

RESUMEN

Ante el impacto ambiental ocasionado por la presencia de azufre en los combustibles fósiles, la legislación en materia de prevención de la contaminación atmosférica es cada vez más restrictiva, imponiendo límites de contenido en azufre en los combustibles cada vez menores.

Actualmente, la técnica más rentable para la eliminación de este elemento del crudo de petróleo es esencialmente la hidrosulfuración (HDS). La industria del petróleo ha sido capaz de producir combustibles con un contenido en azufre entre 300 ppm y 500 ppm por reducción mediante HDS.

Sin embargo, las legislaciones de los países más desarrollados han previsto una reducción del contenido en azufre hasta un nivel inferior a 10 y 30 ppm en diesel y gasolinas, respectivamente. Esto supondría un incremento considerable en el coste de reducción de azufre por hidrotratamiento, especialmente para combustibles más pesados, siendo muy difícil la eliminación de moléculas recalcitrantes como el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados.

Estos compuestos se pueden degradar empleando biocatalizadores en condiciones suaves de presión y temperatura. A esta técnica se le conoce con el nombre de biodesulfuración (BDS).

En este momento, parece que la forma más rentable de trabajar es empleando procesos mixtos en los que se somete previamente la fracción de petróleo a un tratamiento de HDS, y, posteriormente, al tratamiento de BDS, en el que se eliminan selectivamente los compuestos recalcitrantes al proceso anterior. De esta forma se puede llegar a conseguir contenidos finales de azufre del orden de las 10ppm.

En este trabajo se ha estudiado el proceso de BDS aerobia empleando *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, la bacteria más empleada como biocatalizador

en estudios de BDS hasta la fecha, y *Pseudomonas putida* CECT5279, bacteria modificada genéticamente. Como compuesto modelo recalcitrante a la HDS se ha empleado siempre DBT, y el solvente orgánico empleado normalmente para simular la fracción diesel ha sido hexadecano, aunque también se han realizado algunos ensayos con dodecano y tetradecano.

La ruta metabólica llevada a cabo por ambos biocatalizadores para la desulfuración de DBT consiste principalmente en dos mono-oxigenaciones sucesivas catalizadas por la enzima DszC, tras las cuales se sucede la hidroxilación reductiva de la sulfona (DBTO₂), catalizada por la enzima DszA, y por último, la formación de un producto final libre de azufre, hidroxibifenilo (HBP), y sulfito o sulfato, reacción catalizada por la enzima DszB. La cuarta enzima implicada, DszD, aporta el FMNH₂ que requieren tanto la DszC como la DszA para su actividad.

En bibliografía se han descrito una amplia variedad de formas de llevar a cabo la BDS, así como de biocatalizadores y de condiciones de operación utilizadas, y de ahí que se haya obtenido una importante dispersión en los valores de actividad de desulfuración alcanzados. Lo que raramente se encuentra descrito en literatura son trabajos que empleen medios bifásicos de reacción con elevadas fracciones de fase orgánica (FFO), trabajando la mayoría de los autores en condiciones acuosas o bifásicas, pero hasta porcentajes de solvente orgánico de 20-25% v/v.

El trabajo realizado se ha enfocado al estudio de la transferencia gas-líquido en sistemas gas-líquido-líquido, así como al estudio del proceso de BIODESULFURACIÓN, evaluando cómo afectan diferentes variables sobre el rendimiento y la actividad específica, empleando sistemas de células en crecimiento y de resting cell. Además, se han realizado numerosos ensayos con elevadas FFO.

Trabajar con elevadas FFO resulta conveniente desde el punto de vista práctico, dado que tras la desulfuración es necesario eliminar el biocatalizador y el agua de la corriente tratada, (procesos downstream), y disminuir el consumo de

agua incrementa la rentabilidad del proceso. Por otro lado, y siempre que se mantenga estable la conversión, cuanto mayor FFO sea capaz de soportar el biocatalizador mayores caudales de diesel hidrodesulfurado podrían ser tratados.

Para realizar los estudios comentados ha sido necesario establecer los protocolos de ensayo y los métodos de análisis. El seguimiento de la concentración de biocatalizador se ha realizado con espectrofotometría, determinándose la densidad óptica a 600nm. El pH, la temperatura y, en su caso, el porcentaje de saturación de oxígeno se han controlado con sensores y electrodos selectivos. Se han analizado por separado los compuestos de la ruta metabólica de desulfuración disueltos en las fases acuosa y bifásica. La concentración de compuestos en la fase acuosa se ha cuantificado mediante HPLC con detector UV y mediante cromatografía de gases con detector FID. Los compuestos solubles en el solvente orgánico han sido determinados también por HPLC, con una columna y un método distintos a los empleados con la fase acuosa. Ha de señalarse que cuando se ha trabajado con hexadecano ha sido necesario mantener todo el sistema de experimentación y análisis a una temperatura superior a los 20°C, dado el bajo punto de fusión de este solvente.

Dado que el proceso de biodesulfuración se ha llevado a cabo de forma aerobia, se ha determinado el **coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $K_{L,a}$, gas-líquido**. En el sistema de BDS se han puesto en contacto tres fases, (solvente orgánico, agua y aire), y por tanto el coeficiente se ha determinado en condiciones de emulsión y para distintas condiciones de operación y configuraciones de reactor. No hay muchos estudios en bibliografía de sistemas de este estilo.

Tanto en tanque agitado como en airlift, el $K_{L,a}$ es menor en las emulsiones que en los líquidos puros, alcanzando un mínimo entorno a una FFO del 70% v/v. La velocidad de agitación y el caudal aumentan el $K_{L,a}$, pero es más notorio el efecto con el aumento de la agitación.

Además, se han empleado modelos teóricos, previamente desarrollados por el grupo de investigación, y semiteóricos de transferencia de materia para

sistemas bifásicos gas-líquido, obteniendo buenos resultados, especialmente para los líquidos puros y las FFO cercanas a 0 ó 1.

En segundo lugar se ha llevado a cabo el estudio del **crecimiento del biocatalizador**, que tiene por objeto lograr elevadas concentraciones del mismo en el menor tiempo posible, alcanzando la mayor capacidad desulfurante. A fin de emplear posteriormente las células para la biocatálisis en medios emulsionados, se ha observado de forma aislada la influencia de la FFO y del DBT sobre la replicación celular.

Se ha comprobado que la presencia de un solvente orgánico no afecta significativamente al crecimiento hasta ensayar fracciones del 50% v/v. En cambio, el uso de DBT como fuente de azufre si tiene un efecto muy negativo sobre el mismo.

En bibliografía numerosos autores han estudiado el **proceso de BDS aerobia de DBT con células en crecimiento**, pero, como ya se ha indicado con anterioridad, en pocos casos han utilizado FFO elevadas.

En este sentido se han estudiado distintas composiciones del medio donde se lleva a cabo la reacción, con el objeto de incrementar tanto la concentración de biocatalizador obtenida como los rendimientos de desulfuración. Para superar además las limitaciones en el proceso, que principalmente son la velocidad de transferencia de DBT a la fase acuosa y los posibles efectos de inhibición, se ha evaluado el papel de una segunda fuente de carbono adicional y la adición de complejos supramoleculares, (ciclodextrinas), que forman complejos con el DBT y con el HBP.

Los resultados muestran que el aumento de FFO incrementa los problemas de transferencia de DBT a la fase acuosa, y que en medios bifásicos aumentar la concentración inicial de DBT supone el aumento de la densidad celular final obtenida, mientras que se mantienen estables los porcentajes de desulfuración.

Por otra parte, la adición de una mezcla de fuentes de carbono como el glicerol y el succinato de sodio incrementa la actividad de desulfuración, mientras que la ciclodextrina empleada, en las condiciones de ensayo, no incrementó como era esperable la transferencia de DBT, ni evitó completamente los efectos de inhibición por acumulación de HBP.

Con toda la información obtenida, y basándonos en modelos propuestos en los últimos años en bibliografía, se ha establecido el modelo cinético que describe el proceso de BDS con células en crecimiento. El modelo cinético de Haldane, que describe la inhibición por sustrato, simula correctamente lo observado en la experimentación con este tipo de sistema.

Otra forma de llevar a cabo el proceso de biodesulfuración es con células en parada de crecimiento, o **resting cell**. En primer lugar se crece el biocatalizador, extrayendo las células en el punto concreto del crecimiento en el que alcancen la máxima capacidad de desulfuración. Posteriormente esas células se ponen en contacto con el DBT en un medio libre de nutrientes. Ese medio además incluye una fuente de energía que asegure el suplemento fisiológico de electrones.

Algunos autores han comprobado que obtienen rendimientos de desulfuración superiores a los que obtienen con los mismos biocatalizadores con células en crecimiento. Por tanto, el último bloque de este trabajo se ha enfocado al estudio del proceso de BDS con este tipo de sistemas.

Tras una serie de estudios preliminares se ha decidido emplear como medio de reacción un medio que consiste en un tampón HEPES a pH 8, con DBT disuelto en etanol (manteniendo la concentración del alcohol por debajo del 1% v/v), y utilizando hexadecano como solvente orgánico.

La influencia de la FFO es otra de las variables fundamentales, dado que, de forma habitual, implica el descenso de los rendimientos alcanzados e incluso llega a suponer el cese de la actividad de desulfuración. Ha de mencionarse que en bibliografía existen diferentes opiniones respecto a las conclusiones obtenidas en

el estudio de la influencia de la fase orgánica en procesos de BDS con células en resting cell. Posiblemente las diferencias observadas estén relacionadas con la concentración de biocatalizador que sea utilizada en cada caso, puesto que la presencia de biocatalizador cambia las propiedades fluidodinámicas del medio, modificando el patrón de transferencia de DBT.

También se ha estudiado la influencia de la concentración inicial de DBT y de la concentración de biocatalizador sobre el proceso de BDS. Con la combinación de estos tres factores, influencia de la FFO, de la concentración de DBT y de la concentración de biocatalizador se concluye que la velocidad del proceso de BDS no está limitada por la transferencia de materia cuando se emplean sistemas en resting cell con elevadas FFO y concentraciones de sustrato, y bajas densidades celulares, dado que entonces es la velocidad de bioconversión la que controla el proceso.

A pesar de que en bibliografía aparecen referencias en las que se describe el efecto inhibitor del producto final de la ruta de desulfuración sobre la continuidad del proceso, no se han encontrado estudios que profundizaran en este fenómeno. Por tanto, se ha considerado oportuno llevar a cabo un estudio detallado sobre los efectos de inhibición debidos a la acumulación de producto, tanto en medios acuosos como bifásicos, y finalmente se han propuesto modelos cinéticos que describen la evolución del proceso de BDS, con los dos tipos de biocatalizadores comentados. Del estudio se deduce que la evolución del proceso de BDS con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se describe con un modelo de cinética enzimática con inhibición competitiva por acumulación de producto, mientras que el modelo cinético planteado por Michaelis-Menten simula correctamente los resultados obtenidos de los ensayos en resting cell con *Pseudomonas putida* CECT5279.