

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PETRÓLEO

En nuestros días, la sociedad tecnológica moderna depende totalmente de una amplia variedad de recursos minerales derivados de la litosfera. Desde principios del siglo XX dos nuevos recursos geológicos vinieron a sustituir al carbón como principal fuente de energía: el *petróleo* y el *gas natural*. Además el petróleo proporcionó compuestos hidrocarburos que sirven para sintetizar un sinnúmero de compuestos químicos nuevos, los petroquímicos, que constituyen materiales esenciales en la industria y en la vida actual.

Estos recursos geológicos comprenden el grupo de **recursos no renovables de la tierra**, puesto que los procesos geológicos para su formación requieren millones de años.

La palabra “*petróleo*” proviene de las voces latinas *petra* y *oleum*, que significan piedra y aceite, no porque sea aceite de piedra sino por estar aprisionado entre piedras. Este término general abarca la gama de productos comprendidos por un lado entre el petróleo bruto y el gas natural, y por el otro, entre el asfalto y otros hidrocarburos saturados semisólidos emparentados con él. Se ha sugerido que el petróleo bruto procede fundamentalmente de proteínas animales y que el gas natural deriva de materia vegetal alterada. Según el Diccionario Hispánico Universal, la definición es “líquido oleoso más ligero que el agua y de color oscuro y olor fuerte, que se encuentra nativo en el interior de la Tierra y a veces forma grandes manantiales. Es una mezcla de carburos de hidrógeno, que arde con facilidad, y después del refinado tiene diversas aplicaciones”

El *petróleo bruto* o *crudo* en estado natural es una mezcla de una gran variedad de compuestos hidrocarburos, que difieren mucho de unos yacimientos a otros. En general, los *compuestos parafínicos* (lineales, ramificados, ciclados,

1. INTRODUCCIÓN

aromáticos y especies complejas) son los más abundantes, tanto en el petróleo líquido como en el gas natural. La composición media elemental puede ser de un 85% de carbono, 12% de hidrógeno, 3% de la suma de elementos azufre, oxígeno y nitrógeno, y varios elementos metálicos.

Tabla 1.1.- Elementos de composición del petróleo típico.

Elemento	Porcentaje por peso		
	Petróleo crudo	Asfalto	Gas natural
Carbono	82-87	80-85	65-80
Hidrógeno	12-15	8.5-11	1-25
Azufre	0.1-5.5	2-8	Trazas-0.2
Nitrógeno	0.1-1.5	0-2	1-15
Oxígeno	0.1-4.5	-	-

Obtenido de "Strahler. Geología Física. Ed. Omega, 1992."

El contenido de azufre en el crudo varía en los diferentes yacimientos en el rango de 0.03% en peso a valores superiores al 8%, (Rall y col., 1972), e incluso hasta el 30%, (Kropp y Fredorak, 1998). Los constituyentes más importantes son compuestos orgánicos azufrados, pero también hay azufre inorgánico como azufre elemental, ácido sulfhídrico y piritas, (Tissot y col., 1984).

Han sido identificados en el crudo de petróleo más de 200 compuestos orgánicos con azufre, incluyendo sulfuros, mercaptanos y tiofenos. La distribución y cantidad de tales compuestos orgánicos depende de los distintos yacimientos y de la madurez del crudo, de forma que los más inmaduros químicamente son ricos en azufre y compuestos azufrados no tiofénicos, mientras que los aceites maduros contienen una importante proporción de benzotiofenos y dibenzotiofenos alquilados, de elevado peso molecular.

Debido a la ubicuidad de los derivados benzo- y dibenzotiofenos en todos los crudos, estos compuestos representan la mayor parte del azufre contenido en los mismos.

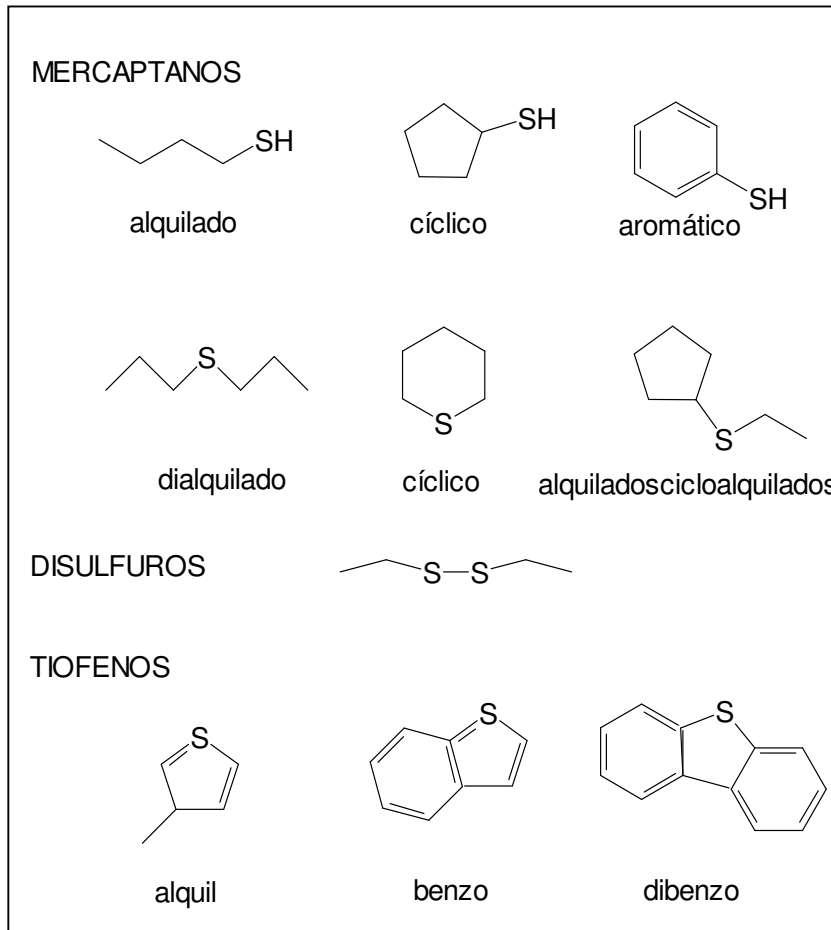


Figura 1.1.- Estructura química de los compuestos orgánicos azufrados en el crudo.

Por otro lado, se distinguen dos tipos de crudo, *de base parafínica*, cuando éstas son las que dominan en abundancia, tiene una densidad baja y lo normal es que dé buenos lubricantes y una elevada proporción de keroseno, y de *base asfáltica*, si tiene una densidad grande, denominándose *crudo pesado*. Este segundo crudo sirve sobre todo para la producción de combustibles en forma de aceites.

En la composición del petróleo encontramos tanto componentes hidrocarburoados como componentes no hidrocarburoados. En la tabla 1.2. se indica la composición del petróleo de acuerdo con esta clasificación.

Dada la complejidad de especies presentes en el petróleo, ha de considerarse éste como un conjunto de fracciones que pueden identificarse en

1. INTRODUCCIÓN

función de su distinta volatilidad, presentándose en forma sólida, líquida y gaseosa.

Tabla 1.2.- Composición del Petróleo.

<i>Compuestos Hidrocarburos</i>	<i>Compuestos no hidrocarburos</i>
Parafinas, (alcanos): C_nH_{2n+2} , $n = n^\circ$ de átomos de carbono; n-parafinas (cadenas lineales), iso-parafinas (cadenas ramificadas)	Compuestos sulfurados: mercaptanos, sulfuros alifáticos, sulfuros cíclicos, tiofenos, benzotiofenos y dibenzotiofenos
Naftas, (cicloparafinas): $C_nH_{2n+2-Rn}$, $Rn = n^\circ$ de anillos	Compuestos de nitrógeno: básicos y no básicos
Aromáticos: $C_nH_{2n+2RN-6RA-RAS}$, $R_N = n^\circ$ de anillos de naftenos, $R_A =$ anillos aromáticos, $R_{AS} =$ anillos de al menos 6 carbonos	Compuestos de oxígeno
Insaturados	Compuestos mixtos: compuestos complejos de alto peso molecular que contienen C, H, O, S y N.

Reservas mundiales de petróleo y gas

El petróleo ha sido la principal fuente de energía del siglo XX y, pese a los esfuerzos por utilizar otras fuentes energéticas, todavía el petróleo cubre casi el 40% de la demanda mundial de energía primaria, (aquella obtenida directamente de recursos de la naturaleza). Sin embargo, la importancia del petróleo reside también en su utilización como materia prima para la síntesis de numerosos productos químicos orgánicos y muchos inorgánicos.

La mayor parte de las reservas probadas de petróleo se hallan concentradas en unas pocas regiones del planeta. Oriente Medio cuenta con más de la mitad de las reservas mundiales conocidas de petróleo bruto. De los casi 350.000 millones de barriles, Arabia Saudí cuenta con aproximadamente el 40%, y Kuwait, Irán e Irak tienen la mayor parte del resto. Otro importante centro de acumulación de reservas petrolíferas son las tierras que rodean el golfo de México y el mar Caribe, con grandes reservas en la región de la costa estadounidense del Golfo y en Venezuela.

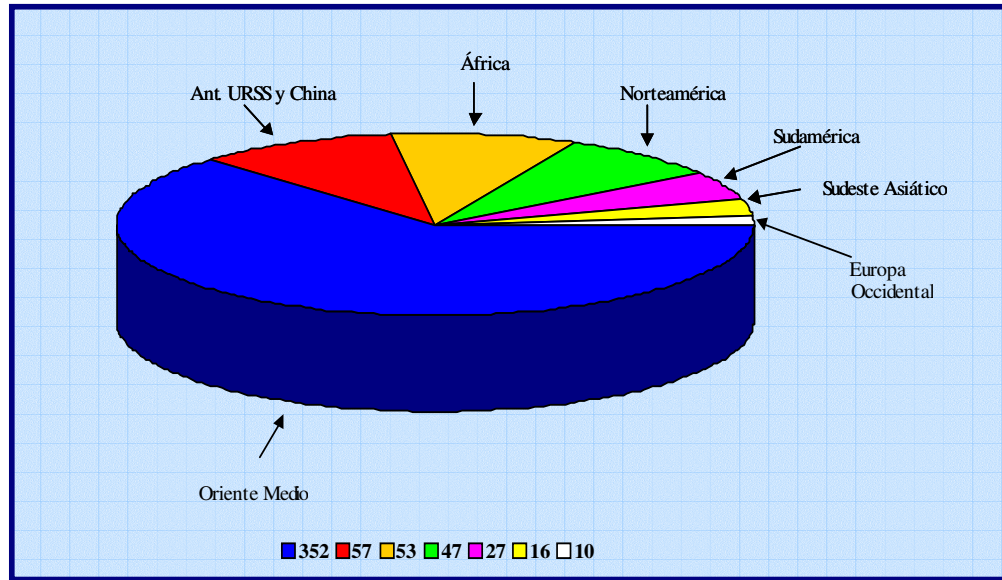


Figura 1.2.- Reservas probadas de petróleo bruto en miles de millones de barriles (1 tonelada equivale a 7 barriles). Cifras procedentes del National Petroleum Council. “Strahler. Geología Física. Ed. Omega, 1992.”

En relación a las estimaciones del total máximo explotable de recursos de petróleo bruto de todo el globo, según el *Oil and Gas Journal* el 1 de enero de 1993 se ofreció una estimación de algo más de 1 billón de barriles (143 gigatoneladas). Por otro lado, Richard L. Jodry realizó una estimación basada en el análisis detallado de cada área potencialmente productora del mundo. Sus estimaciones se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1.3.- Reservas mundiales calculadas de petróleo bruto máximo explotable.

Países	Reservas			
	% reserva vs reserva mundial*	MMB**	% gastado de reserva	MMB
Ant. URSS	26.3	514	6.0	30.8
África	9.9	193	7.0	13.5
Asia-Pacífico	5.0	98	8.0	5.9
Canadá	3.6	70	2.0	1.4
EEUU	9.7	190	50.0	95
Europa no comunista	2.4	47	4.0	1.9
México	1.13	22	2.0	0.44
Oriente Medio	30.8	601	9.0	54.1
Otros países comunistas	3.2	62	1	0.62
Sudamérica	7.94	155	22	34.1

*1952 miles de millones de barriles; ** miles de millones de barriles (1barril ≅ 159L)
 Datos modificados de “Strahler. Geología Física. Ed. Omega, 1992.”

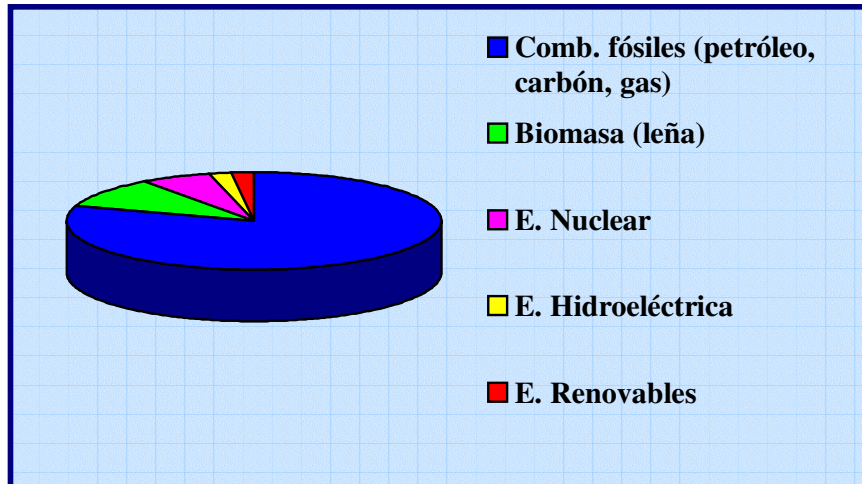


Figura 1.3.- Consumo de Energía Primaria en el mundo.

La demanda del petróleo fue exponencial, desde principios del siglo XX, hasta que comenzó su desaceleración, a partir de 1973 debido a las alzas continuadas en los precios del crudo impuestas por la organización e Países Productores de Petróleo (OPEP).

Tabla 1.4.- Consumo de energía primaria en la Unión Europea y España, desglosado por fuentes de energía.

Fuente de Energía	(%) Unión Europea ₂₀₀₁	(%) España ₂₀₀₃
Petróleo	40.3	50.3
Gas natural	23.1	15.8
Carbón	14.7	15.2
Nuclear	15.5	11.9
Saldo eléctrico	0.2	0.1
Hidráulica	2	2.5
Eólica	0.2	0.8
Biomasa	3.8	2.9
Solar térmica	0.03	0.03
Geotermia	0.2	0.01
Biogas	-	0.2
Biocarburantes	-	0.1
Solar fotovoltaica	-	0.002
R.S.U.	-	0.2

Datos obtenidos del IDAE, 2005.

Sin embargo, y desafortunadamente, el problema del crudo no es tan sólo un problema de cantidad. Conforme se agotan las reservas actualmente explotadas se extrae un crudo con cada vez menor calidad, y mayor contenido en azufre.

1.2. LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

Las causas por las que la emisión de compuestos contaminantes a la atmósfera es cada día más elevada son diversas. El incremento demográfico y la concentración en zonas urbanas de la población, el correspondiente aumento de la demanda energética, el aumento exponencial de la producción y el modelo de organización de la actividad industrial y de la utilización de la tecnología productiva son los principales motivos.

En la siguiente tabla se muestran los principales contaminantes atmosféricos, sus principales fuentes de producción y los efectos sobre la salud humana más importantes.

Tabla 1.5.- Fuentes y efectos tóxicos de los principales contaminantes atmosféricos.

<i>Compuesto</i>	<i>Fuente</i>	<i>Toxicidad</i>
CO	Transporte	Envenenamiento de la sangre (carboxihemoglobina)
No _x	Combustión a alta temperatura	Irritante
COV	Smog Fotoquímico en presencia de NO ₂ y O ₃	Carcinógeno
So _x	Combustión de compuestos azufrados	Diversos, embolia pulmonar
O ₃	Formación en presencia de NO ₂ , O ₂ y radiación solar	Congestión pulmonar
Pb	Vehículos de gasolina	Daños al sistema nervioso, anemia
NH ₃	Agricultura, Ganadería, Pesca, y Fuentes Naturales	Daños vías respiratorias
Gases Invernadero	Combustión, Transporte, Tratamientos de residuos, Agricultura y Ganadería	Calentamiento atmosférico, desequilibrio climático

Modificado de "Ingeniería Ambiental. Ed. Mc Graw Hill, 1999".

La nueva frontera de las actividades industriales está representada por la conocida "regla de los tres ceros", es decir, cero defectos en la producción, consumo cero de recursos y emisión cero.

Dada la necesidad de reducir costes operacionales, la producción industrial se esta orientando hacia la eliminación de emisiones y residuos dentro de su mismo ciclo productivo, de forma que se incremente la productividad, incorporando nuevas tecnologías e incrementando la competitividad.

1. INTRODUCCIÓN

Impacto Ambiental: Lluvia Ácida

Dado que aún en nuestros días, el petróleo cubre casi el 40% de la demanda mundial de energías primarias, todos los aspectos relativos a su explotación incurren en numerosos impactos ambientales.

Después del carbono y el hidrógeno, el azufre es el elemento químico más abundante en el crudo, oscilando entre el 0.05 y 5% en peso. Por otro lado, la calidad del crudo está disminuyendo, a medida que se van agotando los mejores yacimientos, (Kropp y Fedorak, 1998), extrayéndose crudos con mayores contenido en azufre. La mayor parte de ese azufre se encuentra en compuestos orgánicos, tales como mercaptanos, disulfuros, sulfuros y tiofenos.

Durante la combustión del crudo se produce la emisión de elevadas cantidades de productos sulfurados a la atmósfera, especialmente en las actividades industriales y en el transporte.

El azufre se emite directamente como óxidos de azufre, o indirectamente como ácido sulfhídrico procedente del refinado del crudo o de la limpieza del gas natural antes de su distribución. Estos óxidos de azufre en la atmósfera, en contacto con vapor de agua, se convierten en ácido sulfúrico, regresando a la superficie dando lugar a lo que se conoce como "lluvia ácida", comprendiendo este término también la niebla y la nieve ácida.

En general, la lluvia ácida precipita lejos de la fuente de contaminación primaria, originando además un problema transfronterizo.

Sin embargo, éste no es el único problema, dado que el alto contenido en azufre también genera problemas técnicos, como el envenenamiento de catalizadores, corrosión, etc.

En relación con la salud, la combustión del azufre induce la formación de aerosoles de sulfato. Estudios epidemiológicos de la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA) han reportado que el tamaño medio de tales

aerosoles ronda valores de 2.5µm, ocasionando severos problemas en el sistema respiratorio.

Según lo reportado en el Informe Internacional “Energy Outlook 2003, (IEO 2003)” sobre el consumo energético mundial, la demanda energética se incrementará en un 54% durante los próximos 24 años, estimándose un aumento de $404 \cdot 10^{15}$ Btu, (British Thermal Units) en 2001 a $640 \cdot 10^{15}$ Btu en 2025, siendo cada Btu equivalente a 1055J.

Debido al incremento de dicha demanda, en la actualidad las normativas medioambientales relativas a la protección de la contaminación atmosférica, (Directiva 2003/17/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de marzo de 2003, por la que se modifica la Directiva 98/70/CE relativa a la calidad de la gasolina y del gasóleo), imponen límites cada vez más restrictivos en cuanto a los contenidos de azufre en los niveles de emisión. Según lo reportado por Le Borgne y col., 2003, la EPA ha propuesto la reducción del contenido en azufre del diesel desde 500ppm a 15ppm, para el año 2006. La Directiva 98/70/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 1998, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo y por la que se modifica la Directiva 93/12/CEE, del Consejo (DOCE nº L 350, de 28.12.98), establece el límite de contenido de azufre en los carburantes para el transporte por carretera. El combustible diesel en 2005 deberá ser del tipo ULSD, (ultra low sulfur diesel), y dentro del 2010 del tipo NZSD, (near zero sulfur diesel). En la siguiente tabla se muestra la evolución de los niveles de azufre permitidos en los carburantes dentro del territorio Europeo.

Tabla 1.6.- Evolución de los límites legales de contenido de azufre en Europa.

Año	1993	1996	2000	2005	2010
Diesel [S] ppm	2000	500	350	50	10
Gasolina [S] ppm	500	500	150	50	30

En la actualidad, el sector del transporte es uno de los que más aporta al incremento de la contaminación atmosférica.

Los vehículos a motor son además los grandes derrochadores de energía y de terreno. Sin embargo, la economía y el bienestar social actual han hecho de los

1. INTRODUCCIÓN

mismos elementos vitales, sobre todo considerando que la producción y distribución de mercancías y servicios dependen del transporte. En 1986, la OCDE estimó que el coste socioeconómico del transporte por carretera, incluyendo la contaminación generada, la congestión del tráfico y los accidentes, se eleva al 5% del PIB, excluyendo cualquier tipo de contribución al calentamiento global.

Las principales fuentes de contaminación atmosférica causada por vehículos de motor proceden de los gases de escape, pérdidas por evaporación del depósito de combustible y del carburador, pérdidas del cárter del cigüeñal y polvo de las ruedas (caucho), forro o guarnición del freno y discos del embrague (amianto).

Aunque la contaminación del aire producida por los vehículos es inferior a la que proceda de fábricas y residencias, la gran acumulación de vehículos en zonas urbanas obliga a tener en cuenta este foco de contaminación. En las zonas urbanas, una elevada proporción de las concentraciones de monóxido y dióxido de carbono, hidrocarburos y plomo en la atmósfera proceden de las emisiones de los vehículos.

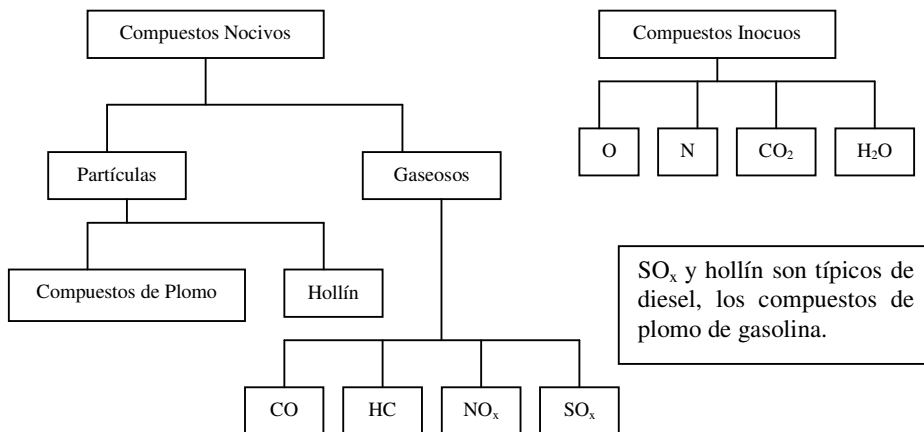


Figura 1.4.- Componentes de las emisiones de escape de vehículos.

Debido a que las emisiones de los motores diesel son visibles, producen olores y contienen concentraciones relativamente altas de materia particulada inhalable e hidrocarburos, causan una mayor inquietud pública.

La disminución de la contaminación del aire debida a las emisiones de los vehículos depende principalmente de la reducción de contaminación de los vehículos desde el origen. Los métodos disponibles, sin contar la instalación de convertidores catalíticos, incluyen el nuevo diseño de carburantes, el uso más eficiente de motores de encendido de mezcla pobre y el uso de vehículos eléctricos.

La investigación científica se está centrando en el desarrollo de tecnologías mediante las cuales se produzca un diesel con menor contenido en azufre.

El nuevo tipo de gasóleo, que será denominado en toda la UE “Gasóleo sin Azufre”, presenta numerosas ventajas:

- a.-reducción de la emisión de contaminantes
- b.- mejora de las prestaciones del motor
- c.- incremento del número de cetano, indicador de la capacidad autocombustiva del combustible cuando es nebulizado y comprimido dentro de la cámara de combustión.

En Europa, la Directiva 2001/81/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Octubre de 2001, sobre techos nacionales de emisión de determinados contaminantes atmosféricos, determinó que España debía lograr, para 2010, el techo de 746 kilotoneladas de SO₂, 847 kilotoneladas de NO_x, 662 kilotoneladas de COV y 353 kilotoneladas de NH₃.

La utilización de diesel ULSD permite, además de la reducción de las emisiones a la atmósfera de SO₂, la disminución de las emisiones de materia particulada, PM10. De hecho, desde la comercialización de algunos de los tipos de ULSD, (Bludiesel, Biodiesel y Ecodiesel), se ha observado una disminución de las emisiones del transporte en carretera de SO₂ del 91% en el periodo comprendido entre los años 1980 y 2001.

1.3. EXPLOTACIÓN INDUSTRIAL DEL PETRÓLEO

Las fases de explotación industrial del crudo son, la *prospección*, el *sondeo*, la *extracción*, el *transporte* (por vía marítima o terrestre), el *refino* y la *petroleoquímica*.

Las tareas desde la *prospección* o estudio geológico y el transporte del crudo se denominan *upstream*, mientras que el resto se conocen con el término *downstream*.

Estas operaciones *downstream* comienzan con el **refino**. El bruto estabilizado se elabora de acuerdo al destino de los productos y a la constitución molecular del mismo, lo que se denomina *base del crudo*.

Las fases del refino son:

- 1) La **destilación fraccionada**, en la que se obtienen las distintas fracciones, (gasolinas, gasóleos...)
- 2) El **craqueo**, proceso por el cual las fracciones de poca utilidad en el mercado son convertidas, mediante ruptura térmica o catalítica, en otras más demandadas, (fundamentalmente gasolina).
- 3) El **reformado**, proceso por el cual se modifican las estructuras de las cadenas carbonadas para elevar su calidad carburante
- 4) El **refino final**, en el que se depuran los productos obtenidos, eliminando compuestos indeseables, (compuestos azufrados, etc.).

La *destilación fraccionada* es el proceso fundamental. En las instalaciones donde se lleva a cabo el crudo se calienta, y como puede verse en la figura 1.4., se alimenta la primera columna, de donde salen las fracciones gas (GLP) y gasolina. En las corrientes laterales extraídas de la columna se rectifican las fracciones de queroseno y gasóleo. El residuo o cola resultante es a su vez fraccionado análogamente, pero a vacío o por arrastre con vapor de agua. Con ello se obtienen nuevas cantidades de gasóleo, fracciones centrales, (lubricantes), y un residuo que

se emplea como combustible (mazut), o para revestir carreteras, (asfalto o bitumen).

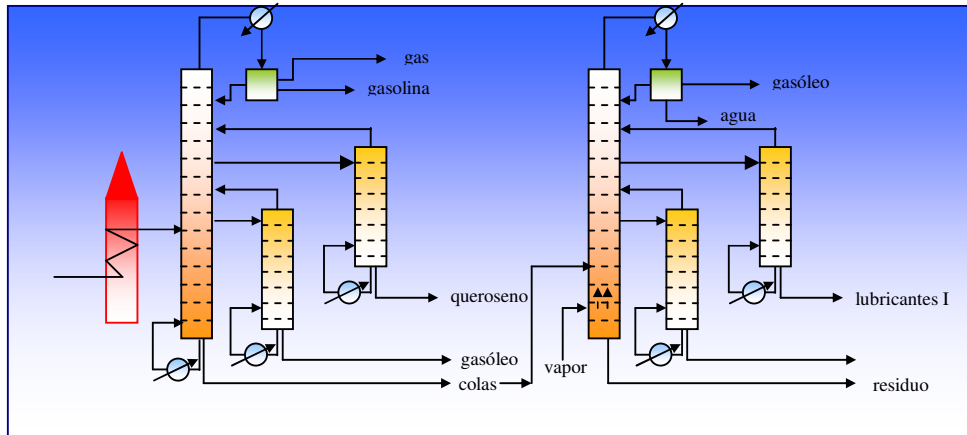


Figura 1.4.- Esquema del fraccionamiento por volatilidad del crudo estabilizado.

La tabla 1.7. indica las fracciones obtenidas en el proceso de destilación fraccionada.

Tabla 1.7.- Fracciones obtenidas por orden de volatilidad y longitud de cadena

	Producto	Intervalo Tª ebullición	Long. Cadena carbonada	Aplicaciones
Fracciones ligeras	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.
	Gasolina directa	<20°C	C ₃ -C ₄	
	Nafta pesada	40-150°C	C ₅ -C ₉	
Fracciones medias	Queroseno	150-200°C	C ₁₀ -C ₁₂	Lámparas de alumbrado, carburante para turborreactores. Carburante para motores diesel, calefacción doméstica.
	Gas-oil	170-250°C	C ₁₃ -C ₁₇	
Fracciones pesadas	Fuel-oil ligero	250-320°C	C ₁₇ -C ₂₀	Combustible para buques, locomotoras, etc. Mat. prima para: lubricantes, ceras y parafinas, cremas, aceites esenciales. Pavimentación, techado, impermeabilización, abrasivos y electrodos.
	Fuel-oil pesado	340-400°C	C ₂₀ -C ₃₅	
	Asfaltos	400-500°C	>C ₃₅	
		>500°C		

Los *crudos parafínicos* dan un gasóleo que se usa como carburante, por lo que de las fracciones medias del crudo éste es el producto más importante. Éste carburante tiene cada día mayor importancia, compitiendo con la gasolina no sólo

1. INTRODUCCIÓN

por su contribución al transporte pesado, sino también por su contribución a motores ligeros muy revolucionados, (motores de autocombustión o *ciclo diesel*).

Normalmente, la proporción de fracciones ligeras que puede sacarse de un crudo no es tan elevada como fuera de desear, con respecto a las exigencias de mercado. Por ello, las refinerías han evolucionado para convertir, vía craqueo *térmico, catalítico o hidrocraqueo*, las fracciones pesadas de la destilación a vacío en fracciones más ligeras. En los últimos años las refinerías utilizan procesos de conversión más profundos, consiguiendo así un barril más “blanco”.

Los procesos de reformado son en muchos casos similares a los de craqueo catalítico, salvo por su principal objetivo, dado que si bien el craqueo se realiza para incrementar el volumen de gasolina obtenido, el reformado aumenta la calidad carburante de una fracción de volatilidad parecida a la de la gasolina, (nafta), y elevar su poder antidetonante, o *índice octano (IO)*.

1.3.1. Tratamientos de depuración.

Los tratamientos de depuración se llevan a cabo tanto sobre los productos intermedios como sobre los productos finales del refino. El principal objetivo de estos tratamientos es la eliminación de los compuestos sulfurados.

Los principales tratamientos de depuración pueden agruparse en refino físico y químico.

Refino Físico: aplicado generalmente sobre fracciones pesadas como aceites pesados y residuos de la destilación primaria. Los principales tratamientos son el *desparafinado*, el *desasfaltado*, la *extracción con disolventes*, (sistema líquido-líquido) y la *decoloración*.

Refino Químico: aplicado sobre todo en las fracciones lubricantes, que se tratan bien con ácido sulfúrico, bien mediante lavado álcali.

Dentro del refino químico, uno de los principales procesos es el “*Hidrotratamiento*”, que consiste en una hidrogenación catalítica a presión. Los catalizadores más utilizados son generalmente mezclas de óxidos de molibdeno y cobalto, Mo_2O_3 y Co_2O_3 sobre óxido de aluminio, Al_2O_3 , que luego reaccionan y forman CoMoO_4 . Este tratamiento actualmente tiende a aplicarse a varios tipos de gasóleos por las restricciones legales referentes a la emisión de compuestos azufrados a la atmósfera. En los casos en que el único propósito del hidrotratamiento es la eliminación del azufre, se denomina al tratamiento *hidrodesulfuración*.

Procesos de desulfuración

El proceso de desulfuración se considera parte de los procesos de purificación en el refino del crudo. Esta operación tiene un objetivo doble, la eliminación de compuestos sulfurados para cumplir las normativas de aplicación, y purificar la fracción del crudo que sea posteriormente enviada a procesos con catalizadores especialmente sensibles al azufre.

Existen dos posibilidades de desulfuración, sobre el crudo, a la entrada en la refinería, *up-stream*, o sobre los productos de la destilación, *down-stream*. Hoy en día este proceso se realiza habitualmente sobre las fracciones extraídas en el refino.

La desulfuración distingue entre Tratamiento de desulfuración reductiva y Tratamiento de desulfuración oxidativa.

La **Hidrodesulfuración (HDS)** es el tratamiento de desulfuración reductiva. Los tratamientos de desulfuración oxidativa son los **Lavados Cáusticos** y los procesos de **Biodesulfuración**.

En la actualidad, tan sólo el proceso físico-químico conocido como *Hidrodesulfuración (HDS)* resulta económicamente viable para la desulfuración de las principales fracciones destiladas y por tanto, es el generalmente utilizado en

las refinerías. Esta técnica consiste en el tratamiento del crudo con hidrógeno catalítico y altas presiones y temperaturas.

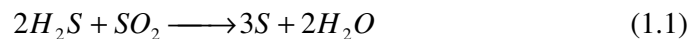
1.4. HIDRODESULFURACIÓN (HDS)

La HDS es la tecnología físico-química establecida para la eliminación de compuestos organoazufrados, (Speight, 1981).

El hidrotratamiento consiste en esencia en mezclar las fracciones extraídas de crudo con un flujo de gas enriquecido en hidrógeno e hidrocarburos sobre un lecho de catalizador, antes o después de precalentarse a la temperatura adecuada, entre los 260 y los 425°C. Las presiones típicas del proceso varían en el rango entre 5 y 10 MPa, dependiendo del rendimiento requerido.

En presencia del catalizador de óxidos metálicos, (Mo_2O_3 , Co_2O_3), la mezcla del gas y el crudo reacciona, de manera que los compuestos aromáticos de azufre, nitrógeno y oxígeno se transforman respectivamente en ácido sulfhídrico, amoníaco, metales libres y agua, mientras que las olefinas se hidrogenan y pasan a convertirse en hidrocarburos con saturación limitada de aromáticos. Así, y aunque la principal función del hidrotratamiento es la desulfuración del crudo, se pueden llegar a cabo también desnitrogenaciones, desoxidaciones, deshalogenaciones, hidrogenaciones y craqueos de hidrocarburos.

Una vez detenida la reacción, los metales permanecen en la superficie del catalizador mientras que el resto de productos son extraídos del reactor. Este efluente es enfriado antes de llegar a un separador, donde se separa el crudo tratado del gas rico en hidrógeno. En una columna de rectificación se agota el crudo de cualquier sulfuro de hidrógeno remanente y de las colas ligeras, y el gas se trata para eliminar el sulfuro de hidrógeno, (Gary y Handwerk, 1980), mediante un proceso **Claus**, (1.1).



La principal ventaja de este tratamiento radica en su poca selectividad, de forma que se desulfura un amplio rango de tipos de compuestos orgánicos azufrados, y el elevado grado de conocimiento e implantación de esta técnica.

Actualmente, 20 millones de barriles de crudo de petróleo son tratados diariamente en el mundo, usando temperaturas superiores a los 300°C, y presiones que rondan las 100 atm, (Ohsiro y col., 1999).

Pero a medida que se intentan reducir los contenidos de azufre en las fracciones del crudo, se hacen necesarias condiciones más drásticas de temperaturas y presión en el proceso de HDS, elevando por tanto los costes y riesgos en las instalaciones.

Por otra parte, la presencia en el medio de metales, oxígeno y nitrógeno afecta a la actividad del catalizador, y además, según el grado de aromaticidad de los compuestos azufrados, se incrementa la complejidad de los catalizadores.

Por último, siempre quedarán en el medio compuestos persistentes, como el grupo de los *dibenzotiofenos*, (Monticello, 1998).

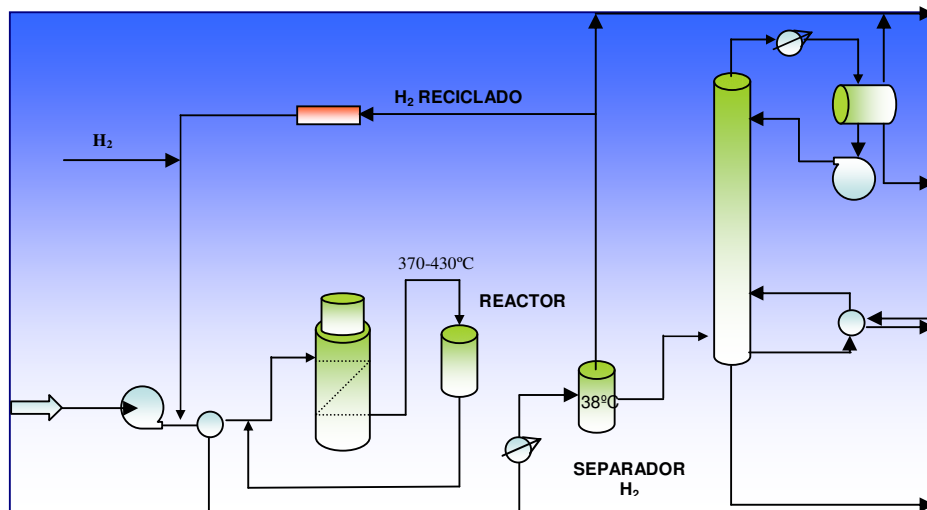


Figura 1.5.- Esquema del proceso de HDS.

1.4.1. Hidrodesulfuración del dibenzotiofeno (DBT).

Houalla y col., 1980, describieron la reacción de HDS del dibenzotiofeno (DBT), tal y como se describe en la figura 1.6. La vía de conversión transcurre con un consumo mínimo de hidrógeno, siendo muy lenta la hidrogenación de bifenilo y ciclohexilbenceno (CHB). La velocidad de la hidrogenación del DBT se incrementa a mayores concentraciones de H_2S , a expensas de la hidrogenólisis. Además, la concentración de CHB varía según el catalizador aplicado.

El DBT y sus derivados alquilados, con sustituciones adyacentes al átomo de azufre, son refractarios a los catalizadores convencionales usados en la HDS. En los últimos años se están investigando catalizadores con base en platino o paladio, dado que están dando elevadas actividades de hidrogenación, (Robinson y col., 1999).

Kabe y col., 2001, han reportado que la presión parcial de H_2S tiene un potente efecto inhibitor de la actividad y selectividad catalítica, en reacciones de desulfuración estrictas.

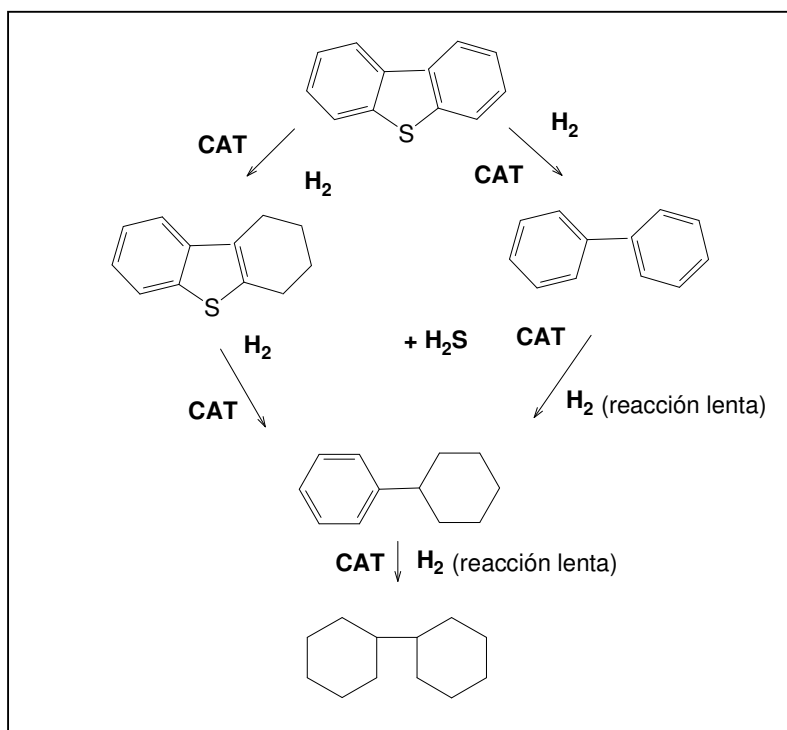


Figura 1.6.- Mecanismo de HDS del DBT, (CAT = catalizador).

Setti y col., 1999, reportan que en la HDS, la actividad del catalizador es de 0.4-18g DBT eliminado /g de catalizador·h, (Singhal y col., 1981).

1.5. *BIODESULFURACIÓN (BDS)*

La BDS es el término genérico que engloba toda ruta metabólica en la que los microorganismos actúan como biocatalizadores de la reacción de desulfuración. (Monticello y Finnerty, 1985), pudiéndose aplicar tanto a la desulfuración del carbón, como a la de petróleo y sus diferentes fracciones.

El uso de microorganismos puede ofrecer un camino alternativo para la eliminación específica de azufre de fracciones de hidrocarburos, sin la alteración del esqueleto de carbono. Además, la Biodesulfuración (BDS) es un proceso medioambientalmente benigno, dado que se realiza a bajas presiones y temperaturas, lo que también supone una importante reducción de los riesgos y costes de las instalaciones.

El DBT y sus homólogos han sido ampliamente utilizados como compuestos organo-azufrados modelo para el estudio de la BDS de fracciones petrolíferas, (Kilbane y Bielaza, 1990).

Debido a la baja actividad enzimática, las velocidades de conversión no resultan aceptables desde el punto de vista industrial, por lo que la BDS debe ser considerada como una tecnología complementaria a la HDS, de forma que el contenido en azufre del crudo se reduzca primero a 200-300ppm, para posteriormente tratar el efluente con microorganismos, disminuyendo el contenido en azufre a los niveles legislados, que establecen próximos límites de concentración de azufre de 10ppm.

En cuanto a los metabolismos asociados a procesos de BDS, éstos pueden clasificarse en función del aceptor de electrones, (McFarland, 1999), en **metabolismos anaerobio, aerobio o anaerobio facultativo.**

1. INTRODUCCIÓN

En el caso del anaerobio, el catabolismo se realiza en ausencia de oxígeno, produciéndose tras el proceso ácido sulfhídrico. Según lo reportado por Oshiro e Izumi, 1999, los niveles de reducción de azufre no son importantes. *Desulfovubrio desulfuricans* M6, una bacteria reductora de sulfato, es el principal microorganismo capaz de eliminar el azufre del DBT anaeróbicamente, aislando bifenilo como producto principal. Sin embargo, dado que elimina el azufre asimilando los átomos de carbono del hidrocarburo, no es interesante por la pérdida del contenido combustible.

El metabolismo en condiciones aerobias es llevado a cabo por infinidad de grupos microbianos. En este caso, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones y se alcanzan elevados niveles de desulfuración.

Por último, el metabolismo anaerobio facultativo es el que desempeñan grupos de microorganismos capaces de utilizar oxígeno u otros aceptores de electrones, según la presencia o no de oxígeno en el medio.

Por las ventajas que presentan frente al catabolismo anaerobio, los estudios de BDS se han centrado en los metabolismos aerobios, o anaerobios facultativos.

Una de las principales desventajas del proceso de BDS se encuentra en el alto grado de especificidad de las enzimas encargadas del metabolismo de los compuestos orgánicos azufrados. Además, el uso de agua como medio de reacción imprescindible para la supervivencia de los microorganismos implica numerosos problemas de transferencia de los compuestos orgánicos a degradar, así como en las posteriores operaciones de separación de fases, *downstream*. Por otro lado, han de considerarse los costes de la producción de una cantidad suficiente de biocatalizador, como la eliminación de residuos generados durante el proceso. Entre las ventajas de la biodesulfuración caben destacar el menor requerimiento energético y la eliminación de compuestos con azufre difíciles de eliminar con técnicas más clásicas.

1.5.1. Mecanismos de biodesulfuración (BDS) aerobia

El dibenzotiofeno, DBT, y sus análogos han sido empleados ampliamente como compuestos orgánicos azufrados modelo en la BDS aerobia de fracciones petrolíferas, dado que estos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) son refractarios al proceso convencional de HDS, (Kilbane y Bielaza, 1990).

El metabolismo de la molécula de DBT por parte de los microorganismos consiste en la adición de oxígeno a un átomo de carbono adyacente a otro de azufre, lo que hace más susceptible a la ruptura al enlace C-S, (338KJ/mol). Este mecanismo es muy habitual en las conversiones microbiológicas aerobias, donde enzimas dioxigenasas introducen moléculas de oxígeno para facilitar la ruptura del enlace C-S. El azufre sobrante se separa del crudo en forma de sulfito-sulfato o de sulfuro de hidrógeno o H₂S.

Cualquier proceso de BDS se ve afectado por factores físico-químicos y biológicos, dependiendo estos últimos del tipo de microorganismo seleccionado y su capacidad para asimilar compuestos de azufre, (Setti y col., 1994).

Los primeros estudios que reportaban la conversión aerobia del DBT fueron los de Kodama y col., 1973, en los que se definía una transformación del DBT que consiste en la ruptura del enlace de uno de los anillos aromáticos, mientras que el azufre no resulta liberado de la molécula. Esta ruta, conocida como ruta metabólica de Kodama, se clasifica como **ruta destructiva**, por la pérdida de carbono, (Kodama y col., 1970; Monticello y col., 1985).

Otra posibilidad es la desarrollada por *Brevibacterium* sp., microorganismo que emplea DBT como fuente única de carbono, azufre y energía, (Van Afferden y col., 1990), pero de nuevo alterando el valor calórico del crudo tratado. Este tipo de ruta se engloba dentro de las denominadas **rutas metabólicas semidestructivas**.

Kilbane y col., 1990, aislaron la primera cepa capaz de desulfurar selectivamente el átomo de azufre de la molécula de DBT, desarrollando una **ruta**

1. INTRODUCCIÓN

no destructiva. La cepa descubierta se denominó *Rhodococcus erythropolis*, (o *rhodochrous*). De esta forma, la matriz carbonosa queda intacta, pero libre de azufre, (Kilbane y Jackowski, 1992; Omori y col., 1992; Olson y col., 1993).

Existen numerosos microorganismos capaces de metabolizar compuestos recalcitrantes a la HDS, incluyendo bacterias de tipo Gram negativo y positivo, (filamentosas y no filamentosas), levaduras y hongos, (Kilbane, 2006). Sin embargo son pocos los que eliminan el azufre a través de esta ruta selectiva, (no destructiva), en la que se rompe el enlace carbono-azufre de la molécula de DBT, sin la degradación del anillo, (Gallardo y col., 1997).

Ohshiro y col., 1999, aporta otra clasificación relacionada con la anterior, indicando que existen tres tipos de metabolismos aerobios asociados a la degradación del azufre de compuestos orgánicos, el metabolismo primario el secundario y el terciario.

En el **metabolismo primario** se produce una oxidación parcial de la molécula de DBT, permaneciendo intacto el enlace carbono-azufre. Este metabolismo se corresponde con la ruta destructiva en la clasificación anterior.

En el **metabolismo secundario** el DBT sirve a la vez de fuente de carbono, azufre y energía, produciéndose pigmentos indeseables a la vez que se pierde valor calórico por disminución del contenido de carbono. Este se corresponde con la ruta semidestructiva.

Y en el **metabolismo terciario**, propiamente asociado a la desulfuración, el DBT es utilizado como fuente única de azufre, pero no de carbono. Este se corresponde con la ruta no destructiva.

En las figuras 1.7. y 1.8. pueden observarse las rutas que corresponden a los metabolismos descritos. Además, en la figura 1.8. se muestran los compuestos de la ruta no destructiva, denominada ruta 4S, que resulta ser la más atractiva para su utilización en procesos de BDS.

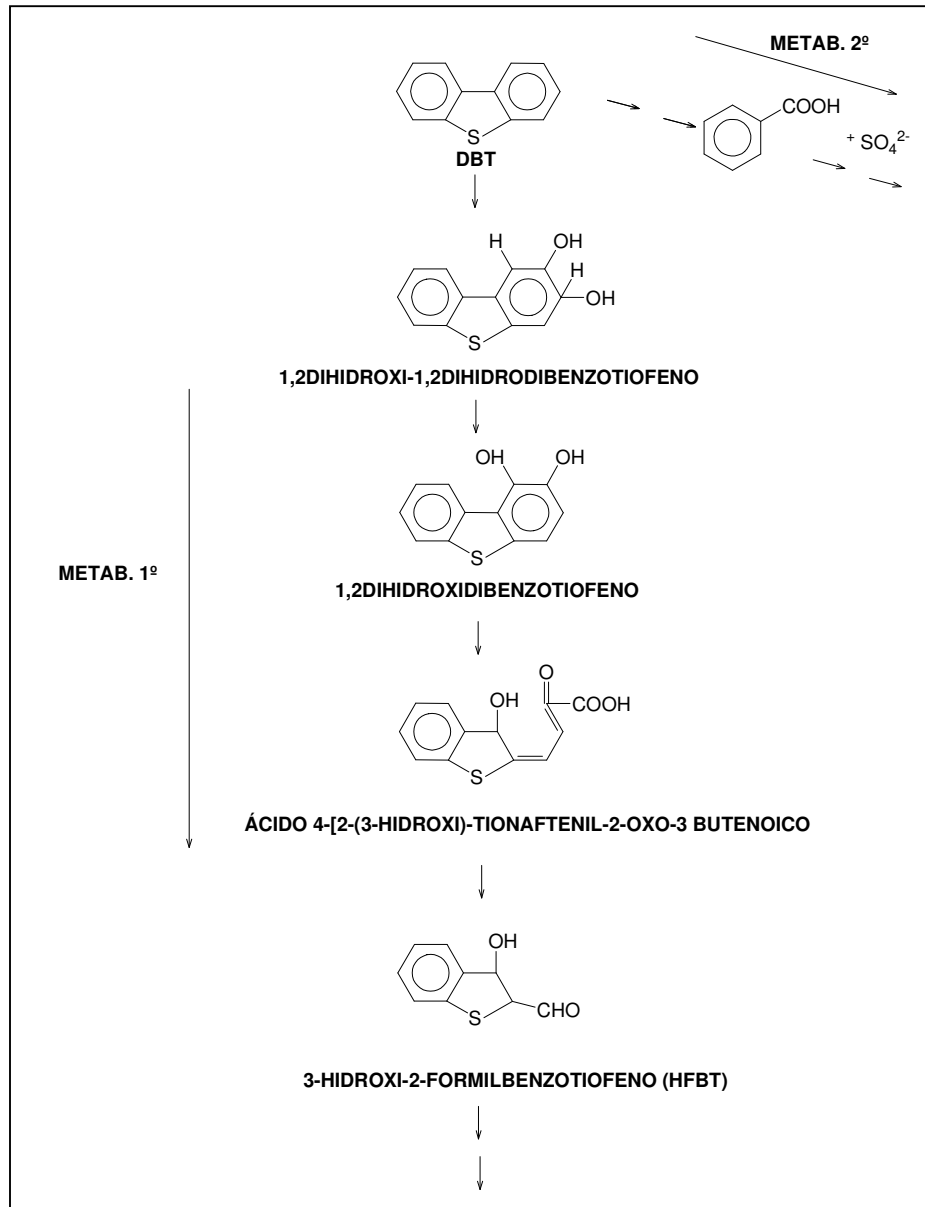


Figura 1.7.- Rutas de degradación microbiana con ruptura de enlaces C-C. (McFarland, 1999)

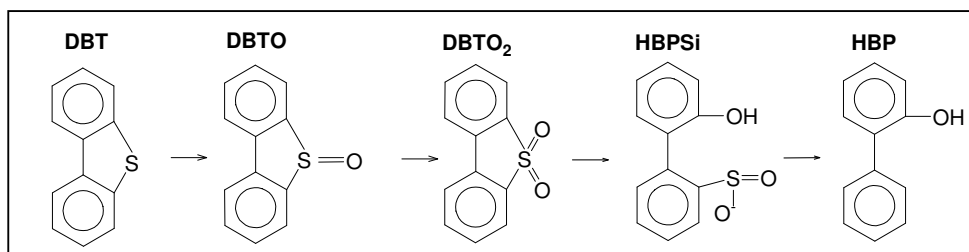


Figura 1.8.- Ruta de desulfuración microbiana con ruptura de enlace C-S. Metabolismo terciario. (McFarland, 1999).

1.5.2. Desulfuración del DBT con ruptura del enlace C-S.

Como se ha indicado en el apartado anterior, *R. erythropolis* IGTS8 es capaz de llevar a cabo una oxidación selectiva en etapas, sin metabolizar el esqueleto de carbono. Esta cepa es además capaz de metabolizar un gran rango de compuestos orgánicos azufrados como única fuente de azufre, (Kayser y col., 1993; Izumi y col., 1994).

La ruta metabólica específica para la desulfuración del DBT comprende cuatro pasos enzimáticos sucesivos, por lo que es conocida como **ruta metabólica 4S**. Al eliminarse el azufre de la molécula de DBT, tras los sucesivos pasos de la ruta, se obtiene 2-hidroxibifenilo (HBP), (Gallagher y col., 1993).

Ruta metabólica 4S

Para la desulfuración del DBT *R. erythropolis* IGTS8 emplea tres enzimas, DszA, DszB y DszC, localizadas en el operón que codifica el plásmido dsz, (Denome y col., 1993, 1994; Ohshiro y col., 1994; Piddington y col., 1995; Konishi y col., 2000A, Monticello, 2000). Analizando los productos intermedios y finales, Oldfield y col., 1997, elucidaron los pasos de la ruta metabólica 4S.

Para consumir el DBT intervienen en los primeros pasos dos monooxigenasas, (Monticello, 2000; Yan y col., 2000; Castorena y col., 2002; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Gray y col., 2003; Furuya y col., 2005).

Como se indica en la figura 1.9., los dos primeros pasos de oxidación del azufre del DBT son catalizados por la monooxigenasa DszC, resultando primero en dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO) y después en dibenzotiofeno sulfona (DBTO₂), (Oldfield y col., 1997). La enzima DszC es excepcional en cuanto a que requiere FMNH₂ como cosustrato, mientras que la clásica monooxigenasa dependiente de flavin utiliza un enlace FAD cofactor, (Holland, 1988).

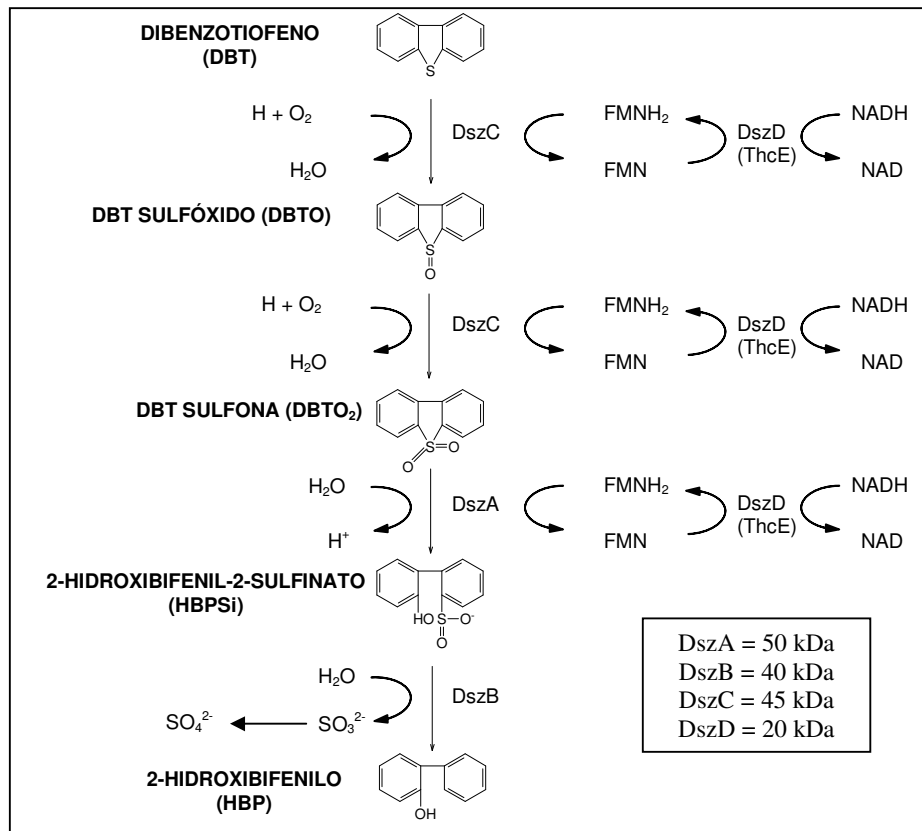


Figura 1.9.- Ruta metabólica de desulfuración 4S, desarrollada por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. (Adaptado de McFarland, 1999).

En el tercer paso, la también monooxigenasa DszA cataliza la conversión de la sulfona a (2'-hidroxibifenil)-benzene sulfonato (HBPSi), y el último paso, catalizado por una sulfonasa (DszB), termina en un compuesto orgánico libre de azufre, 2-hidroxibifenilo (HBP) y sulfito o sulfato.

En esta ruta de desulfuración la producción de HBP y sulfato es estequiométrica, (Kilbane, 1990; Gallagher y col., 1993; Klein y col., 1994, etc.).

Estudios de Setti y col., 1999, prueban que la cepa de *Rhodococcus* sp. no es capaz de asimilar sulfito como fuente de azufre, mientras que el sulfato es asimilado y por tanto, no se acumula en el medio. Confirmando estas conclusiones, Yang y Marison, 2005, observaron que la velocidad de aparición de sulfato no está directamente relacionada con la producción de HBP, dado que parte del mismo es incorporado por las células.

Cofactores en la ruta metabólica 4S

Estudios enzimáticos sobre *R. erythropolis* D-1 han revelado el papel esencial del NADH como cofactor, (Izumi y col., 1994; Ohshiro y col., 1994 y 1996B; Ohshiro e Izumi, 1999). Las dos monooxigenasas DszC y DszA son flavin dependientes, (Xi y col., 1999). La cuarta enzima por tanto es una flavin-oxidoreductasa (DszD), que proporciona el FMNH₂ requerido por las monooxigenasas, (Gray y col., 1996; Xi y col., 1997).

En el proceso de la ruta de desulfuración 4S se gastan cuatro moléculas de NADH por cada molécula de DBT desulfurado, (Oldfield y col., 1997). Existen autores que incluso han concluido que el factor limitante de la velocidad de BDS es la actividad de la enzima DszD, (Ohshiro y col., 1995; Gray y col., 2003).

Ohshiro y col, 1994, demostraron la importancia del NADH en el proceso de BDS, y Setti y col, 1997 reportaron que el problema de la regeneración del mismo era clave en el sistema. Sin embargo, Alcón y col., 2005, determinando la concentración de NADH y FMNH₂ y la actividad de la enzima flavin-óxido-reductasa (DszD) en el interior de células de *Pseudomonas putida* CECT5279, observaron que en sus condiciones experimentales la concentración de los equivalentes reducidos y la actividad de la DszD no limitaban la velocidad de desulfuración de DBT.

Para desarrollar las cuatro etapas sucesivas que convierten el DBT en HBP y sulfito se requiere por tanto oxígeno molecular y NADH. A pH neutro la reacción global de BDS del DBT se puede expresar de la siguiente forma, (Oldfield y col., 1997):



En la primera y segunda etapa de la ruta metabólica 4S la monooxigenasa DszC es capaz de llevar a cabo la reacción de sulfoxidación secuencial de DBT a DBTO y a DBTO₂, como describe la ecuación siguiente:



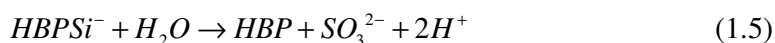
Esta enzima requiere FMNH₂ como co-sustrato, (Gray y col., 1996; Xi y col., 1997). En la cepa de *R. erythropolis* IGTS8 la enzima FMN oxidorreductasa dependiente de NADH, (Denome y col., 1994; Gray y col., 1996), conocida como DszD, es la responsable de la generación del FMNH₂, como se ha indicado antes.

La tercera etapa de la ruta de desulfuración del DBT es desarrollada por la enzima DszA, capaz de catalizar la conversión de DBTO₂ a HBPSi, siendo dependiente de NADH y oxígeno molecular.



De nuevo, DszA requiere FMNH₂ como co-sustrato, aportado por la enzima DszD, dependiente de NADH, (Gray y col., 1996).

Por último, la enzima desulfinasas DszB cataliza la conversión de HBPSi a HBP y sulfito, sin depender de NADH.



Según los estudios de varios autores, el paso limitante de la velocidad de reacción de BDS es la desulfuración de HBPSi a HBP, catalizada por la enzima DszB, (Gray y col., 1996).

Ruta alternativa de BDS no destructiva

En condiciones de crecimiento, a pH 8.0 y 30°C, estudios con *R. erythropolis* IGTS8 revelaron la presencia de DHBP como producto final de la ruta metabólica de desulfuración de DBT, (Oldfield y col., 1997).

La enzima DszA es capaz de catalizar la conversión de DBTO₂ a HBPSi, pero también de bifenilsulfonato (BPSo) a 2,2'-dihidroxibifenilo (DHBP), siendo

1. INTRODUCCIÓN

ambas reacciones dependientes de NADH y oxígeno molecular. Se ha concluido que el BPSo no es un producto intermediario de la ruta de desulfuración de DBT a HBP, por lo que se ha propuesto una ruta secundaria, que finaliza en un segundo producto libre de azufre, el DHBP.



La ruta alternativa sugerida implica la oxigenación directa de DBTO₂ a 2'-hidroxibifenil-2-sulfonato (HBPSo), (Setti y col., 1999), que a tal valor de pH se encuentra en equilibrio con la forma BPSo. Los estudios de Olson y col., 1993 identificaban pequeñas cantidades de este compuesto en los medios de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 sobre DBT, indicando además que la actividad de desulfuración específica de este microorganismo sobre BPSo era similar a la obtenida como producción específica de HBP, por la ruta 4S convencional. La producción de sulfito era estequiométrica con respecto a la producción de DHBP, tal y como también lo es en el caso de terminar la ruta en HBP.

La figura 1.10. muestra esta ruta alternativa de desulfuración.

Gallagher y col., 1993 y Setti y col., 1999, reportan que *R. rhodochrous* IGTS8 sigue rutas de desulfuración distintas dependiendo de si se encuentra en condiciones de crecimiento o de parada de crecimiento. Tan sólo con células en las que no se esté llevando a cabo replicación celular (resting cell o células en estado estacionario) la ruta de desulfuración de DBT se limita a la producción única de HBP y sulfito o sulfato.

Por tanto, en condiciones de crecimiento celular, el HBPSo se convierte en HBP o DHBP a través de una hidrólisis ácida o básica, (Omori y col., 1995), respectivamente.

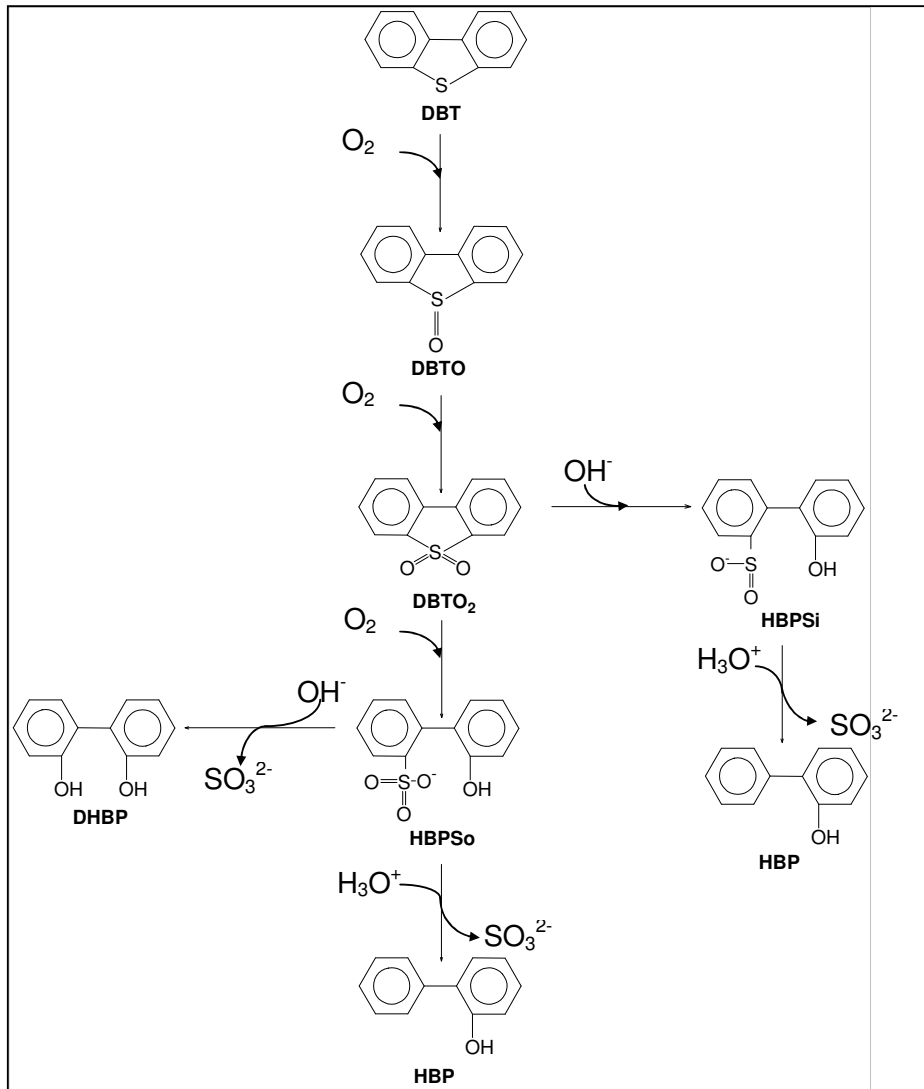


Figura 1.10.- Ruta metabólica alternativa de BDS del DBT no destructiva. (Setti y col., 1999).

Finalmente ha de indicarse que en determinadas condiciones, la ruta alternativa de desulfuración de DBT a DHBP es cuantitativamente insignificante respecto a la ruta 4S (Oldfield y col., 1997).

1.5.3. Procesos de BDS

Existen numerosas alternativas a la hora de llevar a cabo la BDS a escala industrial. El uso de biocatalizadores a esa escala implica la utilización de medios bifásicos, dado que los microorganismos requieren cierta cantidad de agua para su supervivencia. Por otro lado, su adaptación a los fuel óleos es muy elevada, y de

1. INTRODUCCIÓN

hecho, los microorganismos naturales con capacidad de desulfuración han sido aislados por *screening* de suelos contaminados por vertidos de hidrocarburos.

Biocatalizadores

Los biocatalizadores son catalizadores que emplean sustancias de origen biológico para la transformación de un compuesto en otro, presentando como ventaja, frente a los catalizadores químicos, la elevada especificidad y selectividad sobre sustratos y productos, y la posibilidad de trabajar en condiciones suaves de presión y temperatura. Por contra, se encuentran limitados ante mezclas complejas de sustratos, y son inestables.

Los biocatalizadores pueden clasificarse como **biocatalizadores con enzimas aisladas**, cuando emplean enzimas o extractos celulares, o **biocatalizadores con células enteras**, cuando se emplea una célula que mantiene en todo momento su integridad estructural.

Atendiendo a su disposición en el reactor se denominan **biocatalizadores libres**, mezclados en forma libre con el sustrato formando una emulsión o una suspensión más o menos homogénea, o **biocatalizadores inmovilizados**, cuando las enzimas o células se fijan a un soporte insoluble.

La mayoría de los trabajos publicados sobre la BDS aerobia del DBT se han realizado con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, microorganismo mesófilo aislado por Kilbane y col., 1990, pero también otros microorganismos son aplicados habitualmente, y actualmente han atraído especial interés aquellos modificados genéticamente. Entre las cepas con capacidad desulfurante se encuentran las especies de *Corynebacterium*, (Omori y col., 1992; Maghsoudi y col., 2001), *Gordona*, (Oldfield y col., 1998; Jia y col., 2006), *Nocardia*, (Chang y col., 2000) *Escherichia*, (Le Borgne y Quintero, 2003) o *Pseudomonas*, (Kertesz, 2000; Luo y col., 2003; Guobin y col., 2006).

Además, en los últimos años se ha reconocido la ventaja de emplear microorganismos termófilos, dado que se podrían alcanzar mayores velocidades

específicas de desulfuración, menores problemas de contaminación y mejoras en la estabilidad del biocatalizador. Por otro lado, aceptando que el proceso de BDS sea complementario a la HDS, se evitaría tener que enfriar la corriente hidrotratada.

Entra las especies termófilas empleadas hasta la fecha encontramos *Paenibacillus*, (Konishi y col., 1997 y 2000; Ishii y col., 2000; Osaka y col., 2001), *Bacillus subtilis*, (Kirimura y col., 2001; Ohshiro y col., 2005), *Mycobacterium phlei*, (Konishi y col., 2000; Furuya y col., 2001, 2003, 2004 y 2005; Kayser y col., 2002; Okada y col., 2002). Todas estas cepas siguen la misma ruta de desulfuración del DBT que el *R. erythropolis* IGTS8.

Muchas de las cepas que han mostrado capacidad de desulfuración selectiva del DBT son hidrófobas, de forma que en medios bifásicos se limitan los problemas de transferencia de materia.

En el trabajo de McFarland, 1999, se concluye en la necesidad de conocer y perfeccionar los biocatalizadores en aspectos de actividad específica, estabilidad, longevidad y especificidad, así como en las condiciones de regeneración del biocatalizador para hacer el proceso de biodesulfuración aplicable comercialmente.

En bibliografía se ha observado una importante amplitud en el rango de actividades de desulfuración obtenidas por diferentes biocatalizadores y en distintas condiciones de operación.

Las actividades de desulfuración pueden ser expresadas en términos de micromoles de HBP por gramo de célula seca y hora. En la tabla 1.8. se muestran algunos ejemplos.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.8.- Actividades específicas de desulfuración en varios sistemas de BDS

Microorganismo	AE*	Referencias
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA 2-5-1, (natural)	74	Kobayashi y col., 2000
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA 2-5-1, (natural)	50	Hirasawa y col., 2001
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA 2-5-1, (modificado genéticamente)	280	Hirasawa y col., 2001
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA 2-5-1, (modificado genéticamente)	250	Konishi y col., 2005
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8	72	Kilbane y Le Borgne, 2004
<i>Rhodococcus erythropolis</i> XP	4	Yu y col., 2006
<i>Mycobacterium</i> sp. GB	49	Okada y col., 2003
<i>Mycobacterium</i> sp. X7B	4	Li y col., 2003
<i>Mycobacterium</i> sp. G3, (natural)	178	Takada y col., 2005
<i>Mycobacterium</i> sp. G3, (promotor <i>hsp60</i> más sulfato)	35	Takada y col., 2005
<i>Mycobacterium</i> sp. G3, (promotor <i>hsp60</i>)	211	Takada y col., 2005
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8	11	Luo y col., 2003
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8, natural	16	Goubin y col., 2005
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8, con Al ₂ O ₃	40	Goubin y col., 2005
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8	13	Goubin y col., 2005

*Actividad Específica, μ mol HBP/ gCS-h (Fuente: Kilbane, 2006)

Sistemas de Operación

Para llevar a cabo la BDS existen tres formas de operación: **células en crecimiento, extractos libres de células y células en parada de crecimiento o resting cell.**

Sistemas de BDS con células en crecimiento

En este tipo de sistemas, el DBT se emplea como única fuente de azufre para incrementar la densidad celular del cultivo, (Gallagher y col., 1993; Wang y col., 1994 y 1996; Setti y col., 1995, 1996, y 1999; Omori y col., 1995; Konishi y col., 1997, 2005; Honda y col., 1998; Rhee y col., 1998; Kishimoto y col., 2000; Yan y col., 2000; Grossman y col., 2001; Schilling y col., 2002; Guchhait y col., 2005A y B). En estas condiciones, los co-factores que sostienen las reacciones de oxido-reducción requeridos por las enzimas que intervienen en la ruta metabólica 4S están siempre presentes en el medio.

La velocidad de crecimiento de las células depende por tanto de la capacidad de los microorganismos de extraer el azufre del DBT, permaneciendo las enzimas desulfurantes en permanente actividad.

En la tabla 1.9. se resumen los rendimientos alcanzados por diversos autores en sistemas de desulfuración de DBT mediante la ruta metabólica 4S, siempre en condiciones de crecimiento.

Tabla 1.9.- Revisión de los rendimientos de degradación en la BDS alcanzadas con la ruta metabólica 4S y células en condiciones de crecimiento.

Microorganismo	R _{BDS} ¹	Referencia
<i>Paenibacillus</i> sp. A11-2 ²	25% de DBT convertido a HBP	Konishi y col., 1997 y 2000; Ishii y col., 2000.
<i>Rhodococcus</i> cepa T09	Convierte DBT cuando es modificado genéticamente	Matsui y col., 2000 y 2001
<i>R. rhodochrous</i> IGTS8	1.18gDBT eliminado/gbiocatalizador·h.	Setti y col., 1999
<i>R. cepa</i> WU-K2R	57% de BT convertido	Kirimura y col., 2002
<i>R. cepa</i> ECRD-1	6ppm de S eliminado de diesel, 10% v/v	Grossman y col., 1999, 2001; Lee y col., 1995
<i>Nocardia</i> cepa CYSK2	0.28mgS/L·h, 10% v/v ³	Chang y col., 1998
<i>Gordona</i> sp. cepa 213E	Desulfura BT	Gilbert y col., 1998
<i>R. erythropolis</i> N1-36	1.8μM de HBP·h ⁻¹	Wang y col., 1996A y B
<i>Corynebacterium</i> SY1	5μM de DBT·h ⁻¹	Omori y col., 1992

¹rendimiento de la BDS; ²termófilo; ³fracción de fase orgánica

Sistemas de BDS con extractos libres de células

En numerosas ocasiones se emplean suspensiones libres de células o enzimas solubilizadas o inmovilizadas para catalizar procesos industriales de biotransformación.

En relación a la BDS aerobia de DBT, varios autores han demostrado que es posible desarrollar este proceso con extractos de células, (Ohshiro y col., 1994; Konishi y col., 2000). Sin embargo, dada la complejidad del proceso al ser una reacción metabólica multietapa, parece preferente el uso de células enteras, (Le Borgne y Quintero, 2003).

Los mayores problemas se deben a la elevada sensibilidad de las enzimas oxigenasas, que se desactivan con facilidad, y especialmente en medios en

1. INTRODUCCIÓN

contacto con solventes orgánicos, y a los constantes requerimientos de FMN y NADH.

Sistemas de BDS con células en resting cell

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre la desulfuración de DBT a HBP se realizan con este tipo de células, (Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1994; Ohshiro y col., 1996, 1997, 1999; Konishi y col., 1997; Oldfield y col., 1997; Maghsoudi y col., 2000, 2001; Castorena y col., 2002; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Luo y col., 2003; Yan y Marisol, 2005; Konishi y col., 2005A y B; Jia y col., 2006; Rashtchi y col., 2006).

Previo al proceso de BDS las células se crecen en un medio de cultivo donde se induce la síntesis de las enzimas de la ruta de desulfuración. En un punto concreto del desarrollo celular se retira el medio de cultivo por centrifugación y se emplean esas células en un medio carente de nutrientes. Empleando este tipo de sistemas la envoltura celular protege a las enzimas de la degradación por el ambiente extracelular, permitiendo el paso de moléculas a su través.

Una de las principales ventajas con este sistema es que se pueden emplear concentraciones celulares más elevadas que en el caso de crecimiento celular. La reacción tiene siempre lugar en presencia de una fase acuosa que contiene el biocatalizador y una fuente de energía que proporciona el aporte fisiológico de electrones, de forma que se regenere el FMNH₂ que requieren las enzimas DszA y DszC, (Le Borgne y Quintero, 2003). La figura 1.12. representa la ruta de desulfuración 4S incorporando el sistemas de aporte de electrones.

La tabla 1.10. muestra algunas de las actividades de desulfuración específicas alcanzadas por diferentes biocatalizadores.

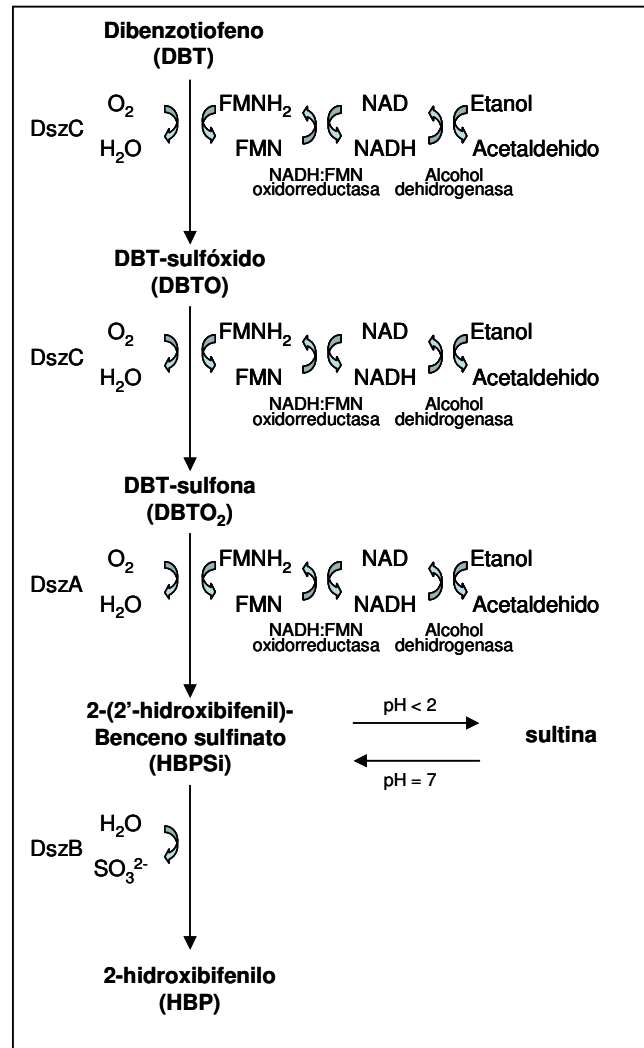


Figura 1.12.- Ruta de desulfuración 4S. Regeneración del NADH

Tabla 1.10.- Revisión de las actividades específicas de BDS alcanzadas con la ruta metabólica 4S y células en resting cell.

Microorganismo	q_p^1	q_s^2	Referencia
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA2-5-1	120	-	Kobayashi y col., 2000 y 2001; Onaka y col., 2001A
<i>R. erythropolis</i> rKA2-5-1 ³	196	-	Kobayashi y col., 2001; Hirasawa y col., 2001
<i>Mycobacterium</i> cepa G3		46	Okada y col, 2001 y 2002
<i>R. cepa</i> P32C1 ⁴	43.5 ⁵		Maghsoudi y col., 2000 y 2001
<i>R. erythropolis</i> I-19	300 ⁶	57.6 ⁶	Folsom y col., 1999
<i>Gordona</i> cepa CYSK1	8.9 ⁷		Rhee y col., 1998; Chang y col., 2000
<i>R. erythropolis</i> IGTS8	30 16.1		Kaufman y col, (1998); Honda y col, (1998); Kayser y col., (1993)

¹milimoles de HBP por kilogramos de células seca y hora, (mmolHBP/KgCS·h); ²milimoles de DBT eliminado por kilogramos de célula seca y hora (mmolDBTe/KgCS·h); ³mejorado genéticamente; ⁴identificado como *Corynebacterium*; ^{5,6}25% v/v de fracción de fase orgánica (FFO), ⁷10% v/v FFO.

1. INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la BDS no destructiva del DBT es un proceso poco estudiado, especialmente en el aspecto más aplicado. Para realizar un estudio práctico, el sistema modelo debe contener dos fases inmiscibles, consistentes en un solvente orgánico y una fase acuosa. Para que tenga lugar la biocatálisis, es imprescindible el uso de agua como medio de reacción, y en condiciones aerobias, eso implica la utilización de sistemas trifásicos gas-líquido-líquido.

La mayoría de los estudios en los que se han empleado medios bifásicos estudian la influencia de solventes como el dodecano (C12), tetradecano (C14) y hexadecano (C16), por ser mayoritarios en la fracción diesel del crudo.

La solubilidad del DBT en agua es del orden de 0.005mM, aunque puede aumentar por la acción de los surfactantes producidos por las células, (Maghsoudi y col., 2001), si bien, la capacidad de captura de DBT de la fase orgánica y su posterior introducción en el interior celular es independiente de la producción de biosurfactantes, de la capacidad del microorganismo de utilizar el n-alcano y de la composición de ácidos grasos de la célula, Noda y col., 2003B.

En cuanto a las fracciones de fase orgánica (FFO) ensayadas, la complicación de la experimentación y la importante disminución de la actividad de las células han forzado que la mayoría de los estudios se hayan llevado a cabo en condiciones acuosas, o con FFO no superiores al 25%. Luo y col., 2003, han reportado que la conversión del DBT depende substancialmente de la FFO ensayada.

Los mayores problemas encontrados en bibliografía a la hora de llevar a cabo la BDS de DBT en medios bifásicos radican en las limitaciones de transferencia de materia, dada la elevada hidrofobicidad del DBT. En este sentido, Monticello, 2000, indica que el proceso bifásico de BDS es una secuencia de pasos diferentes:

- a) el DBT, no soluble en agua, se transfiere de la fase orgánica a enzimas desulfurantes intracelulares

- b) el DBT se convierte en HBP por una ruta de 4 pasos enzimáticos que requieren de oxígeno y NADH
- c) el HBP se transfiere de las células a la fase orgánica.

La figura 1.11. esquematiza la transferencia de los compuestos que intervienen en la ruta 4S entre la fase orgánica, la interfase, la fase acuosa y la célula desulfurante.

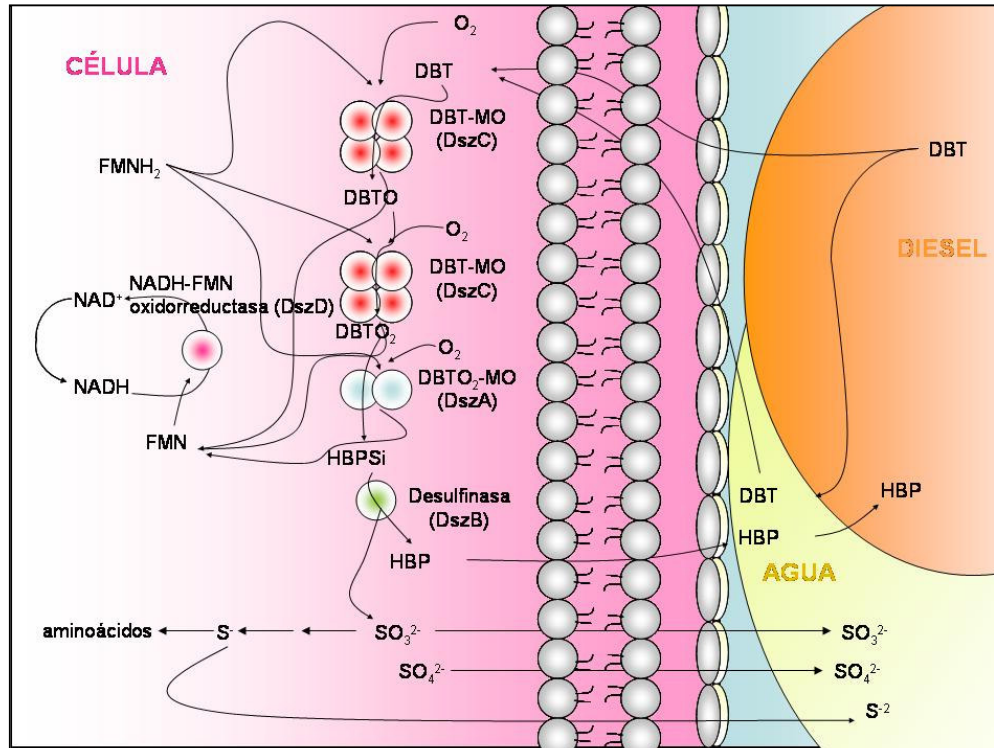


Figura 1.11.- Diagrama conceptual de la ruta 4S en medios bifásicos. (Monticello, 2000).

Tal y como indicaban Oldfield y col., 1997, el azufre en la fase acuosa de ensayos bifásicos de resting cell con *Rhodococcus* sp. se encuentra principalmente en forma de sulfato, (Yang y Marison, 2005).

Grossman y col., 2001, degradaron diesel hidrodesulfurado, en proporción de 2% de fracción de fase orgánica, con células de *Rhodococcus* sp. ECRD-1, confirmando que la degradación de DBT resulta en la formación de sulfóxido, sulfona, ácido 2-hidroxibifenil-2-sulfínico y ácido 2-hidroxibifenil-2-sulfónico, (que se convierten en sultina y sultona a pH ácido respectivamente), y HBP. Los intermedios que en mayor proporción se acumulaban en sus ensayos fueron

sulfona y sultona. Dada la baja solubilidad en agua de los compuestos organosulfurados, concluyeron que es poco probable que la biodisponibilidad de un tipo de compuesto sobre otro sea el factor que limite la eliminación de azufre.

En referencia a la escala de trabajo, en bibliografía la mayor parte de los trabajos publicados hasta la fecha se han desarrollado en erlenmeyer, aunque también hay algunos estudios en biorreactores. La mayoría de éstos trabajos se han llevado a cabo con tanques agitados, (Pacheco y col., 1999; Marcellis y col., 2003; Jia y col., 2006), aunque también hay algunos estudios con reactores de inmovilización de células enteras, (Setti y col., 1997), lechos fluidizados, (McFarland y col., 1998), reactores de contacto en fase emulsionada, (Kaufman y col., 1997; Pacheco y col., 1999) y reactores de interfase, (Oda y Ohta, 2002).

1.6. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

La desulfuración biocatalítica de las fracciones petrolíferas presenta una serie de problemas que la hacen de difícil aplicación industrial, tales como los concernientes a los mecanismos de transferencia gas-líquido, de difusión de compuestos entre la fase orgánica y la fase acuosa, y a los efectos de inhibición y desactivación celular.

En los procesos de BDS aerobia, los factores biológicos dependen del tipo de microorganismo utilizado y su capacidad para asimilar los compuestos de azufre, mientras que los factores físico – químicos críticos son la velocidad de agitación y aireación y las características del medio de cultivo, (Setti y col., 1994).

El presente estudio se ha dividido en tres bloques fundamentales. En el primero se analiza la transferencia de materia en un sistema gas-líquido-líquido en dos configuraciones de reactor, tanque agitado y air-lift, *por el método dinámico de medida (técnica de medida indirecta)*. El segundo y tercer bloque lo constituye el estudio del proceso de biodesulfuración con células en crecimiento y en parada de crecimiento o resting cell, respectivamente. En estos bloques se incluyen todos los aspectos relacionados con la ruta metabólica de desulfuración de un compuesto modelo, el dibenzotiofeno, (DBT), utilizando para ello dos tipos de

microorganismos, una natural, aislado por *screening* de suelos contaminados por vertidos de hidrocarburos, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, y un microorganismo modificado genéticamente, denominado *Pseudomonas putida* CECT5279.

1.6.1. Transferencia de materia gas-líquido.

El proceso de BDS llevado a cabo a través de la ruta metabólica 4S se realiza en un medio que incluye la fase acuosa con el biocatalizador, la fase orgánica con los compuestos a desulfurar, y aire, dado que se desarrolla en condiciones aerobias.

Para alcanzar un elevado grado de mezcla, estableciéndose condiciones de emulsión, habitualmente se emplean reactores tipo tanque agitado, (Setti y col., 1997; Le Borgne y Quintero, 2003; Marcelis y col., 2003), si bien también se han realizado investigaciones con reactores tipo airlift, reactores de contacto en fase emulsionada, reactores tipo lecho fluidizado con células inmovilizadas, (Pacheco y col., 1999; McFarland y col., 1998), y en los últimos años están cobrando importancia los reactores de membrana.

Por otro lado, y dado que se trata de un proceso con microorganismos aerobios, el conocimiento de la transferencia de oxígeno juega un papel fundamental en las condiciones óptimas de operación, y por ende, en el diseño de los equipos a utilizar.

En bibliografía no se han encontrado modelos que describan el comportamiento fluidodinámico y de transferencia de estos tipo de sistema (Lekhal y col., 1997; Cents y col., 2001.). La mayor parte de ellos son descripciones de lo experimentalmente observado.

Por tanto, abordar el desarrollo de un modelo que describa la fluidodinámica y transferencia de materia supone una importante contribución al estudio de este tipo de procesos. Para ello, se ha partido de los modelos ya desarrollados por el equipo de investigación. Se tiene una amplia experiencia en

fluidodinámica y transferencia de materia de sistemas bifásicos gas-líquido y trifásicos gas-sólido-líquido en columnas de burbujeo con y sin recirculación (García Calvo y Letón, 1991; García Calvo y col., 1999; Tobajas y García Calvo, 2000).

El efecto que produce la presencia de un solvente orgánico inmiscible sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de materia entre el gas y el líquido acuoso resulta de gran interés. Este fenómeno no está completamente entendido y se requieren más estudios para explicar los mecanismos que lo gobiernan.

Uno de los primeros estudios encontrados en literatura sobre sistemas trifásicos Gas-Líquido- Líquido es el de Yoshida y col., 1970, que estudiaron la absorción de oxígeno en dispersiones acuosas de keroseno, parafina líquida, tolueno y ácido oleico. Los efectos observados por la adición de dichos compuestos orgánicos fueron muy diferentes. De esta forma, los autores encontraron que la presencia de keroseno y parafina disminuía el coeficiente volumétrico de transferencia de materia en fase líquida y que esta disminución era lineal al aumentar la fracción de fase orgánica dispersa. Por otra parte, el agregado de tolueno y ácido oleico producía el efecto contrario, aumentando el $K_L a$ cuanto mayor era la fracción de fase orgánica.

Por otro lado, Linek y Benês, 1976, estudiaron la absorción de oxígeno y argón en sistemas G-L-L a un valor conocido de área interfacial (a) para determinar la influencia del agregado de una segunda fase líquida sobre el coeficiente de transferencia en fase líquida (K_L). En sus estudios utilizaron una mezcla de n-alcanos ($C_{11} - C_{18}$) y ácido oleico, encontrando que el valor de K_L se mantenía prácticamente constante en presencia de la mezcla de alcanos, mientras que con el agregado de ácido oleico inicialmente se producía una disminución de K_L para luego aumentar a mayores fracciones de fase orgánica.

También existen algunos trabajos relativos a la influencia de la presencia de una segunda fase líquida sobre el área interfacial. Mehta y Sharma, 1971, utilizaron el sistema $CO_2 - NaOH$ de reacción rápida para estudiar el efecto del

agregado de 2-etilhexanol sobre el área interfacial. Según estos autores, se produce un aumento del área interfacial debido a la prevención de la coalescencia de las burbujas.

Das y col., 1985, determinaron también el área interfacial para el sistema CO_2 -NaOH en presencia de 2-etilhexanol, tolueno y metilisobutilcetona. Todos los sistemas mostraron inicialmente un aumento de a junto con la fracción de fase orgánica dispersa, pero a fracciones orgánicas de aproximadamente 10%, el área interfacial empezaba a disminuir. Los autores atribuyeron el aumento del área interfacial a la prevención de la coalescencia de las burbujas, mientras que la disminución la explicaron considerando que en el reactor existía una menor turbulencia a elevadas fracciones de fase orgánica.

Modelos de transferencia de materia

En literatura se describen dos mecanismos para explicar fundamentalmente el incremento de la velocidad de absorción de un gas en sistemas trifásicos G-L-L.

El primero, denominado de Rozamiento (análogo al de sistemas G-L-S), se basa en que las gotas de fase orgánica dispersa entran en la película de transferencia en la interfase G-L, para aumentar la velocidad de transferencia debido a la mayor solubilidad del gas a ser transferido.

Basándose en este mismo mecanismo, Bruinig y col, 1986, desarrollaron un modelo homogéneo que fue comprobado con la absorción de oxígeno en dispersiones acuosas de n-hexadecano (0.5-1% v/v). Posteriormente, Brillman y col, 2000, propusieron un modelo heterogéneo, aunque demostraron que los modelos homogéneos describen los resultados experimentales bastante bien para sistemas sencillos, además de requerir un menor número de parámetros para su aplicación.

El segundo mecanismo descrito en bibliografía para explicar el aumento de la velocidad de absorción de un gas en sistemas G-L-L es el denominado de

1. INTRODUCCIÓN

Coalescencia–Redispersión, y se basa en el contacto directo entre el gas y la fase orgánica dispersa por formación de un complejo G–L (Rols y col., 1990). Luego, la velocidad de absorción de un gas aumenta debido a la existencia de un segundo camino paralelo de transferencia.

Es de destacar que todos los estudios de transferencia de materia encontrados en bibliografía sobre sistemas trifásicos G–L–L, fueron llevados a cabo en reactores tipo tanque agitado y con sistemas bastante diferentes en cuanto a composición de las fases líquidas.

Tampoco se han encontrado estudios sobre transferencia de oxígeno en columnas de burbujeo. Los únicos trabajos publicados en este tipo de reactores son con líquidos orgánicos puros, como los estudios de Kato y col., 1984 y 1985, centrados en la determinación de la fracción de gas en contacto con el líquido y la distribución longitudinal de las gotas de fase orgánica. Grund y col., 1992, estudiaron la absorción de oxígeno en líquidos orgánicos puros (metanol, tolueno y éter de petróleo).

Según lo expuesto acerca de los experimentos y modelos encontrados en bibliografía, aparentemente existe bastante confusión acerca de los mecanismos de absorción de gas en sistemas trifásicos G–L–L.

En el presente trabajo la determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de materia se ha llevado a cabo en un reactor tipo tanque agitado y en un reactor tipo air-lift, ambos con 2L de volumen de trabajo. Los parámetros evaluados en las emulsiones han sido la influencia del caudal de aire (1-6 L/min), la influencia de la velocidad de agitación (250-1000 rpm) y el efecto de la fracción de fase orgánica (0-100% v/v).

Además, empleando modelos semiteóricos, (Gomez, 1995), y teóricos, (García-Calvo, 1989), se ha estimado el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, para lo que ha sido necesario determinar las propiedades de las emulsiones. Sin embargo, en bibliografía no se han encontrado expresiones matemáticas generales para el cálculo de las propiedades de mezclas inmiscibles,

sobre todo para elevadas fracciones de fase orgánica, por lo que se han empleado como aproximación las expresiones establecidas para mezclas líquidas de dos o más componentes miscibles.

1.6.2. Crecimiento y Biodesulfuración con células en crecimiento

Este bloque de estudio se centra en la descripción del proceso de obtención del biocatalizador, con el fin de emplearlo posteriormente para la BDS de DBT con células en resting cell, pero también en el estudio del proceso de BDS con células en crecimiento.

En este trabajo las dos cepas estudiadas han sido *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y *Pseudomonas putida* CECT5279.

Rhodococcus sp. IGTS8 es el microorganismo mejor caracterizado capaz de llevar a cabo esta reacción de eliminación selectiva del azufre, (McFarland y col., 1998).

R. erythropolis IGTS8 es un microorganismo natural, aerobio, mesófilo y de tipo gram-positivo, obtenido por screening de suelos contaminados por vertidos de hidrocarburos, (Yan y col., 2000; Castorena y col., 2000; Abbad-Andaloussi, 2003; Watkins y col., 2003; H. del Olmo y col., 2005).

Los genes implicados en la ruta 4S constituyen el sistema dsz, identificados y clonados para *R. erythropolis* IGTS8 en 1993, (Denome y col., 1993). La secuencia de genes dszA, dszB, dszC y dszD están agrupados en un plásmido lineal de 120kb (Denome y col., 1994), codificando la producción de las proteínas DszA, DszB, DszC y DszD. Los genes dszA, dszB, dszC están bajo el control de un promotor sencillo, (Oldfield y col., 1997), induciéndose la producción de los enzimas por la presencia de DBT y sus análogos. La producción es inhibida por diferentes compuestos, dependiendo de las condiciones del sistema y de los microorganismos, pudiendo desactivarse las células ante la acumulación de sulfato u otros compuestos que contienen azufre, (Li y col., 1996; Oldfield y col., 1997), DBT y sus análogos, (Kayser y col., 1993; Ohshiro y col., 1996;

1. INTRODUCCIÓN

Guchhait y col., 2006). La acumulación de HBP inhibe tanto su crecimiento como la ruta de desulfuración, (Ohshiro y col., 1995 y 1996; Nekodzuka y col., 1997; Patel y col., 1997).

Pseudomonas putida CECT5279, es también un microorganismo aerobio, mesófilo y gram-negativo, modificado genéticamente para catalizar la ruta 4S dada su elevada tolerancia a los solventes orgánicos, (Luo y col., 2003). Esta cepa contiene los genes dszABC, clonados de *R. erythropolis* IGTS8, y el gen hpaC, (dszD), de *Escherichia coli* W, (Gallardo y col., 1997).

Crecimiento del biocatalizador desulfurante

No se han encontrado demasiados estudios enfocados a la optimización de las condiciones de crecimiento. Martín y col, 2004, proponen el primer modelo cinético del crecimiento, para *Pseudomonas putida* CECT5279. En este estudio se evalúa la influencia de tres fuentes distintas de carbono, glucosa, citrato y ácido glutámico, el efecto de la fuente de nitrógeno y el momento del crecimiento en que las células alcanzan la máxima capacidad de eliminar azufre del DBT, concluyendo que la composición óptima del medio de crecimiento incluye ácido L-glutámico, NH₄Cl, y que la capacidad desulfurante máxima de las células se alcanza al final de la fase exponencial de crecimiento, (Alcón y col., 2005), dado que coincide con la velocidad máxima de producción de 2-hidroxibifenilo (HBP). La velocidad máxima de consumo de DBT se encuentra en cambio bien entrado el crecimiento en la fase estacionaria.

Guobin y col., 2006, en ensayos de actividad con *Pseudomonas delafieldii* R-8 con un 25% v/v de diesel, demuestran de nuevo que la máxima actividad de desulfuración se da en las células al final de la etapa exponencial, y Maghsoudi y col., 2000, llegan a la misma conclusión con cepas de *Corynebacterium* sp. P32C1, y en ambos casos, el crecimiento se realizó en medios bifásicos.

En 2005, H. del Olmo y col. publican un modelo cinético de crecimiento para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. En dos estudios paralelos evidencian la influencia de la composición del medio, (H. del Olmo. y col., 2005A), y de las

condiciones óptimas de operación, (H. del Olmo y col, 2005B), deduciendo que para obtener células de *R. erythropolis* IGTS8 con una óptima capacidad desulfurante debe utilizarse glucosa como fuente de carbono, cloruro amónico como fuente inorgánica de nitrógeno, (dado que tiene un importante efecto sobre la capacidad desulfurante), y dimetilsulfóxido (DMSO) como fuente de azufre. Sin embargo, otros autores consideran óptimas otras fuentes de carbono, como el etanol, (Wang y col., 1996; Yan y col., 2000; Yoshikawa y col., 2002), o el succinato de sodio, (Setti y col., 1999).

En cuanto a las condiciones óptimas de operación, los estudios de H. del Olmo y col., 2005B, indican que la mayor velocidad de crecimiento y la máxima concentración final de *R. erythropolis* IGTS8 se obtienen en cultivos a 30°C, pH 6.5 controlado y concentración de oxígeno disuelto constante e igual al 20% del valor de saturación. Oda y Ohta, 1994, observaron que la cepa de *R. erythropolis* ATCC 53968 disminuía significativamente su actividad desulfurante a valores de pH inferiores a 6.25.

Tal y como se ha indicado para el caso de *P. putida* CECT5279, también *R. erythropolis* IGTS8 alcanza la máxima capacidad desulfurante al final de la etapa exponencial de crecimiento, (Wang, y col., 1996; H. del Olmo y col., 2005B).

En este trabajo, el crecimiento del microorganismo se ha llevado a cabo en las condiciones optimizadas por el grupo de investigación del Doctor F. García-Ochoa, de la Universidad Complutense de Madrid, tanto para el caso de *P. putida* CECT5279 (Martin y col., 2004), como para el caso de *R. erythropolis* IGTS8 (H. del Olmo y col., 2005A y B). Dado a que el objetivo del trabajo es evaluar el proceso de BDS aerobia de DBT en medios bifásicos, se ha estudiado el efecto de la fuente de azufre y de la fracción de fase orgánica sobre el crecimiento de las células desulfurantes.

Crecimiento con DBT

Una de las formas de llevar a cabo el proceso de BDS, como se ha descrito anteriormente, es con células en estado de crecimiento. Numerosos autores han estudiado el proceso de BDS con células en crecimiento en los que el DBT se emplea como única fuente de azufre, especialmente con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, (Omori y col., 1992 y 1995; Kilbane y col., 1992; Gallagher y col., 1993; Wang y col., 1994 y 1996; Honda y col., 1998; Ohshiro y col., 1998; Folsom y col., 1999; Setti y col., 1999; Kishimoto y col., 2000; Yan y col., 2000; Grossman y col., 2001; Schilling y col., 2002, Konishi y col., 2005; y Guchhait y col., 2005A y B).

Pseudomonas sp. se ha utilizado mucho menos que la cepa de *Rhodococcus*, pero también existen algunos autores que la han utilizado como biocatalizador del proceso de BDS con células en crecimiento, (Setti y col., 1994, 1995, 1996 y 1997; Luo y col., 2003; Guobin y col., 2006).

Para entender las variables que afectan a los procesos de BDS con células en crecimiento en medios bifásicos se ha estudiado la influencia de varios parámetros: concentración inicial de biocatalizador, tipo de fuente de carbono (L-glutámico, D-glucosa, succinato de sodio, etanol, glicerol) y fuente de azufre (sulfato de magnesio, dimetilsulfóxido, DBT), presencia de un solvente orgánico y concentración inicial de DBT.

En relación con la fuente de carbono, Setti y col., 1999, realizaron crecimientos acuosos con DBT con la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, en los que demuestra que la fuente de carbono con la que obtiene una mayor velocidad de crecimiento es el succinato de sodio.

La diferencia entre las distintas fuentes de carbono empleadas en medios de crecimiento con DBT como fuente de azufre radica, por un lado, en el gasto de oxígeno para degradar esa fuente de carbono y, por otro, en la cantidad de NADH obtenida. Para llevar a cabo el proceso de BDS con células en crecimiento, los microorganismos aerobios necesitan oxígeno molecular, así como NADH y

FMNH₂ como cosustratos, de modo que tanto el crecimiento como la producción de HBP dependen más del tipo y concentración de la fuente de carbono que del DBT. Además la fuente de carbono ha de servir para la regeneración de NADH, (Ohshiro y col., 1994 y 1995; Setti y col., 1999).

Siguiendo con los estudios sobre *Rhodococcus erythropolis* en procesos de BDS con células en crecimiento, en bibliografía existen trabajos publicados sobre el crecimiento acuoso de la cepa KA2-5-1, que utilizan cultivos discontinuos alimentados, (Yan y col., 2000; Yoshikawa y col., 2002), en los que se concluye que, comparando con glicerol o glucosa, el etanol es la fuente de carbono más recomendable, en términos tanto de actividad de producción específica de HBP como de crecimiento del biocatalizador, siempre que su concentración en el medio no supere el 1% v/v.

En referencia a la fuente de azufre los estudios de Yan y col., 2000 y Yoshikawa y col., 2002, evalúan el efecto de distintas fuentes tanto sobre la actividad específica de desulfuración como sobre el crecimiento. Estos estudios indican que, cuando se utiliza DBT como única fuente de azufre, la máxima actividad específica y concentración de biomasa final se obtienen para ratios DBT/etanol 2.9mg/g, y observaron que se inhibe el crecimiento a partir de una concentración de 1mM de DBT en el caldo. Además, debido a la baja solubilidad del DBT en agua, observaron el proceso con otras fuentes de azufre, y obtuvieron mayores concentraciones celulares y actividades específicas de desulfuración con ácido 2-aminoetanosulfónico.

Más recientemente, Konishi y col., 2005, estudian un modelo de crecimiento alimentado, que mantiene constante la concentración de etanol, y de fuente de azufre, hasta las 24h. A partir de ese momento la alimentación de fuente de azufre es exponencial. Con este modelo de alimentación exponencial en discontinuo obtienen muy elevadas densidades celulares con aún más altas actividades en la desulfuración, comparando con el sistema anterior, usando una fuente de azufre mucho más económica, sulfato de amonio.

1. INTRODUCCIÓN

En referencia al medio de reacción, las mayores limitaciones de un proceso de BDS con células en crecimiento en medios bifásicos se encuentran en la velocidad de transferencia de DBT a la fase acuosa, (dado que la ruta de desulfuración 4S sólo se activa cuando el DBT está biodisponible), y en la desactivación celular inducida por la falta de co-factores o por procesos de inhibición.

En medios bifásicos con *Rhodococcus* sp. ECRD-1, Grossman y col., 2001, han observado una disminución importante de la actividad de las enzimas limitantes de la ruta 4S, y proponen usar técnicas como la evolución direccionada para evitar dicha pérdida de actividad.

La concentración de DBT es otra variable fundamental en medios bifásicos. En estas condiciones, para aumentar la velocidad de bioconversión de DBT es necesario tener elevadas concentraciones de DBT en fase orgánica, debido al efecto de la difusión, (Setti y col., 2003). Maghsoudi y col., 2001, indican que el crecimiento de *Rhodococcus* sp. P32C1 no se ve afectado por la concentración de DBT, en un rango entre 0.05 y 0.5mM, si bien, con células crecidas con 0.1mM de DBT obtienen células cuya actividad de desulfuración en parada de crecimiento alcanza una velocidad de producción de HBP muy elevada, del orden de 30mmolHBP/KgCS·h.

Para incrementar la velocidad de transferencia de DBT a la fase acuosa se pueden emplear también receptores supramoleculares. Estos compuestos aúnan la capacidad de formar complejos con el DBT para introducirlo en la fase acuosa, con la de formarlos con el producto final de la ruta 4S, el HBP, y transferirlo a la fase orgánica. Así se evita la desactivación de la síntesis de proteínas Dsz, responsables de que se exprese la ruta de desulfuración 4S, (Marzona y col., 1997; Setti y col., 2003).

Dado que el crecimiento celular se detiene siempre antes de que se consuma toda la fuente de DBT presente en el medio de reacción, se ha estudiado si la causa es el agotamiento de los cofactores implicados en la ruta de desulfuración. Para llevar a cabo este estudio se han realizado crecimientos con

relativamente altas densidades celulares iniciales, en los que se ha adicionado fuentes de carbono fácilmente asimilables por la célula, con las que se regenera el NADH implicado en la recarga de FMN_{H2}.

Además, se ha desarrollado un estudio cinético para describir, por un lado, el crecimiento del microorganismo y por otro, y de manera conjunta, la evolución de la biomasa y de la ruta de BDS.

Algunos autores han observado que en procesos de BDS con células en crecimiento existe un descenso en la producción de HBP que sigue una cinética de primer orden, y que puede deberse a un conjunto de factores como la exposición al solvente, las limitaciones nutricionales y la exposición al incremento de concentración de HBP, (Schilling y col., 2002). Por otro lado, también hay estudios en bibliografía que indican que existe inhibición por sustrato, siendo en este caso el DBT el sustrato limitante del crecimiento, (Guchhait, y col, 2005A y B). Por tanto, se estudiará si existe inhibición por sustrato, determinándose la concentración de DBT que inhibe tanto el crecimiento bacteriano como el desarrollo de la ruta metabólica de desulfuración 4S.

La mayoría de los ensayos se han desarrollado a escala de erlenmeyer. A escala de fermentador comercial tipo tanque agitado, de 2L de volumen total de trabajo se han llevado a cabo algunos estudios, como la comparación entre dos fuentes de carbono distintas, la influencia de la FFO y una comparativa entre ambos biocatalizadores. El régimen de operación ha sido siempre discontinuo

1.6.3. Biodesulfuración con células en resting cell

Como se ha descrito previamente, el proceso de BDS de DBT puede llevarse a cabo con células estacionarias (resting cell). Además, algunos autores han observado un incremento significativo de las actividades de desulfuración empleando sistemas de células en resting cell, (Ohshiro y col., 1996A; Oldfield y col., 1997; Setti y col., 1999).

Numerosos autores han evaluado este tipo de procesos en **medio acuosos**, (Olson y col., 1993; Gallagher y col., 1993; Chae y col., 1996; Ohshiro y col., 1996A; Oldfield y col., 1997; Kishimoto y col., 2000; Osaka y col., 2000; Matsui y col., 2001; Yoshikawa y col., 2002; Rashtchi y col., 2006; etc.), y en **medios bifásicos**, (Konishi y col., 1997; Kaufman y col., 1997; Maghsoud y col., 2000 y 2001; Furuya y col., 2001, 2003, 2004, 2005; Kirimura y col., 2001; Kobayashi y col., 2001; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Luo y col., 2003; Guobin y col., 2006; Jia y col., 2006; Rashtchi y col., 2006, etc.).

Los parámetros objeto de estudio más importantes han sido: el medio de reacción, la fracción de fase orgánica empleada en medios bifásicos, la concentración inicial de DBT y de biocatalizador, así como el efecto de la acumulación de HBP.

Medio de reacción

En relación con la fase acuosa empleada en este tipo de procesos, la mayoría de los autores emplean un medio estándar de reacción con tampón fosfato como fase acuosa. En este estudio se compararán los rendimientos obtenidos en el proceso de BDS empleando tampón fosfato de sodio o HEPES, 12g/L. En cuanto a las condiciones de operación, la mayoría de los autores trabajan con microorganismos mesófilos, con velocidades de agitación entre 150-300rpm y pH neutro o ligeramente básico, (Ohshiro y col., 1999 y H. del Olmo y col., 2005). Por tanto, nuestros ensayos se llevarán a cabo siempre a escala de erlenmeyer, agitados en incubadora orbital a 250rpm, manteniendo la temperatura en 30°C. Además, se evaluarán los rendimientos obtenidos a pH 7 y 8.

La mayoría de las referencias bibliográficas enfocadas al proceso de BDS en medios bifásicos utilizan dodecano, tetradecano o hexadecano como solvente orgánico. Habitualmente, el DBT se añade disuelto en etanol, y además se incluye una fuente de energía que asegure el suplemento fisiológico de electrones, (Le Borgne y Quintero, 2003). Por ello, se ha evaluado el uso de los tres solventes citados, la adición de etanol o emulsionantes tipo Tween 20. En relación con la

fuerza de energía, en todos los ensayos había una concentración suficiente de glicerol.

Además se ha estudiado la influencia de la adición de una segunda fuente de carbono al medio y la mejora de la transferencia y solubilidad del DBT a la fase acuosa, dado que en los ensayos en condiciones bifásicas se ha encontrado que el mayor problema es el descenso en la actividad específica de desulfuración.

Luo y col., 2003, evaluaron la BDS en resting cell utilizando como fase acuosa un medio de crecimiento u otros tampones, no encontrando diferencias significativas en los rendimientos. Por tanto, concluyeron que no hacen falta más cofactores o agentes reductores de los presentes en el inóculo.

De manera habitual, los ensayos en condiciones bifásicas se han realizado con fracciones de fase orgánica de 50% v/v, dado que este porcentaje constituye un buen compromiso entre la actividad y la necesidad de desarrollar la reacción de BDS en presencia de un solvente orgánico, (Abbad-Andaloussi y col., 2003).

Debido a que en medios bifásicos el DBT se encuentra disuelto en la fase orgánica, dada su elevada hidrofobicidad, algunos autores han evaluado en diferentes condiciones los problemas de transferencia de materia en los sistemas de BDS con células en resting cell, (Schmid y col., 1998; Borole, 2002; Marcelis 2003, Jia y col, 2006), y si bien no concluyen todos en que la velocidad de transferencia de DBT a la fase acuosa sea el paso limitante del proceso global de BDS, todos deducen que incrementar la transferencia incide positivamente sobre los rendimientos de conversión. Por otro lado, la velocidad de transporte de los compuestos a través de la membrana celular en medios acuosos no influye en la velocidad del proceso de BDS, (Alcón y col., 2005).

Estudio de la velocidad del proceso de BDS

Las variables que más afectan a la velocidad del proceso de BDS son la fracción de fase orgánica (FFO) empleada, la concentración inicial de DBT y la concentración de biocatalizador.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento en la FFO supone un descenso en el rendimiento del proceso de BDS, (Ohshiro e Izumi, 1999; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Luo y col., 2003).

Setti y col., 1994 concluyeron con sus estudios de fermentaciones de *Pseudomonas* sp. con 0.5-5% FFO, (C16), que la difusión y los efectos de co-metabolismo son los responsables de la velocidad del paso limitante en la degradación del DBT. La difusión depende de la afinidad entre el microorganismo y la fase orgánica en la que el DBT es disuelto y de la concentración del DBT.

De esta forma, Setti y col., 1995, reconocen que existen tres factores concomitantes que afectan la velocidad del proceso: adherencia del microorganismo al hidrocarburo, existencia de mecanismos de co-asimilación (del hidrocarburo y compuesto de azufre) y los procesos de transferencia de materia entre fases.

En relación con la concentración inicial de DBT, Maghsoudi y col., 2001, comparan la desulfurización de DBT en sistemas acuosos y bifásicos (buffer de fosfato – hexadecano), usando células de *Rhodococcus* sp. strain P32C1 en modo de *resting cell*. En el estudio se concluye que mayores concentraciones de DBT durante la etapa de crecimiento incrementan la actividad de las células y que en el sistema bifásico en *resting cell*, concentraciones superiores de DBT y de hidrocarburo aumentan las ratios de producción específica.

Considerando de forma conjunta la concentración de sustrato y la densidad celular en el ensayo, la velocidad específica de desulfuración de *Pseudomonas delafieldii* R-8 puede alcanzar valores de 11.4 mmol de azufre·Kg⁻¹ célula seca·h⁻¹ para DBT, cuando se incrementa tanto la concentración de sustrato como la de biocatalizador, (Luo y col., 2003).

Por último, algunos autores han descrito que la acumulación de HBP puede ser responsable de la desactivación de la ruta 4S debido a que este producto podría actuar como inhibidor. Por tanto se estudiará, tanto en medios acuosos como bifásicos, con *R. erythropolis* IGTS8 y con *P. putida* CECT5279, la

concentración de inhibidor a partir de la cual se observa un descenso en la velocidad específica de consumo de DBT o aparición de HBP. A pesar de que numerosos autores han reportado observar efectos de inhibición de tipo *feedback* en el desarrollo del proceso de BDS, no se ha encontrado en bibliografía ningún estudio semejante.

Con los resultados obtenidos y empleando constantes de bibliografía, (Jia y col., 2006), se planteará un modelo cinético para describir el proceso de BDS con células en resting cell, en los distintos ensayos llevados a cabo.

En lo relativo al **método de trabajo** empleado durante toda la experimentación, todos los ensayos se han llevado a cabo en erlenmeyer, agitados en incubadora orbital a 250rpm y 30°C. Los volúmenes de trabajo empleados han sido muy variados, utilizándose desde 3 a 100 mL de medio de reacción. En bibliografía numerosos autores han realizado sus investigaciones en incubadora orbital, con volúmenes desde los 5 mL en tubos de ensayo, (Izumi y col., 1994; Ohshiro y col., 1996), a erlenmeyer de hasta 500 mL con 100 de medio (Omori y col., 1995; Maghsoudi y col., 2000 y 2001; Konishi y col., 2005; Ma y col., 2006; Jia y col., 2006), o incluso 2L con 500mL de medio, (Ohshiro y col., 1996, 2005).

En este caso, y debido a la elevada densidad celular necesaria para llevar a cabo ensayos en resting cell que fueran reproducibles y comparables con nuestros resultados a escala de erlenmeyer, y con los resultados reportados por otros autores, no se han realizado ensayos en biorreactor.