]; Parámetros en las ecuaciones [3.20] y [3.21]
<i>C<sub>3</sub></i>	Parámetro en la ecuación [3.22]
<i>C<sub>AG</sub></i>	Concentración de ácido glutámico (g/L)
<i>C<sub>AC</sub></i>	Concentración de ácido cítrico (g/L)
<i>C<sub>C</sub></i>	Concentración de fuente de carbono (g/L)

$C_{DBT}$	Concentración de dibenzotiofeno ( $\mu\text{M}$ )
$C_{DBTO}$	Concentración de dibenzotiofeno sulfóxido ( $\mu\text{M}$ )
$C_{DBTO_2}$	Concentración de dibenzotiofeno sulfona ( $\mu\text{M}$ )
$C_G$	Concentración de glucosa (g/L)
$C_{HBP}$	Concentración de hidroxibifenil ( $\mu\text{M}$ )
$C_N$	Concentración de fuente de nitrógeno (g/L)
$C_{O_2}$	Concentración de oxígeno disuelto (mol/L)
$C^*_{O_2}$	Concentración de oxígeno disuelto en condiciones de saturación (mol/L)
$C_S$	Concentración de fuente de azufre (g/L)
$C_X$	Concentración de biomasa (g/L)
$C_X^{max}$	Concentración máxima de biomasa (g/L)
$C_X\text{-DBT}$	Derivados alquilados de DBT
$d$	Paso óptico de la cubeta (cm)
$D$	Diámetro del reactor (m)
$D_{BDS}$	Grado de bidoesulfuración
DBT	Dibenzotiofeno
DBTO	Dibenzotiofeno sulfóxido
DBTO <sub>2</sub>	Dibenzotiofeno sulfona
DMSO	Dimetilsulfóxido
$d_b$	Diámetro de burbuja (m)
$D_L$	Difusividad en el líquido ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$E$	Factor de aumento
$g$	Constante gravitacional ( $\text{m}/\text{s}^2$ )
GLP	Gases licuados del petróleo
$h$	Altura de la pala en el agitador (m)
Ha	Número de Hatta
HDS	Hidrodesulfuración
HBP	Hidroxibifenil
HBPS	Hidroxibifenilbencenosulfinato
HBPSo	Hidroxibifenilbencenosulfonato
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )

$k$	Índice de consistencia en modelo ley de potencia (Pa.s <sup>n</sup> )
$k_i$	Constante cinética de la reacción $i$
$k_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de materia (s <sup>-1</sup> )
$K_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de materia en presencia de microorganismo (s <sup>-1</sup> )
$l$	Diámetro de burbuja formada en la corriente turbulenta (m)
LB	Medio de crecimiento Luria Bertani
M	Peso molecular
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
$m_{O_2}$	Coefficiente de mantenimiento (mol/g·s)
$n$	Índice de flujo en modelo ley de potencia; número de moles
$N$	Número de datos; Velocidad de agitación (rpm)
$N_S$	Número de especies
Na	Número de aireación
NCC	Número de componentes clave
$N_p$	Número adimensional de potencia
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno ( <i>Oxygen Uptake Rate</i> ) (mol/L·s)
$P$	Potencia suministrada en condiciones de aireación (w)
$P_o$	Potencia suministrada en sistemas no aireados (w)
$Q$	Velocidad de aireación (m <sup>3</sup> ·s <sup>-1</sup> )
$q_{O_2}$	Velocidad específica de consumo de oxígeno (mol/g·s)
$r$	Velocidad de reacción (μM/min)
$r_s$	Integral de la velocidad de reacción
$R$	Velocidad de producción (μM/min)
$R_B$	Rango de la matriz B
Re	Número de Reynolds
Sh	Número de Sherwood
SRC	Suma de residuos al cuadrado
$T$	Temperatura (°C); Diámetro del agitador (m)
$T_{min}, T_{max}$	Parámetros en la ecuación [3.11]
$t$	Tiempo (s)
$t_e$	Tiempo de exposición (s)
$t_G$	Tiempo de crecimiento (h)
$u$	Velocidad de fluctuación (m/s)

$V$	Volumen (m <sup>3</sup> )
$V_S$	Velocidad superficial del gas (m/s).
$w$	Velocidad de la pala (m/s)
$We$	Número adimensional de Weber
$x_1, x_2, x_3$	Exponentes en la ecuación [3.22]
$Y_{CX}$	Rendimiento de la fuente de carbono en biomasa (mol/g)
$Y_{SX}$	Rendimiento de la fuente de azufre en biomasa (μM/g)
$Y_{OX}$	Rendimiento de oxígeno en biomasa (mol/g)
$Y_{OBDS}$	Rendimiento de oxígeno en capacidad desulfurante (mol/%)
$X_{BDS}$	Porcentaje de desulfuración (%)

**Letras Griegas**

$\alpha_r$	Relación entre la tensión crítica de flujo aparente y la tensión tangencial
$\alpha, \beta$	Parámetros de la ecuación [3.13]; parámetros en la ecuación [3.32]
$\gamma$	Velocidad tangencial (s <sup>-1</sup> )
$\Delta$	Incremento
$\delta$	Coefficiente de extinción molar (L/mmol·cm)
$\varepsilon$	Velocidad de disipación de energía (w/kg)
$\eta$	Longitud de torbellino (m)
$\phi$	Fracción de gas en la fase líquida, o <i>hold-up</i>
$\phi_v$	<i>Hold-up</i> en sistemas viscosos
$\mu$	Viscosidad (Pa·s); velocidad específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )
$\mu_a$	Viscosidad aparente en el modelo de Ostwald-de Waele (Pa·s).
$\mu_c$	Viscosidad en el modelo de Casson (Pa·s).
$\nu$	Viscosidad cinemática (m <sup>2</sup> /s); matriz especies-reacciones
$\rho$	Densidad (kg/m <sup>3</sup> ).
$\sigma$	Tensión superficial (N/m).
$\tau$	Tensión tangencial (N/m <sup>2</sup> ).
$\tau_0$	Tensión crítica de flujo aparente (N/m <sup>2</sup> ).
$\xi$	Coefficiente de resistencia

**Subíndices**

<i>exp</i>	Relativo al valor experimental
<i>G</i>	Relativo a la fase gaseosa
<i>L</i>	Relativo a la fase líquida
<i>te</i>	Relativo al valor teórico
<i>0</i>	Relativo a condiciones iniciales

**Superíndices**

<i>max</i>	Máximo
------------	--------

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

**Abbad-Andaloussi, S.; Lagnel, C.; Warzywoda y Monot, F.** (2003). Multi-criteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds. *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 446-454.

**Abrardi, V.; Rover, G.; Sicardi, S.; Baldi, G.; Conti, R.** (1988). Sparged vessels agitated by multiple turbines. *Proc. Eur. Conf. Mix.* **6**, 329-336.

**Amstrong, S.M., Sankey, B.M., Voordouw, G.** (1995). Conversion of dibenzothiophene to byphenyl by sulfate-reducing bacteria isolated from oil field production facilities. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1133-1136.



**Arensdorf, J.J., Loomis, A.K., DiGrazia, P.M., Monticello, D.J., Pienkos, P.T.** (2002). Chemostat approach for the directed evolution of biodesulfurization gain-of-function mutants. *Appl. Environ. Microb.* **68**, 691-698.

**Arjunwadkar, S.J.; Sarvanan, A.B.; Pandit, P.R. Kulkarni, P.R.** (1998), Gas liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **1**, 93-98.

**Atlas, R.M., Boron, D.J., Deever, W.R., Jonson, A.R., McFarland, B.L., Meyer, J.A.** (1998). Biodesulfurization of gasoline-a technology roadmap. Coordinating Research Council; Atlanta. Georgia (CRC Report no. 615; CRC Project no. E-7c, 1-82.

**Bailey, J.E., Ollis, D.F.** (1983). Biochemical Engineering Fundamentals, pp. 457-500. Mc. Graw-Hill, New York, NY.

**Balashova, V.V., Vedinina, I.Y., Markosan, G.E. y Zavarzin, G. A.** (1974). The autotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Microbiol.* **43**, 113-138.

**Barigou, M. y Greaves, M.** (1996), Gas hold-up and interfacial area distributions in a mechanically agitated gas-liquid contactor. *Trans. IChemE.* **74**, 397-405.

**Bezalel, L., Hader, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E.** (1996). Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2554-2559.

**Bhattacharyya, D., Kermode, R.I., Hsieh, M., Aleem, H.M. y Khalid, A.,** (1998). Processing and utilization of high-sulfur coals. *Liquefaction Sci*, **4**, 1-4.

**Bhavaraju, S.M.; Russell, T.W.F; 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.

- Borole, A.P., Kaufman, E.N., Grossman, M.J., Minak-Bernero, V., Bare, R., Lee, M.K.** (2002). Comparison of the emulsion characteristics of *Rhodococcus erythropolis* and *Escherichia coli* SOXC-5 cells expressing biodesulfurization genes. *Biotechnol. Prog.* **18**, 88-93.
- Bressler, D.C., Norman, J.A. y Fedorak, P.M.**, (1998). Ring cleavage of sulfur heterocycles: how does it happen?. *Biodegradation.* **8**, 297-311.
- Brierly, J.A., Norris, P.R., Kelly, D.P. y LeRoux, N.W.** (1978). Characteristics of a moderately thermophilic and acidophilic iron-oxidizing *Thiobacillus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 291–299.
- Castorena, G.; Suárez, C.; Valdez, I.; Amador, G.; Fernández, L. y Le Borgne.** (2002). Sulfur selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by new isolated *Rhodococcus sp.* strains. *FEMS Microbiol Lett.* **215(1)**, 157-161.
- Chang, J.H., Chang, Y.K.; Ryu, H.W.; Chang, H.N.** (2000). Desulfurization of lightgas oil in immobilized-cell systems of *Gorgona sp.* CYKS1 and *Nocardia sp.* CYKS2. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 309-312.
- Chang, J.H., Kim, Y.J., Lee, B.H., Cho, K.S., Ryu, H.W., Chang, Y.K., Chang, H.N.** (2001). Production of a desulfurization biocatalyst by two-stage fermentation and its application for the treatment of model and diesel oils. *Biotechnol. Prog.* **17**, 876-880.
- Chen, J.C.T., Monticello, D.J.** (1996). Method for separating a petroleum emulsion. U.S. Patent 5525235.
- Constantí, M.; Bordons, A. y Giralt, J.** (1994). Degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida*. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 107-1111.

**Constantí, M.; Giralt, J. Y Bordons, A.** Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other sulfur compounds by *Agrobacterium* MC501 and a mixed culture. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 214-219 (1996).

**Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H., Monticelo, D.J.** (2001). DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.* **19**, 354-359.

**Crawford, D.L., Gupta, R.K.** (1990). Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr. Op. Microbiol.* **21**, 229-231.

**Danckwerts, P.V.** (1951), Significance of liquid-film coefficients in gas absorption. *Ind. Eng. Chem.* **43**, 1460-1467.

**Darzins, A. y Mrachko, G.T.** (2000). Sphingomonas biodesulfurization catalyst. U.S. Patent 6133016.

**Davies, S.M.; Gibilaro, L.G.; Middleton, J.C.; Cooke, M.; Lynch, P.M.** (1985), The application of two novel techniques for mass transfer coefficient determination to the scale up of gas sparged agitated vessels. *Proc. Eur. Conf. Mix.* **5**, 27-34.

**Denis-Larose, C., Labbe, D., Bergeron, H., Jones, A.M., Greer, C.W., Hawari, J., Grossman, M.J., Sankey, B.M., Lau, P.C.** (1997). Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several rhodococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2915-2919.

**Denome, S.A., Olson, E.S. y Young, K.D.**, (1993). Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2837-2843.

**Denome, S.A., Oldfield, C., Nash, L.J. y Young, K.D.**, (1994). Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J. Bacteriol.* **176**, 6707-6716.

**Duarte, G.F., Rosado, A.S., Seldin, L., de Araujo, W., van Elsas, J.D.** (2001). Análisis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz genes). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1052-1062.

**Dugan, P.R, y Apel, W.A.** (1987). Metalurgical Applications of Bacteriol. Leaching and related microbiological phenomena, L. Murr, A. Torma y J. Brierly, Eds. (*Academic Press*, N.Y., N.Y.), 223-246.

**Dudley, M.W., Frost, J.W.** (1994). Biocatalytic desulfurization of arylsulfonates. *Bioorg Med. Chem.* **2**, 681-690.

**Figueiredo, L.M. y Calderbank, P.H.** (1979). The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chem. Eng. Sci.* **34**, 1333-1338.

**Finnerty, W.R. y Robinson, M.,** (1986). Microbial Desulfurization of Fossil Fuels: A Review. *Biotech. And Bioengin. Symp.* **16**, 205-221.

**Finnerty, W.R.,** (1992). Fossil resource biotechnology: challenges and prospects. *Current. Op. Biotech.* **3**, 277-282.

**Folsom, B.R, Schieche, D.R., Di Grazia, P.M., Werner, J. y Palmer, S.,** (1999). Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4967-4972.

**Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farrinelli, P., Montevecchi, P., Vallini, G.** (1998). Biodegradation of dibenzothiophene by a modulating isolate of *Rhizobium melioli*. *Can. J. Microbiol.* **44**, 289-297.

**Gagnon, H; Lounes, M; Thibault, J.** (1998), Power consumption and mass transfer in agitated gas-liquid columns: A comparative study. *Can. J. Chem. Eng.* **76**, 379-389.

**Gallagher, J.R., Olson, E.S. y Stemly, D.C.** (1993). Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**, 31-36.

**Gallardo, M. E., Fernández, A., Lorenzo, V. D., García, J. L. y Díaz, E.** (1997). Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization, *J. Bacteriol.* **179**, 7156-7160.

**García-Calvo, E.** (1989), A fluid dynamic model for airlift reactors. *Chem. Eng. Sci.* **44**, 321-323.

**García-Ochoa, F., Romero, A., Santos, V.E. y Rodríguez, C.O.** (1989). Estudio del Método Diferencial en la Determinación de Modelos Cinéticos en Reacciones. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 991-996.

**García-Ochoa, F., Querol, J. y Romero, A.** (1990). Modeling the Liquid-Phase n-Octane Oxidation Catalized by Cobalt. *Int. Eng. Chem. Res.* **29(10)**, 1989-1994.

**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** (3), 538-551.

**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** (4), 634-648.

**García-Ochoa, F. y Romero, A.** (1993). Kinetic Modeling of Reactions Networks. "Trends in Chemical Engineering". Ed Council of Sci. Res. Int. **1**, 285-305.

**García-Ochoa, F., Santos, V.E. y Alcón, A.** (1995). Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 206-217.

**García-Ochoa, F. y Gomez, E.** (1998). Mass transfer coefficient in stirrer tank reactors for xanthan solutions. *Biochem. Eng. J.* **1**, 1-10.

**García-Ochoa, F. y Gomez, E.** (2001), Estimation of oxygen mass transfer coefficient in stirrer tank reactors using artificial neuronal networks. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 560-569.

**García-Ochoa, F. y Gomez, 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. y Gomez, E.** (2005). Prediction of Gas-Liquid Mass Transfer Coefficient in Sparged Stirred Tanks Bioreactors. (Enviado a *Biotech. Bioeng.*)

**Gilbert, S.C., Morton, J., Buchanan, S., Oldfield, C. y McRoberts, A.**, (1998). Isolation of a unique benzothiophene-desulfurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulfurization pathway. *Microbiology* **144**, 2545-2553.

**Gogate, P.R. y Pandit, A.B.** (1999). Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **4**, 7-15.

**Gogate, P.R., Beenackers, A.A.C.M. y Pandit, A.B.** (2000), Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. *Biochem. Eng. J.* **6**, 109-144.

**Gómez, E.** (1995). Transferencia de Oxígeno en Biorreactores tipo Tanque Agitado: Aplicación a la Producción de Xantano. Tesis Doctoral, U.C.M.

**Gray, K.A., Pogrebinsky, O.S., Mrahko, T., Xi, L., Monticello, D.J. y Squires, C.H.** (1996). Molecular mechanisms of fossil fuels. *Nature Biotechnol.* **14**, 1705-1709.

**Gray, K.A., Squires, C.H., Monticello, D.J.** (1998). DszD utilization in desulfurization of DBT by *Rhodococcus* sp. IGTS8. U.S. Patent 5846813.

**Grossman, M.J., Lee, M.K., Prince, R.C., Garrett, K.K., George, G.N., Pickering, I.J.** (1999). Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 181-188.

**Harrison, A.P.** (1984). The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**, 265-292.

**Hernández, J. y Dubón, H.** (1992). Sistemática Bacteriana. Eds: Cipión S.L. Secc. **17**, 4-5.

**Higbie, R.** (1935), The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Inst. Chem. Eng.* **35**, 36-60.

**Hou, C.T., Laskin, A.J.** (1976). Microbial conversión of dibenzothiophene. *Develop. Ind. Microbiol.* **17**, 351-362.

**Isbister, J.D. y Kobylinski, E.A.,** (1985). Coal science and Technology Series. *Attia, Y.A.* **9**, 627-641.

**Ishii, Y., Kobayashi, M., Konishi, J., Onaka, T., Okumura, K. y Suzuki, M.,** (1998). Desulfurization of petroleum by the use of biotechnology. *Nippon Kagaku Kaishi* (in Japanese), Jun. 373-381.

**Ishii, Y., Konishi, J., Okada, H., Hirasawa, K., Onaka, T. y Suzuki, M.** (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 81.

**Izumi, Y., Oshiro, T., Ogino, H., Hine, Y., y Shima, M.,** (1994). Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 223-226.

**Johnson, A.I. y Huang, C.** (1956), Mass transfer studies in an agitated vessel. *AIChE. J.* **2**, 412-419.

**Joshi, J.B.; Pandit, A.B. y Sharma, M.M.** (1982), Mechanically agitated gas-liquid reactors. *Chem. Eng. Sci.* **37**, 813-844.

**Kargi, F. and Robinson, J.H.**, (1984). Microbial oxidation of dibenzothiophene by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biotech. Bioeng.* **16**, 687-690.

**Kargi, F. and Robinson, J.H.**, (1985). Biological removal of pyritic sulfur from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius* *Biotech. Bioeng.*, **27**, 41-49.

**Kargi, F. y Weissman, J.G.** (1984). A dynamic mathematical model for microbial removal of pyritic sulfur from coal. *Biotech. Bioeng.*, **26**, 604-612.

**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 Moo-Young, M.** (1988), Volumetric mass transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with Newtonian and non-newtonian media. *Chem. Eng. Res. Dev.* **66**, 284-288.

**Kawase, Y., Halard B. y Moo-Young, M.** (1992), Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors. *Biotech. Bioeng.* **39**, 1133-1140.

**Kaufman, E.N.; Harkins, J. B. y Borole, A.P.** (1998). Comparison of batch.stirred and electro-spray reactors for biodesulfurization of dibenzothiophene in crude oil and hydrocarbon feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **73 (2-3)**: 127 -144.

**Kaufman, E.N., Borole, A.P., Shong, R., Sides, J.L. y Juengst, C.**, (1999). Sulfur specificity in the bench-scale biological desulfurization of crude oil by *Rhodococcus* IGTS8. *J.Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 1000-1004.



**Kayser, Y., Bielagajones, B.A., Jackowski, K., Odusan, o. y Kilbane, J.J.**, (1993). Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 3123-3129.

**Kayser, K.J., Cleveland, L., Park, H.S., Kwak, J.H., Kolhatkar, A., Kilbane II, J.J.** (2002). Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 737-745.

**Kevin, A.G., Pogrebinsky, O.S., Mrachko, G.T., Xi, L., Monticello, D.J. y Squires, C.H.**, (1996). Molecular mechanism of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotech.* **14**, 1705-1709.

**Kilbane, J.J.**, (1989). Desulfurization of coal: the microbial solution. *Trends Biotech.* **7**, 97-101.

**Kilbane II, J.J.** (1990). Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources, Conservation Recycling* **3**, 69-79.

**Kilbane, J.J.** (1992). Mutant microorganism useful for cleavage of organic C-S bonds. U.S. Patent 5104801.

**Kilbane, J.J y Jackowski, K.**, (1992). Biodesulfurization of water soluble soluble coal- derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotech. Bioeng.* **40**, 1107-1114.

**Kim, H.Y., Kim, T.S., Kim, B.H.** (1990). Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide. *Biotechnol. Lett.* **12**, 761-764.

**Kim, H.Y., Kim, T.S., Kim, B.H.** (1990). Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent. *Biotechnol. Lett.* **12**, 757-760.

**Kishimoto, M.; Inui, M.; Omasa, T.; Katakura, Y.; Suga, K. and Okumura, K.** (2000). Efficient production of desulfurizing cells with the aid of expert system. *Biochem. Eng. J.* **5**, 143-147.

**Kirimura, K., Furuya, T., Nishii, Y., Ishii, Y., Kino, S. Y Usami, J.** (2001). *Biosci. Bioeng.* **91**, 262.

**Klubek, B., Schmidt, C. y Burnham, H.**, (1996). Characterization of soil bacteria that desulfurize organic sulphur compounds. 1. Classification and growth studies. *Microbios.* **88**, 223-236.

**Klubek, B., Schmidt, C. y Burnham, H.**, (1998). Characterization of soil bacteria that desulfurize organic sulphur compounds. 2. Optimization of sulfur removal from dibenzothiophene sulphone, benzene sulphonic acid, selected Illinois coals. *Microbios.* **93**, 17-34.

**Kobayashi, M.; Onaka, T.; Ishii, Y.; Konoshi, 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 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **187(2)**, 123-126.

**Kobayashi, M.; Horiuchi, K.; Yoshikawa, O.; Hirasawa, K.; Ishii, Y.; Fujino, K.; Sugiyama, H. And Maruhashi, K.** (2001). Kinetic analysis of microbial desulfurization of model and light gas oils containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosci. Bioetchnol. Biochem.* **65** (2), 298-301.

**Konishi, J., Ishii, Y. Onaka, T., Okumura, K. y Suzuki, M.**, (1997). Thermophilic carbon –sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appli. Environ. Microb.* **63**, 3164-3169.

**Konishi, J., Ishii, Y., Okumura, K., Suzuki, M.** (2000). High-temperature desulfurization by microorganism. U.S. Patent 6130081.

**Krawiec, S.**, (1990). Bacterial desulfurization of thiophene: Screening techniques and some speculations regarding the biochemical and genetics bases. *Develop. Ind. Microbiol.* **31**, 103-114 (1990).

**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.

**Kudrewizki, F. y Rabe, P.** (1986), Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* **41**, 2247-2252.

**Lamont, J.C. y Scott, D.S.** (1970) An Eddy cell model of mass transfer into the surface of a turbulent liquid. *AIChE. J.* **16**, 513-519.

**Lange, E.A., Lin, Q.** (2001). Compositions comprising 2-(2-hydroxyphenyl) benzenesulfinate and alkyl-substituted derivated thereof. U.S. Patent 6303562.

**Lee, M.k., Senius J.D y Grossman, M.J.,** (1995). Sulfur specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4362-4366.

**Li, M.Z., Squires, C.H. y Childs, J.D.,** (1996). Genetic analyses of the *dsz* promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *J. Bacteriol.* **178**, 6409-6418.

**Li FL, Xu P, Ma CQ, Luo LL and Wang XS.** (2003). Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**(2) 301-307.

**Linek, V.; Vacek, V.; Benes, P.** (1987). A critical review and experimental verification of the correct use of dynamic method for determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquid. *Chem. Eng. J.* **34**, 11-34.

**Linek, V.; Sinkule, J.; Benes, P.** (1991), Critical assessment of gassing-in method measuring  $k_{La}$  in fermentors. *Biotech. Bioeng.* **38**, 323-330.

**Lizama, H.M., Wilkins, L.A., Scott, T.C.** (1995). Dibenzothiophene sulfur can serve as sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.* **17**, 113-116.

**Luedeking, R. and Piret, E.L.** (1959). A Kinetic study of the Lactic Acid Fermentation Batch Process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1**, 393-412.

**Lundgren, D.G. y Silver, M.**, (1980). Ore leaching by bacteria *Ann. Rev. Microbiol.* **34**, 263-283.

**Maghsoudi, S.; Kheiriloomoon, A.; Vossoughi, M.; Tanaka, E. y Katoh, S.;** (2000). Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp. strain P32C1. *Biochem. Eng. J.* **5(1)**, 11-16.

**Maghsoudi, S.; Vossoughi, M.; Kheiriloomoon, A.; Tanaka, E. and Katoh, S.** (2001). Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem. Eng. J.* **8**, 151-156.

**Marquardt, A.W.** (1963). An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Indus. Appl. Math.* **11**, 431-441.

**Matsui, T.; hirasawa, K.; Konishi, J.; Tanaka, Y.; Maruhashi, K. And Kurane, K.** (2001). Microbial desulfurization fo alkylated dibenzothiophene and alkylated benzothiophene by recombinant *Rhodococcus* sp. Strain T09. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 196-200.

**McFarland, B.L., Boron, D.J., Deever, W., Meyer, J.A., Johnson, A.R. y Atlas, R.M.**, (1998). Biocatalytic sulfur removal from fuels: Applicability for producing for producing low sulfur gasoline. *Critical Rev. Microbiol.* **24**, 99-147.

- McFarland, B.** (1999). Biodesulfurization. *Curr. Op. Microbiol.* **2(3)**, 257-264.
- Michel, B.J.; Miller, S.A.** (1962), Power requirements of gas-liquid agitated systems. *AIChE J.* **8**, 262-267.
- Mogollon, L., Rodriguez, R., Larrota, W., Ortiz, C., Torres, R.** (1998). Biocatalytic removal of nickel and vanadium from petroporphyrins and asphaltenes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**, 765-777.
- Monod, J.** (1949). The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **3**, 371-394.
- Monod, J.** (1950). La technique de culture continue theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* **79**, 390-410.
- Monot, F., Abbad-Andaloussi, S., Warzywoda, M.** (2002). Biological culture containing *Rhodococcus erythropolis* and/or *Rhodococcus rhodnii* and process for desulfurization of petroleum fraction. U.S. Patent 6337204.
- Monticello, D.** (1994). Biocatalytic Desulfurization. *Hydroc. Proc.* **Feb**, 45-50.
- Monticello, D. J., y Finnerty, W.R.** (1985). Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 371-389.
- Monticello, D.J., Bakker, D. y Finnerty, W.R.,** (1985). Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microb.* **49**, 756-760.
- Monticello, D.J.** (1998). Riding the fossil fuel biodesulfurization wave. *Chemtec* **28**, 38-45.
- Murrell, J.C.** (1994). Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation* **5**, 145-159.

**Nakatani, S., Akasaki, T., Kodama, K., Minoda, Y., Yamada, K.** (1968). Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part II. Culture conditions at dibenzothiophene-utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 840-845.

**Nakayama, N.; Matsubara, T.; Ohshiro, T.; Moroto, Y.; Kawata, Y.; Koizumi, K.; Hirakawa, Y.; Suzuki, M.; Maruhashi, K.; Izumi, Y.; Kurane, R.** (2002). A novel enzyme, 2'-hydroxybiphenyl-2-sulfinase (DszB), from a dibenzothiophene-desulfurizing bacterium *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1: gene overexpression and enzyme characterization. *Bioch. Bioph. Act.* **1598**, 122-130.

**Nekodzuka, S., Toshiaki, N., Nakajima-Kambe, T., Nobura, N., Lu, J., Nakahara, Y.** (1997). Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Micobacterium* strain G3. *Biocatalysis Biotransformation* **15**, 21-27.

**Nishikawa, M., Nakamura, M., Yagi, H. y Hashimoto, K.** (1981). Gas absorption in aerated mixing vessels. *J. Chem. Eng. Japan* . **14** (3), 219-226.

**Nocentini, M., Fajner, D., Pasquali, G. y Magelli, F.** (1993). Gas-liquid mass transfer and holdup in vessels stirred with multiple Rushton turbines: water and water-glycerol solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **32**, 19-26.

**Oldfield, C., Pogrebinsky, O., Simmonds, J., Olson, E. S. y Kulpa, C. H.,** (1997). Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiol.* **143**, 2961-2973.

**Oldfield, C., Wood, N.T., Gilbert, S.C., Murray, F.D., Faure, F.R.** (1998). Desulfurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomicete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **74**, 119-132.

**Olson, E.S.; Stanley, D.C. and Gallaguer, J.R.** (1993). Characterization of intermediates in the microbial desulfurization of dibenzothiophene. *Energ. Fuel* **7**, 159-164.

**Omori, T., Saiki, Y., Kasuga, K. y Kodama, T.,** (1995). Desulfurization of Alkyl and Aromatic Sulfides and Sulfonates by Dibenzothiophene-desulfurizing *Rhodococcus* sp. Strain SY1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** (7), 1195-1198.

**Omori, T., Monna, L., Saiki, Y. y Kodama, T.,** (1992). Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 911-915.

**Ohshiro, T. e Izumi Y.,** (1999). Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **63** (1), 1-9.

**Ohshiro, T., Suzuki, K. e Izumi, Y.,** (1996). Regulation of dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 121-124.

**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., Aoi, Y., Torii, K. e Izumi, Y.** (2002). Flavin reductase coupling with two monooxygenases involved in dibenzothiophene desulfurization: purification and characterization from a non-desulfurizing bacterium, *Paenibacillus polymixa* A-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 649-657.

**Oldfield, C., Pogrebinsky. O., Simmonds, J., Olson, E. S. y Kulpa, C. H.,** (1997). Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiol.* **143**, 2961-2973.

**Olson, E.S.; Stanley, D.C. and Gallager, J.R.** (1993). Characterization of intermediates in the microbial desulfurization of dibenzothiophene. *Energ. Fuel* **7**, 159-164.

**Omori, T., Monna, L., Saiki, Y. y Kodama, T.** (1992). Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 911-915.

**Onaka, T.; Kobayashi, M.; Ishii, Y.; Okumura, K. And Suzuki, M.** (2000). Application of solid-phase extraction to the analysis of the isomers generated in biodesulfurization against methylated dibenzothiophenes. *J. Chromatography A.* **903**, 193-202.

**Pacheco, M., Lange, E., Pienkos, P., Yu, L., Rouse, M., Lin, Q., Linguist, L.** (1999). Recent advances in biodesulfuriazion of diesel fuel. Annual Meeting NPRA: March 21-23; San Antonio, Texas. Washington, DC: National Petrochemical and Refiners Association: AM-99-27.

**Parthasarathy, R., Jameson, G.J.; Ahmed, N.** (1991), Bubble breakup in stirred vessels-Predicting the Sauter mean diameter. *Trans. Instn.Chem.Engrs.* **69**, Part A. 295-301.

**Patel, S.B.; Kilbane, J.J. y Webster, D.A.** (1997). Biodesulphurisation of dibenzothiophene in hydrophobic media by *Rhodococcus erythropolis* sp. Strain IGTS8. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **69**, 100-106.

**Pedersen, A.G., Andersen, H., Nielsen, J. y Villadsen, J.** (1994). A novel technique based on Kr-85 for quantification of gas-liquid mass transfer in bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* **6** (49), 803-810.

**Perez, J.F. y Sandall, O.C.** (1974), Gas absorption by non-newtonian fluids in agitated vessels. *AIChE. J.* **20**, 770-775.



**Piddington, C.S., Kovacevich, B.R. y Rambosech, J.** (1995). Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 468-475.

**Pinches, A., Pallent, L.J.** (1986). Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. *Biotech. Bioeng.* **28**, 1484-1496.

**Prasher, B.D. y Wills, G.B.** (1973), Mass transfer in a agitated vessel. *Ind. Eng. Chem. Process. Develop.* **12** (3), 351-354.

**Premuzic, E.T., Lin, M.S.** (1999). Induced biochemical conversions of heavy crude oils. *J. Petroleum Sci. Eng.* **22**, 171-180.

**Purdy, R.F., Lepo, J.E. y Ward, B.** (1993). Biodesulfuration of Organic-Sulfur Compounds. *Curr. Op. Microbiol.* **27**, 219-222.

**Rambosek, J., Piddington, C.S., Kovacevich, B.R., Young, K.D., Denome, S.A.** (1999). Recombinant DNA encoding a desulfurization biocatalyst. U.S. Patent 5879914.

**Ratkowsky, D.A.; Lowry, R.K.; Stokes, T.A. and Chandler, R.E.** (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire bio kinetic temperature range. *J. Bacteriol.* **154**, 1222-1226.

**Reichmuth, D. S.; Hittle, J. L.; Blanch, H. W. y Keasling, J. D.** "Biodesulfurization of Dibenzothiophene in *Escherichia coli* Is Enhanced by Expression of a *Vibrio harveyi* Oxidoreductase Gene" *Biotech. Bioeng.* **67** (1), 72-79 (2000).

**Rhee, S-K., Chang, J.H., Chang, Y.K. y Chang, H.N.,** (1998). Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordona* strain CYKS1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2327-2331.

**Rhodes, A.** (1995) Enzymes desulfurizing diesel fuel in pilot plants tests. *Oil Gas J.* **5**, 235-458.

**Sato, H., Clark, D.P.** (1995). Degradation of dibenzothiophene sulphoxide and sulphone by *Arthrobacter* strain DBTS2. *Microbios.* **83**, 145-159.

**Schlenk, D., Bevers, R.J., Vertino, A.M., Cerniglia, C.E.** (1994). P450 catalyzed S-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Xenobiotica* **24**, 1077-1083.

**Setti, L.; Farinelli, P.; Di Martino, S.; Frassinetti, S. ; Lanzarini, G. And Pifferi, P.G.** (1999). Developments in destructive and non-destructive pathways for selective desulfurizations in oil biorefining processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 111-117.

**Tobajas, M., Garcia-Calvo, E, Siegel, M.H. y Apitz, S.E.** (1999), Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chem. Eng. Sci.*, **54**, 5347-5354.

**Toor, H.L. y Marchelo, J.M.** (1958), Film-Penetration model for mass transfer and heat transfer. *AIChE. J.* **4**, 97-101.

**Vasconcelos, J.M.T., Orvalho, S.C.P., Rodríguez, A.M. y Alves, S.S.** (2000), Effect of blade shape on the performance of six blade disk turbine impellers. *Ind. Eng. Chem. Res.* **39**, 203-208.

**Wang, P. y Krawiec, S.** (1994). Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Arch. Microbiol.* **161**, 266-271.

**Wang, P. Humphrey, A.E. y Krawiec, S.** (1996). Kinetic analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in continuous cultures. *Appl. Environ. Microb.* **62**, 3066-3068.

**Wang, P. y Krawiec, S.**, (1996). Kinetic analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in batch and fed-batch cultures. *Appl. Environ. Microb.* **61**,1670-1675.

**Weiss, R.M., Ollis, D.F.** (1980). Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotech. Bioeng.* **22**, 859-873.

**Whitman, W.G.** (1923), Preliminary experimental confirmation of the two-film theory of gas absorption. *Chem. Met. Eng.* **29**, 146-148.

**Van Affender, M., Schacht, S., Klein, J., Trüper, H.G.,**(1990). Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium sp.* DO. *Arch. Microbiol.* **153**, 324-328.

**Van der Ploeg, J.R., Cummings, N.J., Leisinger, T., Connerton, I.F.** (1998). *Bacillus subtilis* genes for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates. *Microbiology* **144**, 2555-2561.

**Vian Ortuño, A.** (1996). Introducción a la Química Industrial. *Ed. Reverté, S. A.* Barcelona. Pag. 152-188.

**Xi, L; Squires, C. H.; Monticello, D.J. y Childs, J.D.** A Flavin Reductase Stimulates DszA and DszC Proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 *in Vitro*. *Chem. Biophys. Res. Com.* **230**, 73-75 (1997).

**Yagi, H.; Yoshida, F.** (1975). Gas absorption by newtonian and non-newtonian fluids in sparged agitated vessels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop.* **14**, 488-493.

**Yamada, K., Minoda, Y., Kodama, K., Nakatani, S., y Akasaki, T.,** (1968). Microbial conversión of petro-sulfur compounds. Part I. Isolation and identification of dibenzothiophene-utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 840-845.

**Yan, H.; Kishimoto, M.; Omasa, T.; Katakura, Y.; Suga, K.; Okumura, K. and Yoshikawa, O.** (2000). Increase in desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 using ethanol feeding. *J. Biosc. Bioeng.* **89** (4), 361-366.

**Yu, L., Meyer, T., Folsom, B.** (1998). Oil/water/biocatalyst three phase separation process. U.S. Patent 5772901.

**Zhang, Z. y Thomas, C.R.** (1996), Eddy number distribution in isotropic turbulence and its application for estimating mass transfer coefficients. *Chem. Eng. Comm.* **140**, 207-217.

**ZoBell, C.E.**, (1953). Process for removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus. U.S. patent, 2641564.