

2. MATERIALES Y MÉTODOS

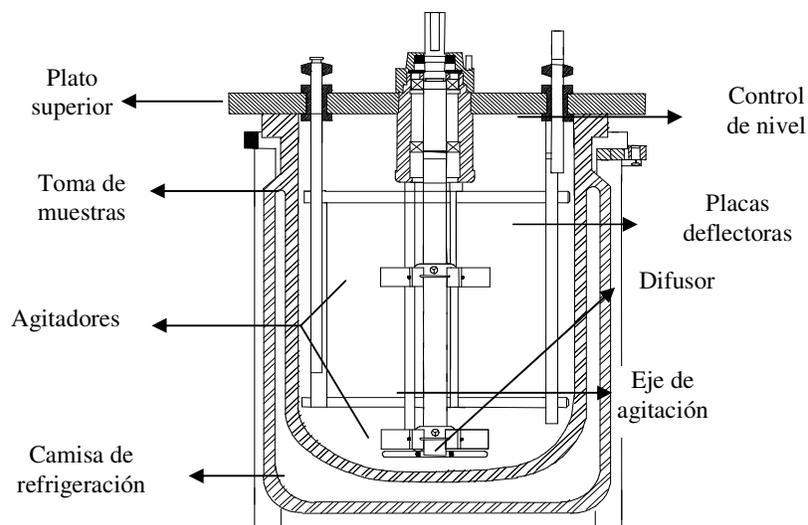
El trabajo descrito en esta memoria ha precisado de la utilización y puesta a punto de diversas técnicas de experimentación y métodos de análisis, que se describen a continuación, así como los equipos y materiales empleados.

2.1. EQUIPO EXPERIMENTAL

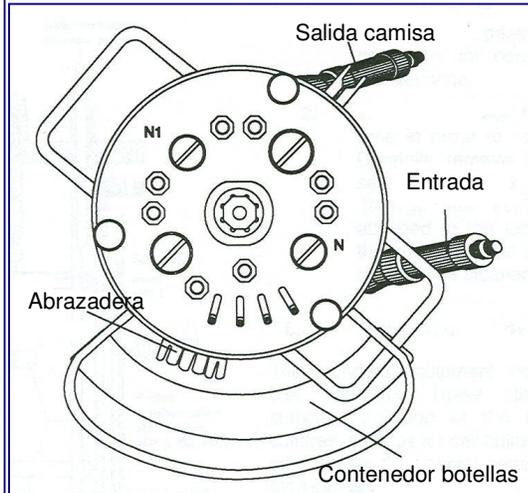
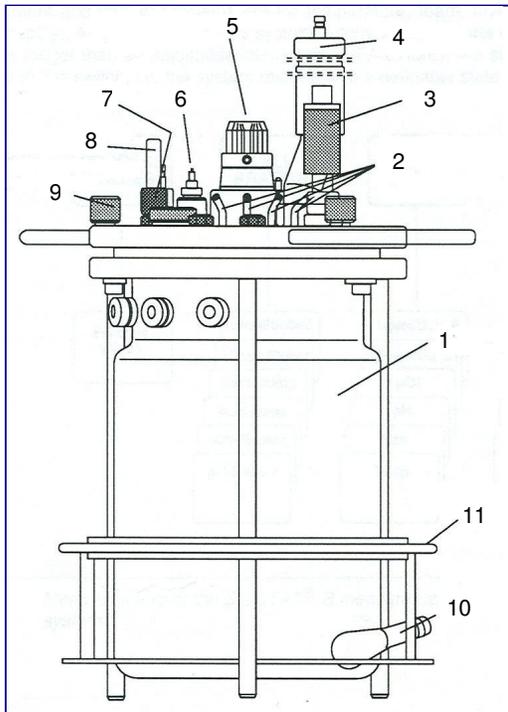
Para la preparación de los preinóculos y para la realización de ensayos de biodesulfuración, (BDS) se han empleado incubadoras orbitales, mientras que la producción del biocatalizador se ha realizado en un fermentador comercial.

2.1.1. Tanque agitado

Está fabricado en vidrio de borosilicato. Es un fermentador comercial Biostat®B Braun-Biotech, diseñado de manera que todas las aplicaciones necesarias para la operación del fermentador, bombas de dosificación, componentes de aporte de energía y módulos de medida y control están combinados formando una unidad básica. Consta de dos agitadores tipo turbinas de 6 palas rectas cada uno. El control automático de la temperatura, a 30°C, se mantiene gracias a la recirculación de agua por una doble camisa. En la siguiente figura se representa un esquema del equipo.



2. MATERIALES Y MÉTODOS



N: entrada electrodo de oxígeno
N1: entrada electrodo de pH

1: Vasija de vidrio; 2: Tubos de entrada de disoluciones; 3: Electrodo de oxígeno; 4: Condensador; 5: Acople para motor agitador; 6: Electrodo de pH; 7: Toma de muestra; 8: Sonda de nivel; 9: Tornillos de cierre; 10: Conector de entrada al sistema de termostato; 11: Contenedor de botellas



Figura 2.1.- Esquema del tanque agitado y vista superior de la tapa metálica.

Tabla 2.1.- Dimensiones del tanque agitado

Volumen total	3.0 L
Volumen útil	2.0 L
Altura total	285.0 mm
Diámetro interno	130.0 mm
Número de agitadores	2
Ancho de la pala	10.5 mm
Diámetro del agitador	53.0 mm

2.1.2. Columna de burbujeo con recirculación interna (air-lift)

Es un fermentador comercial Biostat[®]B Braun-Biotech. La unidad integrada de control es la misma que se utiliza con el tanque agitado. El reactor consta de una cuba de vidrio y un tubo concéntrico de acero inoxidable que separa la sección de ascenso de la zona de descenso. En la parte superior dispone de un ensanchamiento para favorecer la desgasificación del líquido.

El suministro del gas se lleva a cabo mediante un anillo perforado dispuesto en la parte inferior de la cuba. En la siguiente figura se muestra un esquema del reactor utilizado

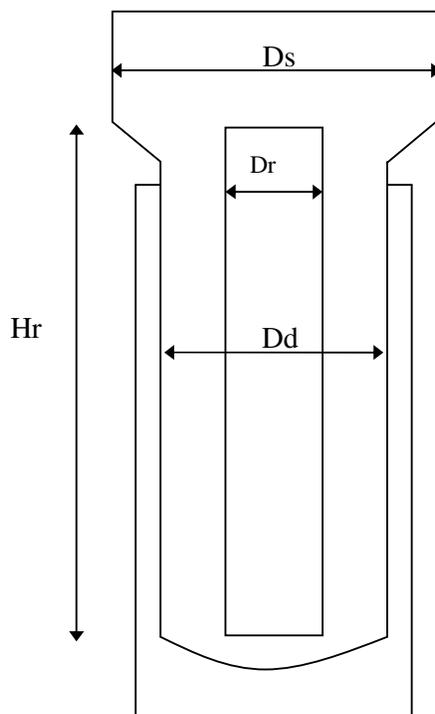


Figura 2. 2.- Esquema de la columna de burbujeo de recirculación interna.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2.2.- Dimensiones de la columna de burbujeo con recirculación interna

Altura de la zona de ascenso, Hr	226.0 mm
Diámetro de la zona de ascenso, Dr	55.0 mm
Espesor de la zona de ascenso	10.0 mm
Diámetro de salida, Ds	128.0 mm
Diámetro zona de descenso, Dd	84.0 mm

2.1.3. Unidad de Control Fermentador BIOSTAT®B

La unidad de control utilizada con los dos tipos de reactores incluye sistemas de medida y control de temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto.

Sistema de Medida y Control de la Temperatura: La unidad cuenta con un controlador digital PID. La medida se realiza con un sensor de Pt-100 y el control se lleva a cabo mediante una válvula de refrigeración y una resistencia de 600 W. La temperatura de operación se selecciona y ajusta mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0,1°C. El intervalo de medida es de 0 a 100°C.

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

La aireación del caldo se consigue suministrando aire por burbujeo, mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0.2µm, para que el aire se introduzca en el reactor estéril. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal. El caudal de aire se ajusta con una válvula y un rotámetro, y se puede regular automáticamente.

Sistema de Medida y Control de pH: En este caso también cuenta la unidad con un controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base en función de la señal de medida, previamente amplificada. Se utiliza un electrodo INGOLD, cuyo rango de medida varía entre 2 a 12 unidades de pH. La calibración es realizada mediante un sensor digital.

Sistema de Medida y Control de Oxígeno Disuelto: La unidad cuenta con un controlador digital PID del oxígeno disuelto en cascada, actuando directamente sobre la velocidad de agitación, es decir, sobre la velocidad de giro del agitador. La medida de la concentración de oxígeno disuelto se realiza con un electrodo esterilizable INGOLD, cuyo rango de medida varía entre 0 y 100%. La calibración se realiza con un sensor digital.

2.1.4. Electrodo de O₂ disuelto

Para la medida del oxígeno disuelto se utiliza un electrodo de O₂ disuelto polarográfico esterilizable (Ingold Mod. 82). Consiste en un cátodo de platino y un ánodo de Ag/AgCl conectados conductimétricamente por un electrolito, separados de la solución mediante una membrana permeable al gas.

2.1.5. Compresor de aire

El aire comprimido se consigue mediante un compresor Atlas Copco GA5, con una presión máxima de descarga de 10 bar y es almacenado en un pulmón pasando por una serie de accesorios cuya función es la de secar y eliminar tanto el aceite como el polvo de la corriente gaseosa que llega al fermentador.

2.1.6. Medidor de flujo másico

El caudal de aire introducido en el reactor a través del difusor de gas se ha determinado utilizando para ello un medidor de flujo másico, GFM37 AALBORG, con un intervalo de operación de 0 a 20 L/min en condiciones estándar, y un tiempo de respuesta de 2s, con una variación del $\pm 2\%$.

2.1.7. Electrodo de pH

Se utiliza un electrodo combinado de pH METTLER TOLEDO de Ag/AgCl, cuyo rango de medida varía entre 0 y 12 unidades de pH y permite una temperatura máxima de 130°C. El calibrado del electrodo se realiza con un sensor digital. El control de pH en el interior del fermentador se consigue mediante un

2. MATERIALES Y MÉTODOS

controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base.

2.2. EQUIPOS AUXILIARES

2.2.1. Balanza de precisión

Para la cuantificación del peso de los diferentes compuestos se ha empleado una balanza analítica digital METLER-TOLEDO, modelo AB104. Esta balanza tiene una precisión de $\pm 0,1$ mg.

2.2.2. Autoclave

La esterilización de todos los medios y materiales se ha realizado en un autoclave RAYPA, modelo AE110, con capacidad de 110L.

2.2.3. Incubadoras orbitales

Para la preparación de preinóculos y para la realización de ensayos a escala erlenmeyer se han utilizado dos incubadoras orbitales, modelos CERTOMAT[®] H y R de B. Braun-Biotech, S.A.

Las características en ambas incubadoras son:

- control de temperatura entre 5°C y 70°C, con fluctuación $\pm 0,1-0,5$ °C.
- control de velocidad de agitación entre 0 y 400rpm.
- capacidad de 25 erlenmeyer de 250mL.

2.2.4. Campana de flujo laminar

Se ha empleado una cámara de flujo vertical marca TELSTAR, modelo AV-30/70, para las operaciones de manipulación que requerían condiciones de esterilidad.

2.2.5. Centrífugas

La centrifugación de los caldos de cultivo se ha llevado a cabo en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS # 3334. El intervalo de temperaturas ha sido de -9°C a + 40°C. Esta centrífuga dispone de un rotor con capacidad máxima de carga de 6 x 140g. La velocidad máxima de agitación es de 19000rpm.

La centrifugación de las muestras se ha llevado a cabo en una centrífuga de tubos eppendorf no refrigerada marca EPPENDORF, modelo 5415 D. Esta centrífuga dispone de un rotor para 14 x 1,5mL. La velocidad máxima de agitación es de 16100rpm.

2.2.6. Ultrasonidos

Para realizar operaciones de limpieza se ha utilizado una unidad de ultrasonidos J. P. SELECTA, modelo 3000514, con capacidad de 9L, sin calefacción y con una potencia equivalente a 200W.

2.3. MATERIALES EMPLEADOS

2.3.1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados han sido *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, suministrado por el equipo del Dr. Félix García-Ochoa, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, y *Pseudomonas putida* CECT5279, suministrado por el equipo del Dr. Jose Luis García López, del Centro de Investigaciones Biológicas, (CIB-CSIC, Madrid).

El primero es un microorganismo natural, aerobio y de tipo gram-positivo, obtenido por screening de suelos contaminados por vertidos de hidrocarburos, (Yan y col., 2000; Castorena y col., 2000; Abbad-Andalousi, 2003; Watkins y col., 2003; H. del Olmo y col., 2005). En cambio, *Pseudomonas*, microorganismo aerobio y gram-negativo, (Luo y col., 2003; Guobin y col., 2006), está modificada genéticamente por el grupo de investigación del CIB-CSIC, dada su elevada

2. MATERIALES Y MÉTODOS

tolerancia a los solventes orgánicos, (Luo y col., 2003). La modificación consiste en la inclusión del vector de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 donde se encuentra la información para la producción de los enzimas responsables de desarrollar la ruta de desulfuración, (conjunto de genes dszA, dszB, dszC). El gen de la flavin-óxido-reductasa, hpaC, (ó dszD), responsable del aporte de FMNH₂ que requieren las mono-oxigenasas DszC y DszA, procede de la bacteria *Escherichia coli*, (Galan y col., 2000 y 2001). Además, esta bacteria cuenta con un gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico que protegerá los cultivos de posibles contaminaciones. Para que se active la síntesis de las proteínas es necesario que esté presente en el medio isopropil β-D-tiogalacto-piranoside (IPTG), que actúa como inductor.

2.3.2. Reactivos utilizados

En la siguiente tabla aparecen los reactivos empleados para la conservación, mantenimiento y crecimiento de ambos microorganismos.

Tabla 2.3.- Reactivos empleados en la conservación, mantenimiento y crecimiento de los microorganismos.

medio	reactivo	marca	concentración
LB ¹	Extracto de levadura	FLUKA	5g/L
	Cloruro Sódico	PANREAC	10g/L
	Triptona	PRONADISA	10g/L
	Agar	SIGMA	10g/L
	Tetraciclina	SIGMA	1g/L
BSM ²	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	PANREAC	4g/L
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O	PANREAC	3.05g/L
	NH ₄ Cl	PANREAC	2g/L
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	PANREAC	24.5mg/L
	glicerol	PANREAC	2g/L
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	PANREAC	1.0mg/L
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	PANREAC	1.0mg/L
	IPTG ³	SIGMA	43.2mg/L
	Tetraciclina	SIGMA	9.1mg/L
TRIS	Tris Hidroximetil Aminometano ⁴	PANREAC	12.1g/L
	Cloruro Sódico	PANREAC	5.8g/L
Fuente	Ácido L-Glutámico	PANREAC	20g/L
Carbono	D(+)-Glucosa	PANREAC	20g/L
Fuente	MgSO ₄ ·7H ₂ O	PANREAC	440mg/L
Azufre	Dimetilsulfóxido	SIGMA	11mg/L

¹ medio de Luria-Bertani; ² medio salino basal; ³ isopropil β-D-tiogalacto-piranoside, ⁴ pH = 7.5

En la siguiente tabla aparecen los reactivos empleados para la realización de los ensayos de biodesulfuración (BDS).

Tabla 2.4.- Reactivos empleados en los ensayos de BDS.

medio	reactivo	concentración
HEPES*	SIGMA	50mM
hexadecano (C16)	ALDRICH	varía
dibenzotiofeno (DBT)	ALDRICH	varía
Dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO)	synthesized	varía
Dibenzotiofeno sulfona (DBTO2)	ALDRICH	varía
2'-hidroxibifenil-2-sulfonato (HBPSi)	synthesized	varía
2'-hidroxibifenil-2-sulfonato (HBPSo)	synthesized	varía
2-isopropanol	PANREAC	≤ 1% v/v
2-hidroxibifenilo (HBP)	ALDRICH	varía
2,2-dihidroxibifenilo (DHBP),	synthesized	-
etanol	PANREAC	≤ 1% v/v

*[N-2-Hidroxietil]piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico), ajustado a pH = 8.

Como se cita en la tabla, el DBTO, HBPSi, HBPSo y DHBP han sido sintetizados y cedidos por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid.

En la siguiente tabla aparecen los reactivos empleados para el análisis de las muestras

Tabla 2.5.- Reactivos empleados para el análisis.

medio	reactivo
acetonitrilo	MERCK
acetato de etilo	PANREAC
HCl*	PANREAC
nitrógeno	PRAXAIR
aire	PRAXAIR
hidrógeno	PRAXAIR

*para acidificar las muestras

2.4. EQUIPOS DE ANÁLISIS

2.4.1. Espectrofotómetro de absorción UV/VISIBLE

Las medidas de absorbancia se han realizado en un espectrofotómetro UV/VIS SHIMADZU, modelo UV 1203. Las características del equipo son:

- medición entre las longitudes de onda de 200-1100nm
- anchura de banda espectral de 5 ± 0.5 nm.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

- lámpara de deuterio, (lámpara D2), con fuente de luz en el intervalo del ultravioleta
- lámpara halógena de tungsteno, (lámpara WI), con fuente de luz en el intervalo del visible y del infrarrojo próximo.

2.4.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

Se ha empleado un HPLC Varian, con detector diode-array, que consta de las siguientes unidades:

- Bomba Varian modelo 9012, con capacidad para trabajar tanto en régimen isocrático como en gradiente, tanto de caudal como de composición, dado que está dotada de un mezclador de tres canales. Trabaja en un rango de caudales de entre 0,01 y 10mL/min.
- Inyector automático Varian modelo 9100, con capacidad de 105 viales de 2mL. Ofrece la posibilidad de variar el volumen de inyección.
- Detector diode-array Varian modelo 9065, que consta de una lámpara ultravioleta de deuterio, que permite trabajar con longitudes de onda de entre 190-950nm.

2.4.3. Cromatógrafo de gases (GC-FID)

Para el análisis de las muestras de los ensayos de BDS se ha empleado un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID), marca Varian, modelo 3350. El equipo cuenta con las siguientes unidades:

- Inyector automático, modelo Varian 8200CX, con capacidad de 48 viales de 2mL, que trabaja con una jeringa SGE de 10 μ L. El inyector permite el lavado de la jeringa con dos disolventes distintos, la programación del porcentaje de penetración de la aguja en el vial, de las velocidades de inyección y del tiempo de

residencia de la aguja. Además se pueden definir el volumen de muestra y el método de inyección.

- Horno universal para termostatar la columna. El rango de temperaturas de trabajo varía entre 50 y 420°C.
- Detector de ionización a la llama (FID) situado dentro de un horno universal para termostatación de detectores. Permite la programación en la unidad de cambios de sensibilidad, atenuación y autocero. Sensor automático de apagado de llama y sistema neumático con válvulas de regulación del flujo de aire y H₂.
- Inyector capilar Split/Splitless Varian 1075, con regulador de presión (0-100psi), válvula de aguja para la selección de la relación de split, válvula adicional de gas para el gas make-up y válvula solenoide para operar en modo splitless.

Como gas portador y make up se ha empleado nitrógeno, con un flujo de 30mL/min y 15psi. Para el detector se usó H₂ con un flujo de 60mL/min y como auxiliar, aire, con flujo de 300ml/min.

2.5. **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

En el estudio de procesos microbianos es necesario optimizar protocolos de conservación y mantenimiento, así como desarrollar métodos experimentales estandarizados de forma que se logre la mayor reproducibilidad en los resultados obtenidos, si bien esta tarea es muy complicada cuando se trabaja con células vivas.

Los protocolos de conservación, mantenimiento y producción empleados, tanto en el caso de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 como en el de *Pseudomonas putida* CECT5279, han sido los desarrollados por el grupo de Investigación de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, con ligeras modificaciones en función de los objetivos de los ensayos posteriores y de las condiciones de nuestros laboratorios. En todo momento se han utilizado medios y materiales previamente esterilizados, y se ha trabajado siempre en dichas

2. MATERIALES Y MÉTODOS

condiciones, bien manipulando dentro de una campana de flujo laminar, o bien, cerca de un mechero Bunsen.

2.5.1. Protocolo de conservación y mantenimiento

Para la conservación de ambos microorganismos se han desarrollado dos metodologías distintas, en función del *tiempo de conservación*:

a) a largo plazo: se crece un pre-inóculo del microorganismo, diferenciando entre *R. erythropolis* IGTS8 y *P. putida* CECT5279.

Para activar *R. erythropolis* IGTS8 se inocula en 25mL de medio complejo de Luria-Bertani (LB), descrito en la tabla 2.3., durante toda una noche, la cantidad de microorganismo equivalente a media *placa petri LB-agar* sembrada por agotamiento. En el caso de *P. putida* CECT5279, la activación se lleva a cabo en el mismo medio, con 125 µL de 10g/L de solución de tetraciclina, y con la misma cantidad de inóculo, pero se agita en incubadora orbital durante tan sólo 3-4 horas.

En ambos casos se emplean erlenmeyer de 250mL, que se mantienen agitados a 250rpm y a 30°C de temperatura constante.

Trascurrido el tiempo de activación se añaden directamente sobre los erlenmeyer 15mL de una solución glicerol-suero salino esterilizada y en relación 1:1, de forma que la concentración final de glicerina es del 19%. El medio entonces se reparte en tubos eppendorf esterilizados, y se almacena a -70°C. De esta forma, el microorganismo se conserva durante unos meses, transcurridos los cuales se renueva el cultivo.

b) a corto plazo: se preparan placas con medio LB-agar, con la única diferencia de que, en el caso de *P. putida* CECT5279, esas placas llevan incorporada tetraciclina.

El método de siembra es por agotamiento, como se muestra en la figura 2.3.

En el caso de *P. putida* CECT5279, este método sólo sirve para comprobar que las células procedentes del stock a largo plazo están suficientemente activas, dado que tras 24h de incubación a 30°C comienza a oxidarse.

En cambio, *R. erythropolis* IGTS8 necesita entre 48-72h de crecimiento en placa a 30°C, y se mantiene bien en este medio si está refrigerado a 4°C, durante al menos dos semanas.



Figura 2.3.- Siembra por agotamiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

2.5.2. Preparación del inóculo

De nuevo, la preparación del pre-inóculo y del posterior inóculo para el crecimiento varía en función del microorganismo empleado.

En el caso de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, siempre desde cultivo en placa, se inoculan 2 o 3 colonias aisladas en 50mL de medio LB en erlenmeyer de 250mL. Este medio se agita a 250rpm, 30°C, durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se mide la densidad óptica del caldo a 600nm y se inoculan de nuevo erlenmeyer de 250mL con 50mL de medio LB estéril fresco y 0.1g/L de inóculo procedente del primer pase en medio LB. Este nuevo inóculo se deja crecer

2. MATERIALES Y MÉTODOS

durante 12h en las mismas condiciones que para la preparación del pre-inóculo, transcurridas las cuales se centrifuga el medio en tubos estériles, a 7000rpm, 20°C y durante 15 minutos. Obtenido el pellet, se tira el sobrenadante y se resuspende en suero salino (9g/L), para la posterior inoculación del medio BSM.

En cambio, para la preparación del pre-inóculo de *Pseudomonas putida* CECT5279 se parte del stock almacenado a -70°C, añadiendo 150µL en 50mL de LB con 250uL de tetraciclina (TC), en erlenmeyer de 250mL. Este medio se agita a 250rpm, a temperatura constante e igual a 30°C, durante 10 horas, transcurridas las cuales se mide la densidad óptica del caldo a 600nm para la inoculación de 0.1g/L de inóculo en otros erlenmeyer con medio LB con TC estéril fresco. Este caldo de cultivo se mantiene creciendo en las mismas condiciones durante 3 horas, y posteriormente se centrifuga el medio en tubos estériles a 7000rpm, 4°C, (dado que este microorganismo es muy sensible a la temperatura), y 5 minutos. Obtenido el pellet, se tira el sobrenadante y se resuspende en suero salino (9g/L), para la siguiente inoculación del medio BSM.

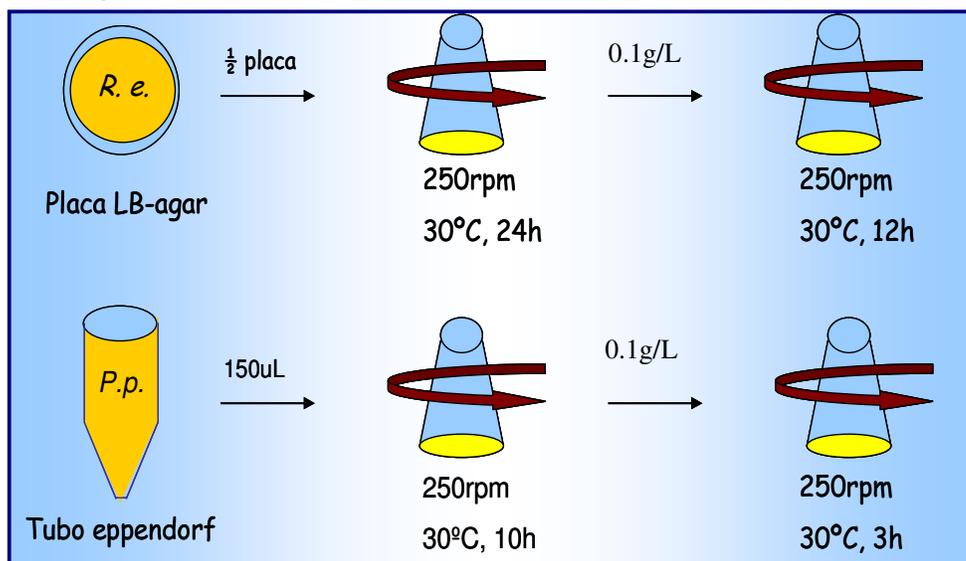


Figura 2.4.-Esquema del protocolo de preparación del inóculo.

2.5.3. Protocolo de crecimiento en fermentador, medio acuoso

El crecimiento se lleva a cabo en un fermentador comercial tipo tanque agitado, (Braun BIostat®B, Biotech), con las características descritas previamente, en el apartado 2.1.1.

Para ambos microorganismos, el medio de cultivo es BSM, (medio salino basal), si bien las fuentes de carbono y azufre varían dependiendo del microorganismo empleado.

Crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: En el caso de este microorganismo las fuentes de carbono utilizadas para su crecimiento son 20g/L de D(+)-glucosa o ácido L-Glutámico, y el medio es ajustado a pH neutro 7.5 con tampón TRIS y NaOH 0.1M. La fuente de azufre es dimetilsulfóxido (DMSO), en concentración 0.011g/L. Abbad-Andaloussi y col., 2003, indican que el DMSO supone una fuente de azufre más realista que el DBT para la producción de cantidades industriales de biocatalizador con capacidad desulfurante, dado su menor coste y mayor disponibilidad. Las condiciones de operación utilizadas han sido las siguientes: temperatura constante a 30°C, caudal de aire de 1L/L/min, pH controlado con NaOH 0.1M, velocidad de agitación constante e igual a 250rpm. Se ha comprobado que en estas condiciones, y para un inóculo inicial de 0.25g/L, a las 19 horas de crecimiento se alcanza el final de la etapa exponencial, momento en que se alcanza la máxima capacidad desulfurante de las células, (H. del Olmo y col, 2005A y B; Wang y col., 1996). Entonces se extraen los 2L de caldo y se centrifugan en tubos estériles de 70mL, a 7000rpm, 20°C, durante 15 minutos, con el fin de separar el caldo de las células. El pellet obtenido es resuspendido en tampón HEPES y glicerol, en relación 1:1, y llevados a conservación a -18°C.

Crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279: En este caso la fuente de carbono utilizada para su crecimiento es ácido L-glutámico 20g/L, y la fuente de azufre, 0.44g/L de sulfato de magnesio. En este caso también se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 0.1M. Las condiciones de operación utilizadas han sido las siguientes: 30°C, caudal de aire de 1L/L/min, pH controlado con NaOH 0.1M y velocidad de agitación inicial de 250rpm, aumentada hasta 350rpm cuando el porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo disminuye por debajo del 20%. Se ha comprobado que en estas condiciones, y para un inóculo inicial de 0.25g/L, a las 7 horas de crecimiento se alcanza el final de la etapa exponencial, momento en que éstas células alcanzan la máxima capacidad de producción de HBP, (Martín y col., 2004; Alcón y col., 2005, Guobin y col., 2006). En ese punto se detiene el crecimiento extrayendo los 2L de caldo que se centrifuga en tubos estériles de

2. MATERIALES Y MÉTODOS

70mL, a 7000rpm, 4°C, durante 5 minutos, con el fin de separar el caldo de las células. El pellet obtenido es resuspendido en tampón HEPES y glicerol, en relación 1:1, y llevados a conservación a -18°C.

En ambos casos, el seguimiento del crecimiento se realizó anotando a distintos tiempos los valores de porcentajes de saturación de oxígeno disuelto y pH, (en aquellos casos en que este no era controlado), y se tomaban muestras de 3mL del caldo para realizar medidas de densidad óptica.

2.5.4. Proceso de Biodesulfuración, (BDS)

Los ensayos de BDS se han realizado utilizando dibenzotiofeno, (DBT), como compuesto modelo, por ser uno de los compuestos recalcitrantes más abundantes en las corrientes de salida del tratamiento de hidrodesulfuración, (HDS), (Monticello, 1998). Las fases acuosas y orgánicas utilizadas en los ensayos han sido objeto de estudio.

Como se ha descrito anteriormente, la BDS puede llevarse a cabo tanto con células en crecimiento, como con células en parada de crecimiento o “resting-cell”, (Ohshiro y col., 1996; McFarland y col., 1998; Maghsoudi y col., 2000; Kirimura y col., 2001; Furuya y col., 2001 y 2003; Yoshikawa y col., 2002; Luo y col., 2003).

BDS en crecimiento: En los casos en que se han realizado experimentos de BDS en crecimiento, los ensayos se han realizado bien en erlenmeyer de 250mL, bien en fermentador comercial tipo tanque agitado de 2L, (Braun BIOSTAT®B, Biotech). Los ensayos con células en estado de crecimiento se han realizado de forma habitual con *Pseudomonas putida* CECT5279.

La única diferencia con respecto al medio de crecimiento descrito en el apartado anterior es que la única fuente de azufre empleada es DBT.

Los ensayos de BDS con células en crecimiento se realizaron en medios acuosos y bifásicos, empleando en estos casos hexadecano como solvente orgánico.

BDS en resting cell: Los ensayos en este modo de operación se han realizado en erlenmeyer de 50, 100 y 250mL, en incubadora orbital. Las condiciones de operación en erlenmeyer son 30°C de temperatura constante, y 250rpm.

De manera mayoritaria, el medio acuoso de reacción ha sido HEPES, a pH 8, y la fase orgánica, hexadecano. El DBT se ha introducido disuelto en 2-propanol, etanol o hexadecano.

En la siguiente figura se muestra, de forma esquemática, el procedimiento experimental seguido para el estudio del proceso de Bidesulfuración.

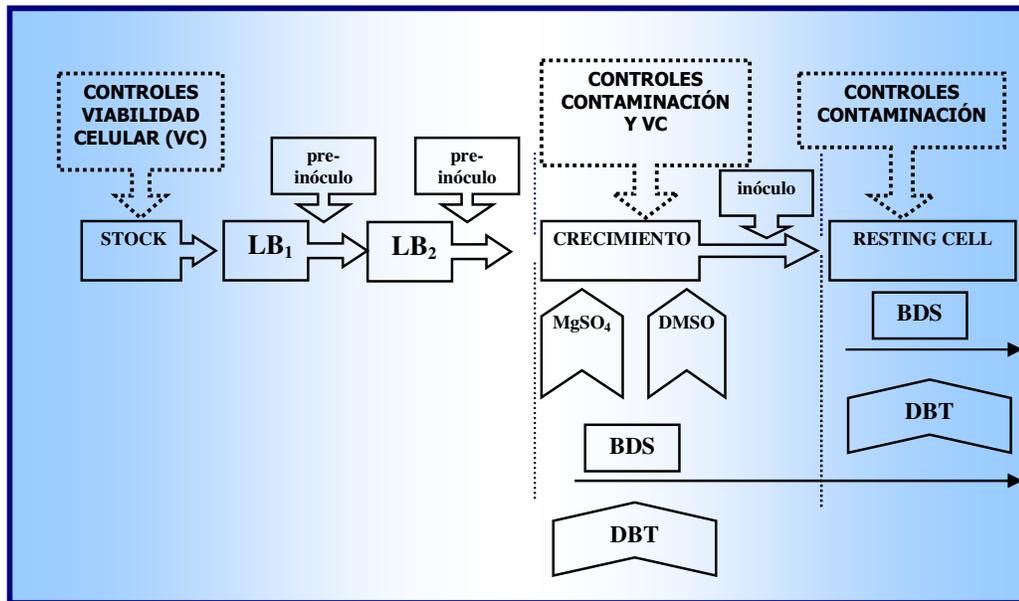


Figura 2.5.- Procedimiento experimental para el estudio de la BDS.

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.6.1. Método de determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, ($K_L a$)

Técnica de medida

Se utiliza una técnica de medida indirecta, en ausencia de microorganismos, es decir, de biotransformación. En este caso, no existe consumo de oxígeno por la presencia de microorganismos y el balance de oxígeno disuelto únicamente está influenciado por la velocidad de transferencia.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) \quad (2.1)$$

El uso de la anterior ecuación para caracterizar los procesos de transferencia de oxígeno en sistemas aireados conlleva la utilización de una serie de simplificaciones:

1. El medio líquido aireado se encuentra perfectamente mezclado en cualquier instante durante el tiempo que dura la medida.
2. El proceso de transferencia de oxígeno está controlado por la fase líquida, y la resistencia de la fase gaseosa al transporte puede ser despreciada.
3. El proceso global de transporte se puede describir mediante un único coeficiente de transferencia.
4. El término C^* , correspondiente a la concentración de saturación de oxígeno, tiene un valor constante.

Los aspectos 1 y 3 son generalmente aceptados y han sido demostrados bajo muchas condiciones en sistemas aireados y con una agitación mecánica adecuada (Moo-Young y Blanch, 1987; McWhirter y Hutter, 1989; Mills y col., 1992).

La transferencia de materia gas-líquido, de todos los gases solubles en agua, está controlada por la fase líquida, no siendo el oxígeno una excepción (Aiba y col., 1973; Yoshi y Sharma, 1976; Quintero, 1981; Yang y col., 1988; McWhirter y Hutter, 1989). La simultánea transferencia de nitrógeno de la fase gaseosa a la disolución o viceversa produce un descenso de la aireación del sistema, si bien su efecto sobre la transferencia de oxígeno puede ser despreciado (McWhirter y Hutter, 1989).

Los valores de $K_L a$ obtenidos son útiles para comparar reactores diferentes que operan en condiciones similares, y para establecer expresiones que permitan estimar el coeficiente de transporte para describir el sistema (Dussap y col., 1985; Vlaev y Valeva, 1990; Yasukawa y col., 1991A; Leckie y col., 1991B).

Los datos experimentales de oxígeno disuelto pueden obtenerse mediante diferentes métodos, clasificados en químicos, (oxidación del sulfito, adsorción de CO_2 , u oxidación de hidracina), o físicos. Los métodos físicos utilizan la respuesta de un electrodo selectivo de oxígeno a los cambios de la concentración de este gas en el medio, en condiciones no estacionarias. Este último método es el más utilizado, y se basa en la medida de la concentración de oxígeno disuelto durante su absorción-desorción en el medio, (Dussap y col., 1985; Costa y col., 1982A y 1982B; Arranz, 1993; Merchuk y col., 1994; Gómez, 1995; García-Ochoa y Gómez, 1998). Sin embargo, este método presenta ciertas restricciones, como la adecuada disposición en el reactor del electrodo de medida, el tiempo de respuesta y la linealidad, (Nocentini y col., 1993; Merchuk y col., 1994).

Si se integra la ecuación (1) considerando la condición inicial $C_L=0$ a tiempo t , se obtiene:

$$\ln\left(1 - \frac{C_L}{C_L^*}\right) = -K_L a \cdot t \quad (2.2)$$

La pendiente de la recta obtenida de la representación de $\ln(1 - C_L/C_L^*)$ frente a t es igual a $K_L a$.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En los ensayos realizados, inicialmente se elimina el oxígeno del medio mediante el burbujeo de nitrógeno, hasta que la concentración sea 0. Posteriormente se airea el medio con una corriente de aire de caudal conocido, midiéndose la variación en la concentración de oxígeno con el tiempo.

Previamente a la realización de los ensayos se debe preparar la emulsión y calibrar el electrodo de O₂ disuelto en las condiciones de trabajo.

Operaciones previas

Preparación de las emulsiones

Las emulsiones fueron preparadas de forma distinta para el tanque agitado y la columna de burbujeo con recirculación interna.

En el caso del tanque, se añaden al reactor los volúmenes de líquido correspondientes a las fracciones que se quieran ensayar. Posteriormente se agita a 1000 rpm durante 15 minutos.

Para la columna de burbujeo con recirculación interna y tras añadir los volúmenes de líquido como en el caso anterior, se agita el sistema mediante la introducción de un caudal elevado de aire de 10L/min, durante 30 minutos.

En la siguiente tabla se indica la composición de las emulsiones ensayadas:

Tabla 2.6.- Composición de emulsiones ensayadas

Fración de fase orgánica (v/v)	Volúmenes
0.10	200mL dodecano o hexadecano/ 1800mL agua
0.30	200mL dodecano o hexadecano/ 1400mL agua
0.70	1400mL dodecano o hexadecano 600mL agua
0.85	1700mL dodecano o hexadecano/ 300mL agua

Rutina de calibración del electrodo de pO₂.

El electrodo de pO₂ ha de conectarse al sistema durante seis horas para polarizarse.

El calibrado se realiza en las mismas condiciones de operación, (velocidad de agitación, temperatura, caudal de aire...), que se van a utilizar posteriormente en el ensayo

El 0% en concentración de O₂ se consigue por la eliminación del oxígeno disuelto mediante el burbujeo de nitrógeno. El 100% de saturación se logra con una corriente de aire a caudal elevado.

2.6.2. Análisis de la biomasa.

Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento del microorganismo se ha utilizado un método de análisis de la concentración de biomasa basado en la medida de la densidad óptica del caldo.

Las medidas de densidad óptica se realizaron en un espectrofotómetro de absorción UV/VIS, (SHIMADZU, modelo UV-1203) a una longitud de onda de 600nm. En algunas ocasiones se utilizó la técnica de la nefelometría para medir la concentración de biomasa. Sin embargo, el equipo utilizado requiere un volumen mínimo de muestra de 20ml, y por ello las medidas de biomasa se han realizado de forma habitual por espectrofotometría.

Para obtener la relación entre la densidad óptica del caldo y la concentración celular en peso seco se incubó un inóculo a 30°C y 250rpm. Cuando se alcanza una densidad óptica elevada parte del caldo se filtra con un filtro de 0.45µm de tamaño de poro, y se seca a 105°C durante 24 horas. Con el resto del caldo se realizan diluciones seriadas, y se mide la densidad óptica de las mismas. De esta forma se obtienen pares de datos *concentración de peso seco de biomasa – densidad óptica* que, mediante representación gráfica y posterior ajuste a una regresión lineal, resultan en las siguientes ecuaciones:

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2.7.- Curvas de calibrado de biomasa, para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, en distintos medios y con diferentes fuentes de azufre.

			código	
Abs. $\lambda=600\text{nm}$	LB		$Cx(\text{g/L})=-0,02+0,26\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.3.
	BSM	DMSO	$Cx(\text{g/L})=-6,50\cdot 10^{-3}+0,48\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.4.
		DBT/2-propanol	$Cx(\text{g/L})=-8,68\cdot 10^{-3}+0,61\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.5.
		DBT/etanol	$Cx(\text{g/L})=-6,09\cdot 10^{-3}+0,67\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.6.

Tabla 2.8.- Curvas de calibrado de biomasa, para *Pseudomonas putida* CECT5279, en distintos medios y con diferentes fuentes de azufre

			Código	
Abs. $\lambda=600\text{nm}$	LB		$Cx(\text{g/L})=0,02+0,65\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.7.
	BSM	MgSO ₄	$Cx(\text{g/L})=0,02+0,62\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.8.
		DBT/2-propanol	$Cx(\text{g/L})=6,50\cdot 10^{-3}+0,65\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.9.
		DBT/etanol	$Cx(\text{g/L})=-3,90\cdot 10^{-3}+0,66\text{Abs}_{600\text{nm}}$	2.10.

Estas curvas se renuevan periódicamente al renovar el stock de células.

Las figuras 2.6 y 2.7. muestran las curvas de calibrado obtenidas.

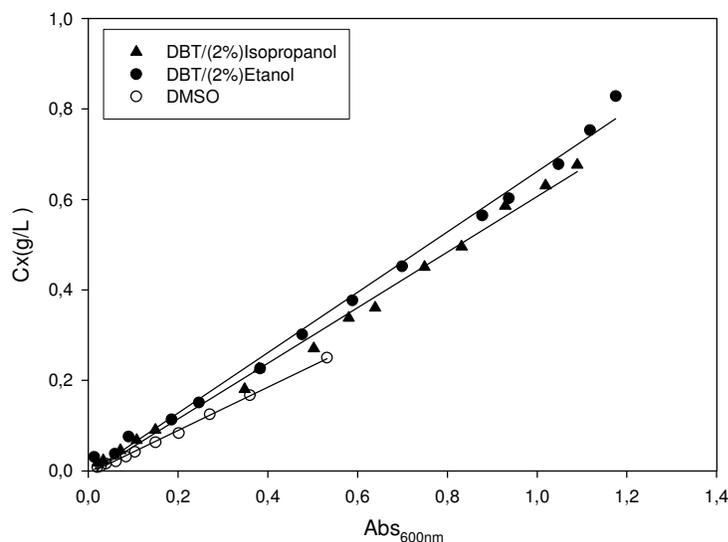


Figura 2.6.- Rectas de calibrado para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, en medio de crecimiento BSM, con diferentes fuentes de azufre.

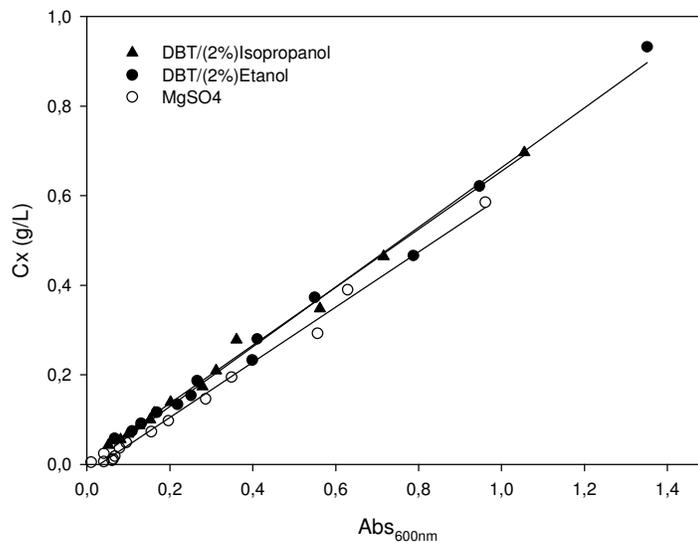


Figura 2.7.- Rectas de calibrado para Pseudomonas putida CECT5279, en medio de crecimiento BSM, con diferentes fuentes de azufre.

2.6.3. Determinación de los compuestos de la ruta 4S

La cuantificación de los distintos compuestos de la ruta 4S ha supuesto un esfuerzo muy importante, especialmente en el caso de la fase orgánica, dado que la determinación de muchos de los compuestos no había sido descrita previamente en bibliografía.

Los análisis de las muestras para determinar la evolución de los compuestos de la ruta de desulfuración se llevan a cabo por cromatografía.

Los compuestos cuantificables son el DBT, el dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO), el dibenzotiofeno sulfona (DBTO₂), 2-hidroxibifenil 2-sulfinato (HBPSi), el 2-hidroxibifenil 2-sulfonato (HBPSo) y como productos finales de la ruta de desulfuración, el 2,2-dihidroxibifenilo (DHBP) y el 2-hidroxibifenilo (HBP).

Los equipos utilizados son HPLC Varian con detector diode-array modelo 9065, y GC con detector de ionización de llama FID Varian, modelo 3350, ambos con inyector automático.

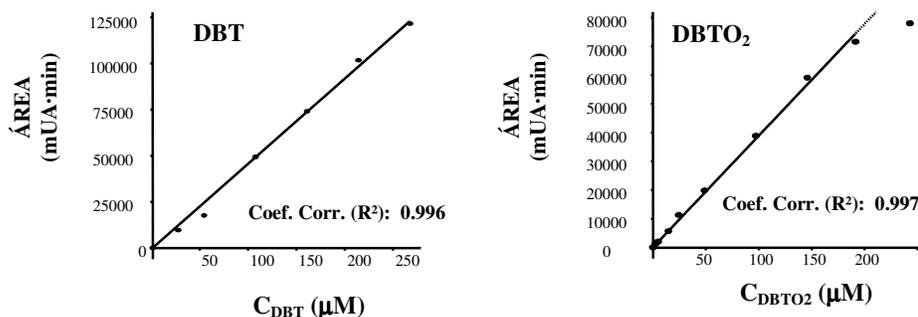
2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cuando se realizan ensayos en medios bifásicos, se ha comprobado que los compuestos que se solubilizan completamente en la fase acuosa son el DBTO, HBPSi, y la mayor parte del DHBP producido, mientras que en el solvente orgánico se encuentran el DBT y el HBPSo, y prácticamente todo el DBTO₂ y HBP acumulados.

Toma de Muestras: Se centrifuga previamente 1,5mL de muestra a 13200rpm, 5 min, para separar el pellet del medio de reacción. En los ensayos acuosos el tubo eppendorf contiene previamente acetonitrilo, para evitar que los compuestos hidrófobos se retiren con el pellet en la centrifugación. En los ensayos bifásicos, en el tubo eppendorf queda separado el pellet de la fase acuosa y de la orgánica, que queda claramente diferenciada en la zona superior del mismo. A continuación se toman alícuotas de la fase orgánica y de la acuosa, para analizarlas por separado del modo siguiente:

Análisis de la Fase Orgánica

El análisis de la fase orgánica se realiza por HPLC. Para el análisis se utiliza una columna Kromasil C18 de dimensiones 150 x 4.6mm, y 5µm de diámetro interno. Se han desarrollado dos métodos. Empleando como fase móvil 75% acetonitrilo – 25% agua a 1mL/min, el DBT y el producto final de la ruta, HBP, se detectan a 278nm. Por otra parte, para mejorar la cuantificación de productos intermedios se trabaja con 55% acetonitrilo – 45% agua a 1mL/min. El DBT, DBTO₂, HBPSo, DHBP y HBP se detectan a 278nm. El volumen de inyección es en ambos casos de 20µL.



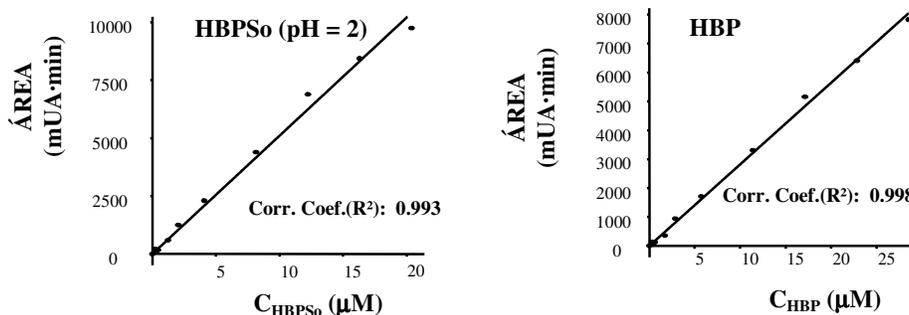


Figura 2.8.- Rectas de calibrado de algunos de los compuestos de la ruta 4S disueltos en fase orgánica, analizados a 278nm. (mUA = mili unidades de absorbancia)

Algunas curvas empleadas se muestran en las siguientes tablas, (2.9., 2.10., 2.11.). Periódicamente se realizaban nuevas curvas de calibrado, y especialmente cuando se renovaban las columnas, pero los factores de conversión han sido siempre muy similares.

Tabla 2.9.- Curvas de calibrado de varios de los compuestos de la ruta 4S, $\lambda=278\text{nm}$

Compuesto	Ecuación
DBT (μM)	$= 4.62 \cdot 10^2 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}^*$ (2.11.)
DBTO ₂ (μM)	$= 3.89 \cdot 10^2 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.12.)
HBPSo (μM)	$= 5.10 \cdot 10^2 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.13.)
HBP (μM)	$= 2.82 \cdot 10^2 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.14.)
DHBP (μM)	$= 4.49 \cdot 10^2 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.15.)

*mili unidades de absorbancia por minuto.

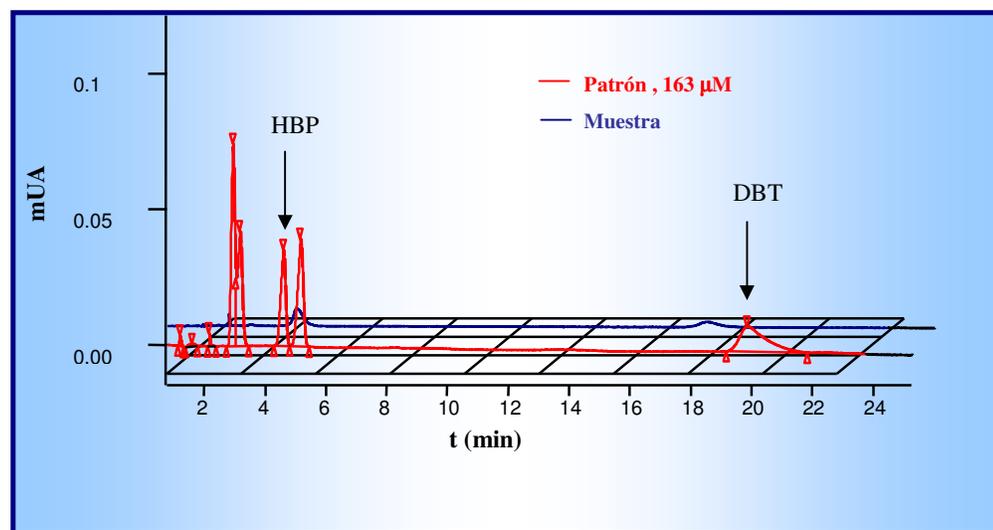


Figura 2.9.- Cromatogramas obtenidos por HPLC de la fase orgánica a 278nm.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de la Fase Acuosa

La cuantificación de los compuestos de la ruta 4S se llevaron a cabo mediante HPLC y GC-FID.

Medidas con HPLC: Se utiliza una columna C8 Luna de dimensiones 150 x 4.6mm, 3 o 5 μ m de diámetro interno, en elución isocrática con 50% acetonitrilo – 50% agua, a 1mL/min. El DBT, DBTO y DBTO₂ se detectan a 239nm, y el HBPSi, HBPSo, DHBP y HBP a 210nm.

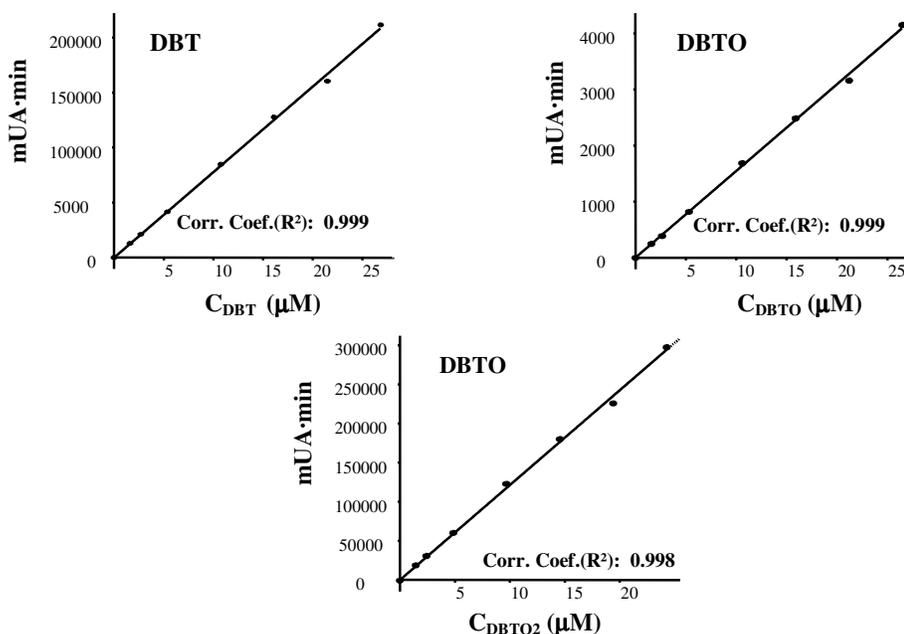


Figura 2.10.- Rectas de calibrado de compuestos de la ruta 4S disueltos en fase acuosa, analizados a 239nm.

Tabla 2.10.- Curvas de calibrado de varios de los compuestos de la ruta 4S

Compuesto	Ecuación
$\lambda=239\text{nm}$	
DBT	$= 7.76 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}^*$ (2.16.)
DBTO	$= 1.54 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.17.)
DBTO ₂	$= 1.21 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.18.)
$\lambda=210\text{nm}$	
HBPSi	$= 9.04 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.19.)
HBPSo	$= 8.95 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.20.)
HBP	$= 7.68 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.21.)
DHBP	$= 8.17 \cdot 10^3 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$ (2.22.)

*mili unidades de absorbancia por minuto.

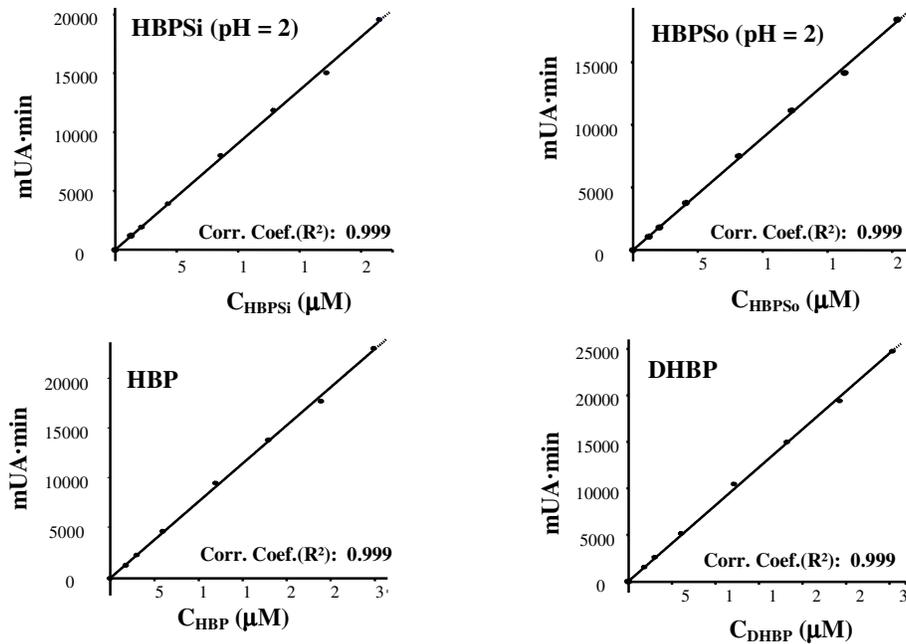


Figura 2.11.- Rectas de calibrado de compuestos de la ruta 4S disueltos en fase acuosa, analizados a 210nm.

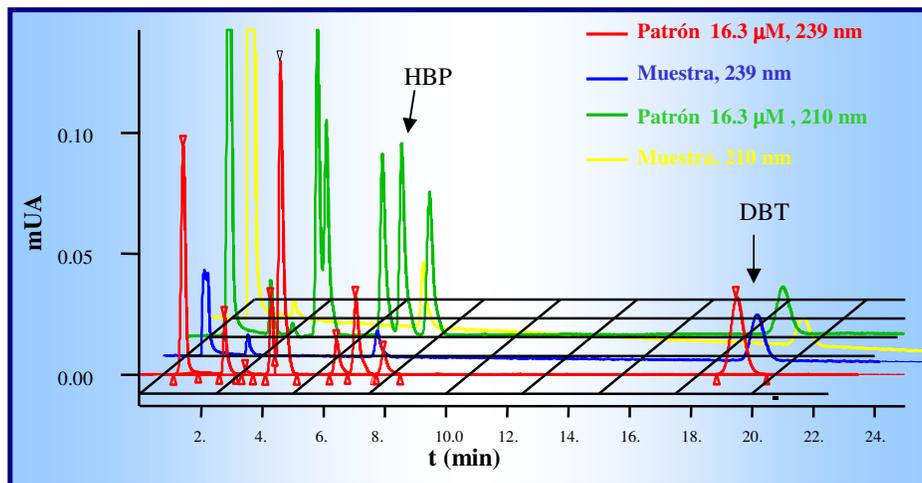


Figura 2.12.- Cromatogramas obtenidos por HPLC de la fase acuosa a 239 y 210nm.

Medidas con GC-FID: El método de análisis para cromatografía de gases se desarrolló con el objeto de solventar los problemas de cuantificación del HBPSi, dado que su tiempo de retención se solapa con el del HBP. El método se desarrolla llevando a cabo una extracción líquido-líquido en acetato de etilo (AcEt) 1:1 a 1 mL de muestra de la fase acuosa, y se centrifuga la película de AcEt como previamente se ha mencionado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En una columna capilar SUPELCO SPB-1, de dimensiones 30 m, 0.32 mm, 0.25 μm de diámetro interno. Se analizan el DBT, HBPSi y HBP. Como gas portador y make up se emplea N_2 , con flujo de 30 mL/min, para el detector H_2 , a 60 mL/min y como auxiliar, aire a 300 mL/min. El programa de calentamiento de la columna es de 140°C a 250°C, a 10°C/min y 2 minutos de purga. El inyector y el detector se mantienen a temperatura constante de 240°C y 280°C, respectivamente. El volumen de la película de AcEt inyectado es de 1 μL , con relación de split 20:1. Los resultados son similares a los obtenidos en el análisis por HPLC.

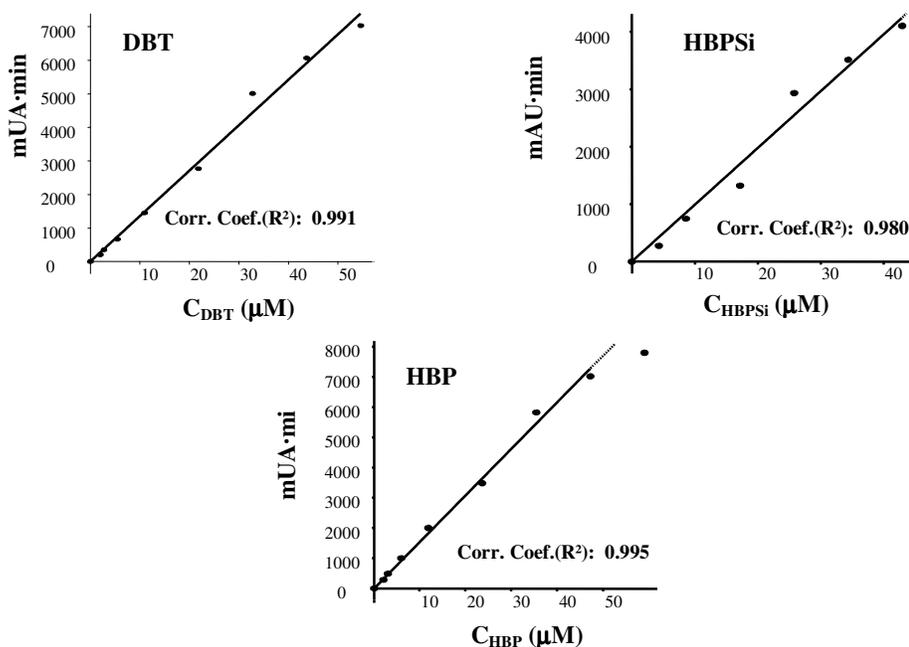


Figura 2.13.- Rectas de calibrado de compuestos de la ruta 4S disueltos en fase acuosa.

Tabla 2.11.- Curvas de calibrado de varios de los compuestos de la ruta 4S.

Compuesto	Ecuación
DBT	= 213.23·mUA·min* (2.23.)
HBPSi	= 190.62·mUA·min (2.24.)
HBP	= 194.87·mUA·min (2.25.)

*mili unidades de absorbancia por minuto.

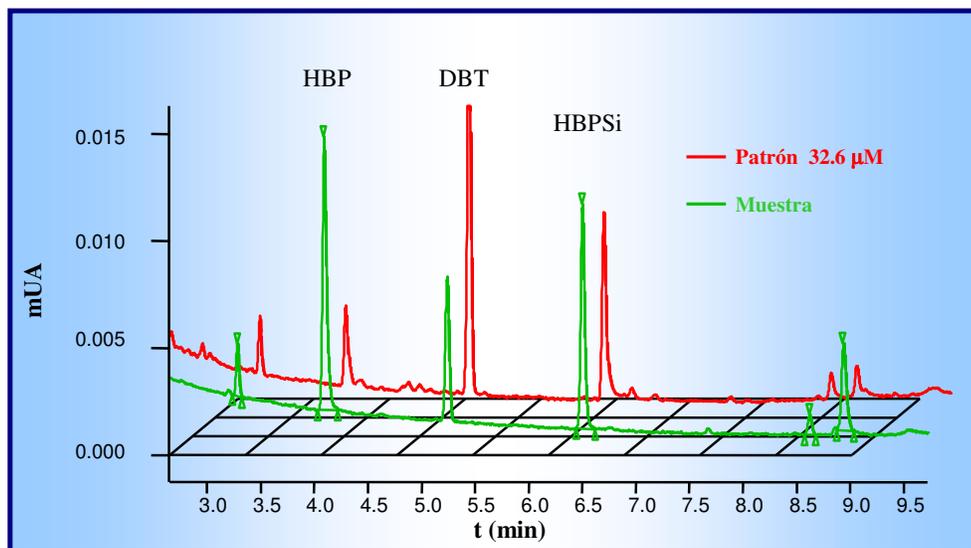


Figura 2.14.- Cromatogramas obtenidos por GCFID de la fase acuosa.

2.6.4. Análisis de la BDS

Tanto en el caso de operar con células en crecimiento, como con células en resting-cell, el seguimiento de la actividad desulfurante de las cepas y del rendimiento del proceso se realiza tomando muestras periódicas del caldo o medio de reacción. Un volumen de 1,5mL de dichas muestras se centrifuga en tubos eppendorf a 13200rpm durante 5 minutos, con el fin de separar los sólidos y las fases acuosa y orgánica, en los casos que corresponda. En aquellos ensayos en que el medio es únicamente acuoso, los eppendorf contienen previamente 750uL de acetonitrilo, como ha sido indicado previamente.

La fase acuosa y la orgánica son analizadas posteriormente por cromatografía, con el fin de seguir la evolución de los compuestos de la ruta 4S.

El rendimiento del proceso de BDS se determina con el porcentaje de desulfuración, (X_{BDS}), entendido como la relación de la concentración de producto final obtenido y la concentración inicial de sustrato añadido al medio de reacción:

$$X_{BDS} (\%) = \left(\frac{HBP_t}{DBT_0} \right) \cdot 100 \quad (2.26.)$$

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cuantificar la actividad de la BDS hay que medir la concentración de HBP y no basarse en la desaparición del DBT, incluso en sistemas en los que no hay acumulación de intermedios, (Yang y Marisol, 2005).

La actividad se determina con las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s), que en algunos ensayos son los compuestos intermedios de la ruta 4S, y producción de HBP (q_p) calculadas con las siguientes ecuaciones:

$$q_s = \frac{(C_{S,0} - C_{S,t})}{X \cdot t} \quad (2.27.)$$

$$q_p = \frac{C_{HBP}}{X \cdot t} \quad (2.28.)$$

donde S es el sustrato, μM ó ppm

X , la concentración de biomasa, kilogramo de célula seca por litro, $\text{KgCS} \cdot \text{L}^{-1}$

t , el tiempo de reacción, horas ó minutos.

2.6.5. Análisis cinético del crecimiento y de la BDS

Se han llevado a cabo dos tipos de análisis, uno para describir el crecimiento y otro para describir de manera conjunta la evolución de la biomasa y del proceso de BDS.

El estudio aislado del crecimiento microbiano se ha desarrollado mediante una ecuación logística, ajustando por regresión no lineal empleando el programa Statgraphics Plus.

El proceso de BDS, desarrollado tanto en condiciones de células en crecimiento como en resting cell, se ha descrito con ecuaciones basadas en el modelo cinético enzimático de Michaelis Menten. Los parámetros cinéticos intrínsecos encontrados en bibliografía se han adaptado a nuestros biocatalizadores y condiciones experimentales para, mediante la integración y la generación de curvas concentración-tiempo con el software Maple 9.0., simular correctamente los datos obtenidos en la experimentación.