

4. CRECIMIENTO Y BIODESULFURACIÓN (BDS) CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

En este capítulo se presenta el estudio de la obtención de células con elevada capacidad de desulfuración, y el proceso de BDS del dibenzotiofeno (DBT) con células en estado de crecimiento.

La etapa de crecimiento es muy importante dado que su optimización conduce a la obtención de grandes cantidades de biocatalizador desulfurante, en el menor tiempo posible. En este trabajo no se ha estudiado con profundidad el crecimiento de manera independiente a la BDS, dado que el objetivo es la desulfuración del DBT. Para obtener el biocatalizador, que posteriormente será empleado en el proceso de BDS con células en resting cell, se ha adoptado el protocolo optimizado en los estudios de Martin y col., 2004; Alcón y col., 2005 y H. del Olmo y col., 2005A y B.

Los parámetros estudiados en relación con el crecimiento han sido la fuente de azufre y la influencia de la presencia de un solvente orgánico en el medio, sobre la velocidad de crecimiento de las células desulfurantes y sobre la concentración final obtenida. Estos estudios están justificados dado que una importante etapa del trabajo de investigación se ha centrado en la desulfuración de DBT con células en parada de crecimiento, en medios bifásicos.

Por otro lado, el proceso de BDS puede ser llevado a cabo con células en crecimiento, de forma que el azufre eliminado de los compuestos orgánicos azufrados se convierte en la fuente de azufre empleada, (Monticello, 2000).

Cuando el proceso de BDS se desarrolla con células en crecimiento éstas emplean el DBT como única fuente de azufre, expresándose la ruta metabólica 4S, como ya se ha mencionado en la introducción del presente trabajo, que finaliza en un compuesto libre de azufre, 2-hidroxibifenilo (HBP), y sulfato.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Así *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 expresa las enzimas de la ruta metabólica de desulfuración 4S para utilizar el azufre e incrementar su densidad celular. Son numerosos los trabajos publicados en los que se emplea esta cepa para desarrollar el proceso de BDS con células en crecimiento, (Gallagher y col., 1993; Wang y col., 1994 y 1996; Setti y col., 1995, 1996, y 1999; Honda y col., 1998; Yan y col., 2000; Kishimoto y col., 2000; Grossman y col., 2001; Schilling y col., 2002; Konishi y col., 2005; Guchhait y col., 2005A y B).

Sin embargo, la BDS del DBT con células en crecimiento de *Pseudomonas* sp. modificadas genéticamente se ha estudiado mucho menos, (Setti y col., 1994 y 1997).

Cuando el DBT ha sido la única fuente de azufre en el medio de crecimiento, las variables evaluadas han sido: la concentración inicial de inóculo, la fuente de carbono utilizada, la concentración inicial de sustrato y la influencia de la presencia de fracción de fase orgánica (FFO) en el sistema. Además se han estudiado algunas de las limitaciones del proceso de BDS, como la influencia de la adición de una fuente de carbono adicional con la que se regenere el NADH, implicado en la ruta de desulfuración, y la adición de ciclodextrinas, que pueden mejorar la solubilidad del DBT en la fase acuosa, así como evitar los efectos de inhibición por acumulación de producto.

Por último, y empleando el modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten en base a constantes publicadas en estudios similares, se ha descrito la evolución del proceso de BDS en este tipo de sistemas.

Todos los ensayos han sido llevados a cabo en régimen discontinuo, a escala de erlenmeyer y/o fermentador comercial tipo tanque agitado, descrito en el apartado 2.1.1.

4.1. ESTUDIOS PREVIOS

4.1.1. Crecimiento en medio acuoso en fermentador.

El crecimiento en medio acuoso en fermentador tipo tanque agitado se ha llevado a cabo como se especifica en los apartados 2.5.2. y 2.5.3.

La figura 4.1. muestra el crecimiento de (A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, y (B) *Pseudomonas putida* CECT5279, en las condiciones descritas en el apartado 2.5.3., y utilizando las curvas densidad óptica-concentración en peso seco 2.4 y 2.8. En ambos crecimientos se parte de una concentración de biomasa inicial de 0.25g/L.

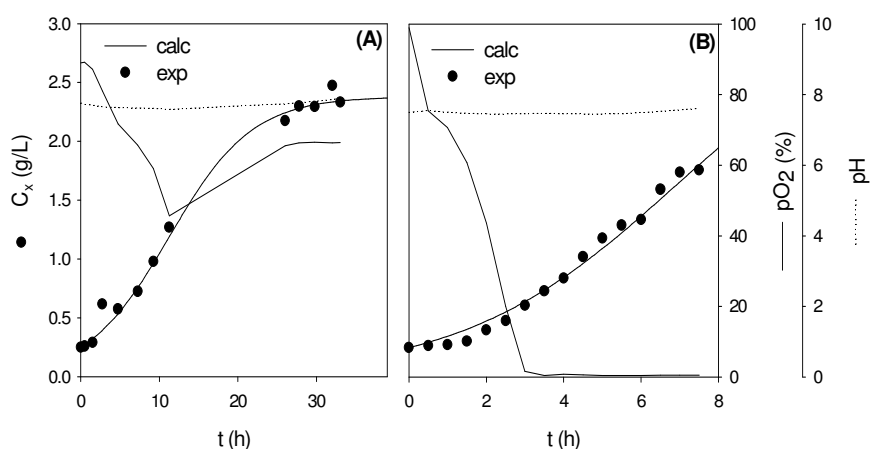


Fig 4.1.- Crecimiento de (A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y (B) *Pseudomonas putida* CECT5279 en BSM y con fuente no selectiva de azufre.

Para describir el crecimiento de los microorganismos se requiere un modelo que describa la evolución de la biomasa. En los estudios de Martín y col., 2004, para *Pseudomonas putida* CECT5279, y H. del Olmo y col, 2005A y B, para el caso de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se propone una ecuación logística para describir el crecimiento bacteriano, demostrando que la ecuación es capaz de predecir correctamente la evolución de la concentración de la biomasa con dos parámetros cinéticos, velocidad específica de crecimiento máxima, μ_{max} , y concentración máxima de biomasa alcanzada, C_{Xmax} , indicando además que ambos parámetros son estadísticamente consistentes.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

En nuestros estudios se adopta este modelo logístico. La ecuación que describe el crecimiento microbiano tiene la siguiente expresión:

$$C_X (g/L) = \frac{C_{X_0} \cdot e^{(\mu_{\max} \cdot t)}}{1 - \left(\left(\frac{C_{X_0}}{C_{X_{\max}}} \right) - (1 - e^{(\mu_{\max} \cdot t)}) \right)} \quad (4.1)$$

En la tabla 4.1. se muestran las constantes obtenidas del ajuste con el modelo logístico.

Tabla 4.1.- Constantes cinéticas obtenidas con la curva logística de crecimiento, para los crecimientos en BSM con fuentes de azufre no selectivas.

MICROORGANISMO	μ_{\max} (h ⁻¹)	$C_{X_{\max}}$ (g/L)
<i>R. erythropolis</i> IGTS8	0.20	2.38
<i>P. putida</i> CECT5279	0.36	2.27

En condiciones muy similares, H. del Olmo y col., 2005A y B, obtuvieron con células de *R. erythropolis* IGTS8 una μ_{\max} y $C_{X_{\max}}$ de 0.2 h⁻¹ y 1.84 g/L, respectivamente, y Schilling y col., 2002, determinaron experimentalmente una μ_{\max} de 0.1 h⁻¹, en un fermentador de 10L tipo tanque agitado, alimentado con D-glucosa y DMSO.

Con el mismo protocolo experimental, Martin y col., 2004, determinaron para la cepa de *P. putida* CECT5279 0.34h⁻¹ y 4.7 g/L de velocidad de crecimiento y concentración de biomasa máximas, respectivamente.

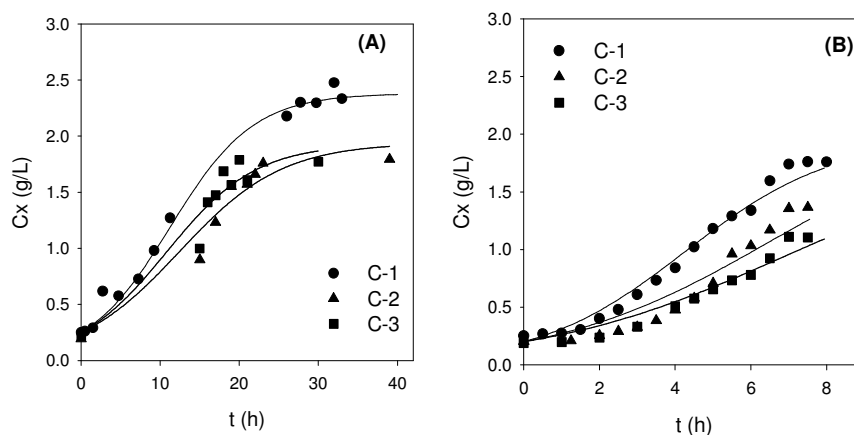


Figura 4.2.- Tres réplicas de curvas de crecimiento, C-1, C-2 y C-3 de (A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y (B) *Pseudomonas putida* CECT5279.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Como puede apreciarse en la figura 4.2, y a pesar de haberse establecido un protocolo de trabajo con el que obtener curvas de crecimiento de biomasa de manera reproducible, en numerosas ocasiones se han observado retardos e incluso concentraciones finales de biomasa inferiores a lo esperable.

Esto es debido al estado del stock del que se parte en cada crecimiento. Además, en la centrifugación previa a la inoculación en medio de crecimiento BSM, cuyo objeto es la total eliminación del medio LB, se pierde un número indeterminado de células por ruptura celular que no es posible controlar, de modo que la concentración inicial de inóculo realmente viable varía de unas fermentaciones a otras.

En la tabla 4.2. se muestra las constantes obtenidas con el modelo logístico de crecimiento, para los crecimientos C-1, C-2 y C-3, con los dos microorganismos. Todos ellos han partido de una concentración inicial de biomasa de 0.2g/L.

Tabla 4.2.- Constantes cinéticas de la curva logística de crecimiento, para 3 réplicas de crecimiento acuoso en medio no selectivo.

CRECIMIENTOS	μ_{\max} (h ⁻¹)	C _{Xmax} (g/L)
<i>R. erythropolis</i> IGTS8		
C-1	0.20	2.38
C-2	0.17	1.93
C-3	0.19	1.91
<i>P. putida</i> CECT5279		
C-1	0.51	1.97
C-2	0.35	2.13
C-3	0.33	1.64

Aun así, los resultados han sido satisfactorios. En aquellas fermentaciones en las que el crecimiento no ha mostrado un comportamiento tipo, como el mostrado en la figura 1.1., la biomasa obtenida no fue empleada posteriormente en los estudios en resting cell.

Como ya se ha mencionado, hay muy pocos trabajos publicados enfocados al estudio del mejor medio de crecimiento para microorganismos con capacidad desulfurante.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

En el caso de *R. erythropolis* IGTS8, H. del Olmo y col., 2005A, determinan que el medio de crecimiento que optimiza la velocidad del mismo, así como la capacidad desulfurante de las células obtenidas contiene glucosa, cloruro de amonio y dimetilsulfóxido, (DMSO), como fuentes de carbono, nitrógeno y azufre, respectivamente. En referencia a las condiciones de operación, 30°C, pH 6.5 controlado y concentración de oxígeno disuelto constante e igual al 20% del valor de saturación aseguran los objetivos perseguidos, en las condiciones aplicadas.

Además, Ohshiro y col., 1994, habían reportado previamente que *R. erythropolis* IGTS8 no es capaz de crecer utilizando sulfito, pero si sulfato como fuente única de azufre.

Los estudios de crecimiento sobre *Pseudomonas putida* CECT5279 indican que, si bien utilizando glucosa, citrato o ácido L-glutámico las velocidades de crecimiento obtenidas son similares, con el ácido glutámico la concentración final de la biomasa es superior, (Martín y col, 2004). Además, la adición de NH₄Cl afecta positivamente a la capacidad desulfurante de las células obtenidas.

4.1.2. Influencia de la fracción de fase orgánica sobre el crecimiento

Previo al estudio de la BDS con células en crecimiento, y dado que se ha llevado a cabo principalmente en condiciones bifásicas, se ha considerado adecuado abordar el estudio del crecimiento adicionando un solvente orgánico, sin modificar la fuente de azufre, con el objeto de evaluar de forma aislada el efecto de la fase orgánica sobre el crecimiento.

Los ensayos se han realizado con *P. putida* CECT5279, en erlenmeyer de 500ml con 100ml de volumen total de trabajo, constituido por BSM (2.3.2.), que se ha completado con 20g/L de ácido L-Glutámico y 0.44g/L de MgSO₄ como fuentes de carbono y azufre, respectivamente.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

El solvente orgánico empleado en todos los casos ha sido hexadecano (C16), por su elevada similitud con la fracción diesel, (Maghsoudi y col., 2001), siendo las fracciones de fase orgánica (FFO) ensayadas de 0, 10, 25 y 50%, dado que por encima de este valor las condiciones del medio cambian y la viscosidad hace muy complicada la fase de muestreo.

Como inóculo se ha empleado 0.1g/L de biomasa, y las condiciones de operación han sido, en todos los casos, 30°C y 250rpm.

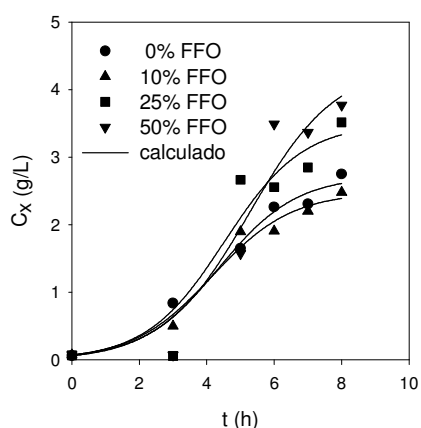


Figura 4.3.- Crecimientos en BSM de *Pseudomonas putida* CECT5278 en BSM con sulfato y distintas fracciones de fase orgánica.

La figura 4.3. muestra la evolución de la biomasa, (curva de calibrado 2.8.).

En la tabla 4.3. se muestran las constantes cinéticas obtenidas aplicando el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1), como ya se ha comentado en el apartado anterior.

Tabla 4.3.- Constantes cinéticas obtenidas en crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 en BSM con sulfato y distintas FFO.

FFO (%)	μ_{\max} (h ⁻¹)	C _{Xmax} (g/L)	PESO SECO (g/L)
0	0.87	2.72	2.38
10	0.85	2.48	2.40
25	0.86	3.50	2.37
50	0.78	4.37	2.47

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Como puede observarse, no existen diferencias significativas en relación a las velocidades de crecimiento hasta la fracción del 25%, si bien se puede hablar de una ligera disminución de la μ_{\max} con la fracción de 50% v/v.

En cuanto a las concentraciones finales de biomasa determinadas por espectrofotometría si se obtuvieron importantes diferencias, especialmente para las fracciones de 25 y 50% v/v. Ambos ensayos mostraron una fase de latencia de 3h, no observada a fracciones de fase orgánica inferiores, mostrando además, transcurridas las 5 horas de crecimiento, un cambio de coloración en el caldo de cultivo, lo que influyó en la determinación de la biomasa por densidad óptica.

Por ello se optó por realizar el peso seco a tiempo final, obteniéndose los valores presentados en la tabla, para todas las fracciones ensayadas, lo cual nos indica que la fase orgánica no afecta de forma significativa al crecimiento de la *Pseudomonas putida* CECT5279.

En la bibliografía no se han encontrado trabajos similares en crecimiento.

4.1.3. Estudio de la fuente de azufre en el crecimiento.

Para posteriormente realizar el proceso de BDS con células en crecimiento es pertinente conocer primero cómo le afecta el cambio de la fuente de azufre al crecimiento del biocatalizador.

El estudio se ha realizado con *P. putida* CECT5279. Las dos fuentes de azufre comparadas han sido sulfato de magnesio y DBT, disuelto en 2-Propanol ó en hexadecano, en erlenmeyer de 250mL que han contenido 50 mL de medio de crecimiento BSM (2.3.2.), agitado a 250 rpm y a temperatura de 30°C.

En todos los casos, la cantidad adicionada de azufre al medio de crecimiento de las células ha sido de 0.03g/L, y se parte de un inóculo inicial de 0.1g/L de concentración.

Cuando el DBT se ha disuelto en 2-Propanol, éste ha representando un porcentaje de alcohol en el ensayo el 4% v/v, dada la elevada concentración de DBT utilizada.

Cuando el DBT se ha disuelto en hexadecano (C16), el porcentaje en volumen de hexadecano, y por tanto, la fracción de fase orgánica, ha sido el 15% v/v. Esa cantidad de hexadecano se debe a la elevada concentración de DBT añadida, y se ha tenido en cuenta que hasta la fracción de fase orgánica del 50% v/v no se han observado efectos negativos sobre el crecimiento celular, como se ha concluido en el apartado 4.1.2.

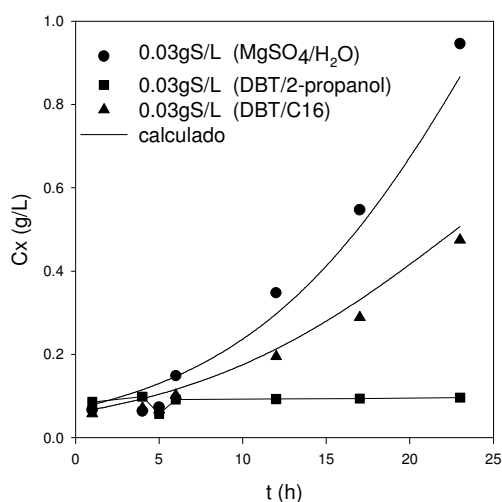


Figura 4.4.- Crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 con distintas fuentes de azufre, en condiciones acuosas y bifásicas.

Como puede apreciarse en la figura 4.4., la presencia de DBT en 2-Propanol disminuye drásticamente la velocidad de crecimiento de *P. putida* CECT5279. Las concentraciones de biomasa se determinaron utilizando las ecuaciones 2.8 y 2.9.

Observando la figura vemos que a 24h de crecimiento no ha habido prácticamente incremento de la concentración de biomasa cuando el DBT estaba disuelto en 2-Propanol, mientras que con MgSO₄ la velocidad específica máxima de crecimiento, calculada con el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1), ascendió a 0.1h⁻¹.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Aunque en la figura sólo se muestran los datos experimentales hasta las 24 de crecimiento, el seguimiento de la biomasa se continuó durante mucho más tiempo. Con el DBT, disuelto en 2-Propanol, el microorganismo sufrió una fase de latencia de siete días, debido a que el DBT sufre un proceso de nucleación en medios acuosos que implica que éste se encuentre en dicha fase en forma de micro-cristales sólidos, (Jia y col., 2006), dado que la solubilidad del DBT en agua es del rango nanomolar, (Monticello, 2000).

Los estudios de Wodzinski y Coyle, 1974, indican que el DBT sólo es asimilable por la célula en estado disuelto. Por tanto, cuando hay precipitación del DBT, la asimilación de la fuente de azufre es complicada, dado que se incrementan los problemas de transferencia de materia, sumándose la resistencia a la difusión del cristal de DBT a la fase acuosa, la resistencia a la transferencia de DBT disuelto de ésta fase a la membrana celular, y de ella al interior de la célula, (Farinelli y col., 1996).

Por otro lado, y aunque no se ha encontrado referencia alguna a efectos tóxicos por 2-propanol sobre el crecimiento, algunos autores han observado efectos de inhibición del crecimiento con porcentajes de etanol superiores al 1%, (Yan y col., 2000). Sin embargo, el porcentaje de alcohol en el ensayo no pudo ser disminuido sin introducir menos concentración de DBT, que implicaría una menor concentración de azufre disponible para las células.

La disminución en la velocidad de crecimiento cuando se ha empleado DBT como fuente única de azufre ha sido también reportada por Honda y col., 1998, quienes han observado que a 15h de crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, usando DBT como fuente de azufre alcanzan exactamente la mitad de la biomasa que obtienen usando $MgSO_4$. Ellos proponen que tal descenso en la concentración de biomasa es provocado por la acumulación de HBP, inhibidor del crecimiento de *Rhodococcus* sp. a partir de concentraciones de 34ppm, tal y como también reportan Ohshiro y col., 1996.

Estudios similares sobre el cambio en la fuente de azufre indican que a partir de una concentración de 1mM de DBT en el caldo puede inhibirse el

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

crecimiento, debido a la acumulación de sulfato, por lo que resulta conveniente operar en condiciones de limitación de azufre, y en tiempos cortos de crecimiento, (Yan y col., 2000).

A la vista del negativo efecto que ejerce el DBT sobre el crecimiento, principalmente debido a los problemas de disolución del mismo en los medios acuosos, algunos autores proponen utilizar una fuente de azufre soluble con la que se obtengan altas concentraciones celulares y actividades específicas de desulfuración, como el ácido 2-aminoetanosulfónico, (Yoshikawa y col., 2002), el sulfato de amonio, (Konishi y col., 2005A), el sulfato de magnesio, (Martin y col., 2004), o el dimetilsulfóxido (DMSO), (H. del Olmo y col., 2005A).

Por otro lado, y como se muestra también en la figura 4.3., la presencia de DBT disuelto en hexadecano disminuye la concentración de biomasa de *P. putida* CECT5279 obtenida a las 24 horas de crecimiento, aproximadamente a la mitad. Las concentraciones de biomasa se determinaron de nuevo utilizando las ecuaciones 2.8 y 2.9.

Lo primero que ha de indicarse es que con DBT disuelto en hexadecano no se observa turbidez debida a la precipitación del DBT en la fase acuosa, y que durante las 24 horas de ensayo prácticamente todo el DBT remanente se encuentra disuelto en el solvente orgánico.

Los valores de velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{\max} , y de concentración máxima de biomasa, $C_{X\max}$, obtenidos con el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1), en las 24 horas de ensayo se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Constantes cinéticas obtenidas en crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 en BSM, con distintas fuente de azufre.

Fuente de S	μ_{\max} (h ⁻¹)	$C_{X\max}$ (g/L)
MgSO ₄ (disuelto en agua)	0.13	2.18
DBT (disuelto en hexadecano)	0.12	1.02

Como se ha comentado en el apartado 4.1.2., hasta que se utilizan valores de FFO del 50% v/v no se observan efectos negativos sobre el crecimiento de la

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

biomasa. Por tanto, la disminución de la velocidad de crecimiento y, sobre todo, la menor concentración de biocatalizador obtenido, se deben al cambio de fuente de azufre.

Las mismas conclusiones fueron de nuevo obtenidas en otra tanda de ensayos, en el que se han comparado crecimientos en erlenmeyer de *Pseudomonas putida* CECT5279, con FFO de 0, 10, 25 y 50% v/v.

Todos los ensayos se realizaron en erlenmeyer de 500ml con 100ml de volumen de trabajo total, consistente en BSM, (2.3.2.), con 20g/L de ácido L-glutámico y hexadecano como solvente orgánico.

La concentración inicial de inóculo fue en todos los casos 0.1g/L, y las fuentes de azufre comparadas, 0.44g/L de MgSO₄ ó 0.05g/L de DBT disuelto en etanol, de forma que el porcentaje de alcohol en el caldo no supera el 0.7% v/v.

En este caso no se siguió la evolución temporal de la concentración de la biomasa, por lo que en la tabla 4.5. se exponen las unidades de densidad óptica obtenidas en cada caldo, a las 24h de crecimiento.

Tabla 4.5.- Densidades ópticas alcanzadas en crecimientos de Pseudomonas putida CECT5279 en BSM con distintas FFO.

Fuente de S	0% FFO	10% FFO	25% FFO	50% FFO
MgSO₄	3.9	4.0	4.6	4.1
DBT	2.8	2.3	1.9	2.0

Como se refleja en la tabla, a las 24h la densidad óptica de los crecimientos sobre sulfato es el doble que la obtenida con crecimientos sobre DBT, cuando todos ellos partieron de valores de densidad óptica de entre 0.22-0.29, equivalentes aproximadamente a 0.1g/L de inóculo inicial, (ecuaciones 2.8. y 2.10.).

Por tanto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que la utilización de DBT como fuente de azufre afecta negativamente al crecimiento, tanto en medios de cultivo acuosos como en bifásicos.

4.2. *BIODESULFURACIÓN (BDS) CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO.*

En el proceso de BDS con células en estado de crecimiento, el azufre extraído de los compuestos orgánicos azufrados es empleado por las células como fuente única de azufre, y puede desarrollarse tanto en medios acuosos como bifásicos.

En este estudio, 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), (Gallagher y col., 1993; Konishi y col., 2000; Onaka y col., 2001; Maghsoudi y col., 2001; Okada y col., 2002; Castorena y col., 2002; Noda y col., 2003; Li Li y col., 2003, Furuya y col., 2003, Goubin y col., 2006).

Numerosos autores han llevado a cabo la biodesulfuración (BDS) de productos recalcitrantes a la hidrodesulfuración (HDS) utilizando células en crecimiento, (Gallagher y col., 1993; Wang y Krawiec., 1994 y 1996; Setti y col., 1997; Honda y col., 1998), sin embargo, pocos son los autores que han realizado estudios en bifásico, (Setti y col., 1994, 1995 y 2003; Grossman y col., 2001; Guchhait y col., 2005A y B), especialmente con elevadas proporciones de fase orgánica, (Schilling y col., 2002).

Para estudiar este proceso de forma habitual se ha empleado la cepa de *Pseudomonas putida* CECT5279, por estar mucho menos estudiada que el *R. erythropolis* IGTS8.

En todos los ensayos el medio acuoso de crecimiento ha sido BSM (2.3.2.), y el solvente orgánico utilizado cuando el proceso se desarrolla en condiciones bifásicas ha sido hexadecano, (C16), puesto que es un componente mayoritario en el diesel, (Maghsoudi y col., 2001).

Las condiciones de operación han sido siempre 30°C y 250rpm, y se ha trabajado en régimen discontinuo. Además del seguimiento de la evolución

temporal de la biomasa, en estos estudios se ha cuantificado la degradación del DBT y la aparición de los compuestos de la ruta metabólica 4S.

4.2.1. Influencia de la concentración inicial de inóculo.

A pesar de que no se han encontrado autores que indiquen que la concentración inicial de inóculo es un parámetro fundamental en los estudios de BDS en crecimiento, se ha estimado pertinente estudiar su influencia en el proceso.

Para ello se han ensayado crecimientos en medios bifásicos, con C16 y BSM en relación 1:1. La concentración de la fuente de carbono, ácido L-Glutámico, ha sido 20g/L, y la fuente de azufre, DBT disuelto en C16, tuvo una concentración de 50mg/L.

Las concentraciones iniciales de inóculo, expresadas en unidades de densidad óptica (DO), variaron entre 0.1-0.4, tal y como se indica en la figura 4.5.

En todos los crecimientos, y sobre las 30 horas de reacción, se ha observado un cambio de coloración del medio de crecimiento de tonos amarillentos a morados. El mismo efecto ha sido descrito con anterioridad, en el apartado 4.1.2., para las fracciones de 25 y 50% v/v

Además, el pH aumentó de 7.5 a superar el valor de 9, debido al consumo del ácido L-Glutámico y dado que en estos ensayos no se ha controlado el pH.

Como se puede observar en la figura 4.5., las curvas de crecimiento son prácticamente paralelas, y todas ellas alcanzan la fase estacionaria al mismo tiempo. Las velocidades específicas máximas obtenidas han sido muy similares, incrementándose ligeramente la densidad óptica final conforme aumentaba el inóculo inicial, como puede observarse en la tabla 4.6., donde aparecen las constantes obtenidas con el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1.).

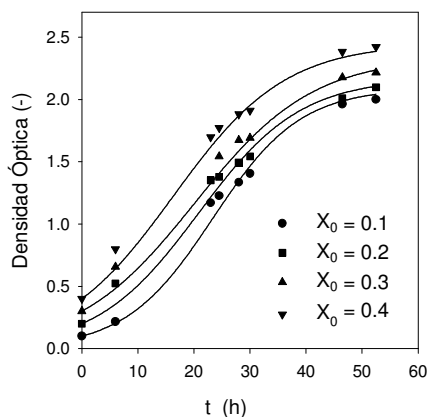


Figura 4.5.- Evolución de la biomasa con diferentes concentraciones de inóculo inicial de *Pseudomonas putida* CECT5279 con 50% v/v de FFO.

Tabla 4.6.- Constantes cinéticas obtenidas con el modelo logístico de crecimiento, para distintas densidades ópticas iniciales de *Pseudomonas putida* CECT5279 y 50% v/v de FFO.

DO_0 (-)	μ_{max} (h^{-1})	DO_{max} (-)
0.1	0.13	2.10
0.2	0.11	2.17
0.3	0.09	2.34
0.4	0.10	2.45

En lo relativo al consumo de DBT durante los crecimientos, no se superó en ningún caso el 2% de consumo de los 50mg/L añadidos, y sin embargo, se detuvo el crecimiento. En estudios similares, encontrados en bibliografía, no se han establecido las razones que expliquen este comportamiento, (Setti y col., 1999; Honda y col., 2001).

4.2.2. Estudio de la fuente de carbono y de la fuente de azufre.

Para estudiar la influencia de las fuentes de carbono y de azufre sobre la BDS con células en crecimiento se han realizado ensayos con *Pseudomonas putida* CECT5279 y con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

La experimentación se ha llevado a cabo en erlenmeyer de 250ml, agitados a 250rpm, manteniendo la temperatura a 30°C. El volumen final en todos los ensayos fue 55ml de medio BSM, (2.3.2.).

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Las fuentes no selectivas de azufre, $MgSO_4$ y DMSO, se disolvieron en agua. El DBT se disolvió bien en 2-propanol bien en etanol, ajustando la concentración de alcohol por ensayo a 2% v/v. Las concentraciones de sulfato y de DBT equivalen a 0.06gS/L, mientras que 0.01gDMSO/L son 0.008gS/L, (Setti y col., 1999). La concentración de inóculo añadida a todos los crecimientos se calculó para que la densidad óptica del caldo fuera de 0.1.

En la siguiente tabla se indican los distintos ensayos realizados.

Tabla 4.7.- Ensayos de crecimiento en diferentes medios de cultivo acuosos.

Fuente de Carbono	Fuente de Azufre	Alcohol
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279		
20gL-Glutámico/L	Ninguna	No
20gL-Glutámico/L	0.22g $MgSO_4$ /L	No
20gL-Glutámico/L	0.17gDBT/L	2% 2-propanol
20gL-Glutámico/L	0.17gDBT/L	2% etanol
20gD-Glucosa/L	0.17gDBT/L	2% 2-propanol
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8		
20gL-Glutámico/L	Ninguna	No
20gL-Glutámico/L	0.01gDMSO/L	No
20gL-Glutámico/L	0.17gDBT/L	2% 2-propanol
20gL-Glutámico/L	0.17gDBT/L	2% etanol
20gD-Glucosa/L	0.17gDBT/L	2% 2-propanol

***Pseudomonas putida* CECT5279**

En la figura 4.6. se muestra la evolución de los valores de densidad óptica, en los distintos caldos de cultivo de CECT5279.

En el ensayo “blanco”, en el que no se añadía ninguna fuente de azufre al caldo, existe cierta duplicación celular. Por tanto, se deduce que las células conservan cierta cantidad de azufre en su interior, que les permite seguir creciendo un poco, incluso en ausencia de azufre en el medio de cultivo.

En cuanto al uso de una fuente de azufre no selectiva, como el $MgSO_4$, implica una multiplicación de la biomasa mucho más elevada que en el caso de utilizar DBT, (Martín y col., 2004). Este resultado ha sido ya comentado en apartados anteriores.

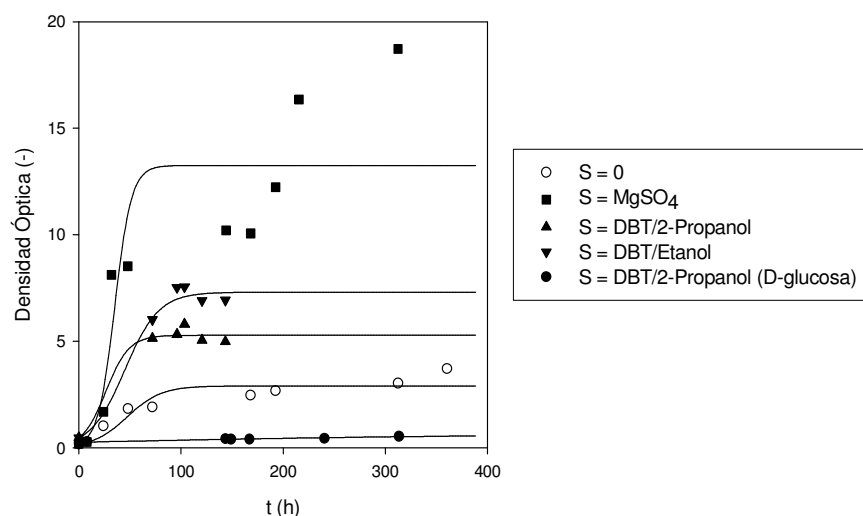


Figura 4.6.- Incremento de la densidad óptica de distintos caldos acuosos de crecimiento, para *Pseudomonas putida* CECT5279.

En relación con el uso de diferentes tipos de alcohol, se observa un incremento mayor de la densidad óptica en el caldo en el que el DBT había sido disuelto en etanol. Esto pudiera deberse a que el etanol es una excelente fuente de carbono, fácilmente asimilable, y un potencial regenerador del cofactor implicado en los primeros pasos enzimáticos de la ruta 4S, como prueban los estudios de Yan y col., 2000. Por tanto, parece que podría favorecer tanto el crecimiento de los microorganismos como la producción de las enzimas implicadas en la ruta 4S.

La tabla 4.8. muestra las constantes obtenidas con el modelo logístico de crecimiento aplicado a los ensayos descritos, (ecuación 4.1).

Tabla 4.8.- Constantes cinéticas obtenidas con el modelo logístico de crecimiento en caldos con *Pseudomonas putida* CECT5279 y con distintas fuentes de azufre y de carbono.

Fuente de S	Fuente de C	Dens. Ópt. ₀ (-)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Dens. Ópt. _{max} (-)
(-)	Glutámico	0.20	0.0560	2.92
MgSO ₄	Glutámico	0.20	0.1200	13.27
DBT/2-Propanol	Glutámico	0.46	0.1100	4.80
DBT/Etanol	Glutámico	0.46	0.0640	7.30
DBT/2-Propanol	Glucosa	0.46	0.0005	-

A pesar de que la experimentación se realizó para que en todos los casos se tuviera una densidad óptica inicial de 0.1, como puede observarse en la tabla las densidades reales de los caldos fueron más elevadas. Esto ocurrió especialmente

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

en los casos en que se añadió DBT disuelto en alcohol, en los cuales la precipitación del mismo implicó que la turbidez de los caldos aumentara.

Cuando se utiliza DBT como fuente de azufre y L-Glutámico como fuente de carbono, lo más destacable es que las densidades celulares obtenidas son significativamente inferiores. Cuando se ha utilizado glucosa como fuente de carbono, no se ha observado crecimiento.

En relación a los rendimientos de BDS en los crecimientos en los que ha sido añadido DBT como única fuente de azufre, se han obtenido porcentajes de biodesulfuración (X_{BDS}), calculados según se describe en el apartado 2.6.4., y correspondientes con las 2.5 semanas de proceso, de 17.30, 33.91 y 25.67% para los ensayos con DBT disuelto en 2-Propanol y en Etanol, con L-Glutámico como fuente de carbono, y por último, con DBT en 2-Propanol y Glucosa, respectivamente. Es de destacar que en el ensayo con glucosa, y a pesar de no observarse crecimiento, se alcanzaron significativos porcentajes de desulfuración.

En la figura 4.7. se muestra la evolución de los compuestos de la ruta 4S, en los ensayos alimentados con DBT.

Ha de indicarse que el valor de DBT inicial que se representa es el valor teórico, puesto que la cantidad añadida supera el valor de solubilidad en agua, y aún disuelto en alcohol no se evita una precipitación inicial del sustrato. El resto de valores de DBT también deben considerarse orientativos, y no como una cuantificación precisa de la concentración de DBT en el caldo, dado que se pueden tener problemas de adsorción de los micro-cristales sólidos de DBT en la membrana de las células, (Honda y col., 1998).

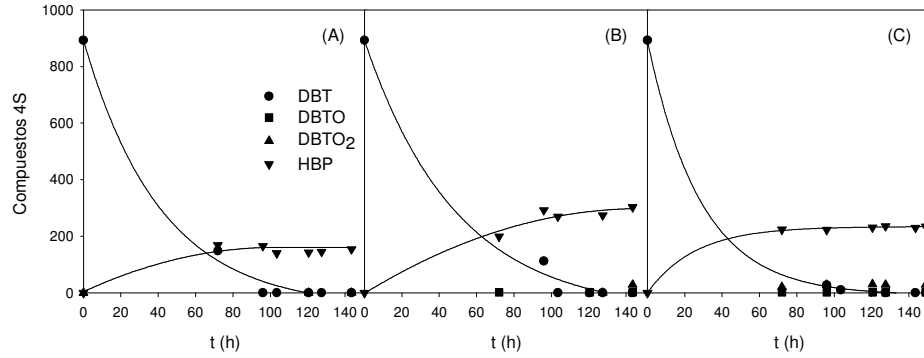


Figura 4.7.- Evolución de los compuestos de la ruta 4S, para *Pseudomonas putida* CECT5279, con A) DBT/2-Propanol, B) DBT/Etanol y C) DBT/2-Propanol y Glucosa. Compuestos en μM .

Rhodococcus erythropolis IGTS8

La figura 4.8. muestra el comportamiento seguido por *R. erythropolis* IGTS8 en las mismas condiciones de ensayo utilizadas y descritas en el apartado anterior.

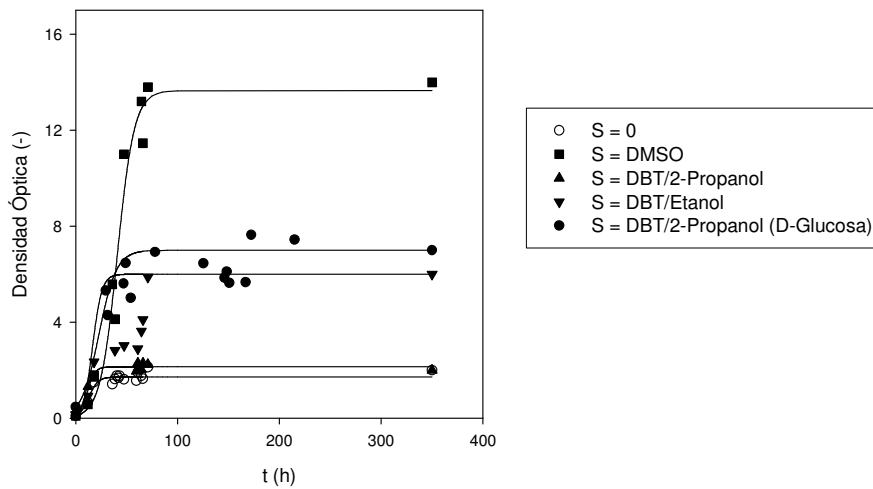


Figura 4.8.- Incremento de la densidad óptica de distintos caldos acuosos de crecimiento, para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Comparando los resultados con el caso anterior, con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se muestra de nuevo que la fuente de azufre que optimiza la velocidad de crecimiento sigue siendo la fuente no selectiva, que en este caso es el

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

dimetilsulfóxido, DMSO, (H. del Olmo y col., 2005A). Sin embargo, cuando no se ha utilizado ninguna fuente de azufre, hubo duplicación celular.

Además, la evolución de la biomasa en el caso “blanco” y en caso de usar DBT disuelto en 2-Propanol es muy similar, lo que sugiere que el DBT prácticamente no ha sido empleado en este ensayo.

A la vista de los datos mostrados en la figura y las constantes cinéticas obtenidas con el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1), y presentadas en la tabla 4.9., de nuevo parece que el uso de Etanol como disolvente del DBT provoca una mayor densidad óptica final, y por tanto, mayor concentración de biocatalizador, cuando se utiliza L-Glutámico como fuente de carbono.

Sin embargo, cuando se utiliza Glucosa y DBT disuelto en 2-Propanol, la densidad óptica final observada ha sido incluso mayor. Por tanto, debe indicarse que este microorganismo crece correctamente con esta fuente de carbono, al contrario que en el caso de *P. putida* CECT5279.

Tabla 4.9.- Constantes cinéticas obtenidas con el modelo logístico de crecimiento en caldos con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y con distintas fuentes de azufre y de carbono.

Fuente de S	Fuente de C	Dens. Ópt. ₀ (-)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Dens. Ópt. _{max} (-)
(-)	Glutámico	0.10	0.19	1.75
DMSO	Glutámico	0.10	0.12	13.66
DBT/2-Propanol	Glutámico	0.10	0.20	2.12
DBT/Etanol	Glutámico	0.15	0.07	5.79
DBT/2-Propanol	Glucosa	0.46	0.12	6.39

Los porcentajes de desulfuración (X_{BDS}) obtenidos en los crecimientos sobre DBT han sido 4.80, 19.23 y 2.70%, para DBT disuelto en 2-Propanol y en Etanol, con L-Glutámico como fuente de carbono, y por último, con DBT en 2-Propanol y Glucosa, respectivamente.

Respecto al uso de glucosa, y a pesar de que el crecimiento ha sido importante, el rendimiento en la BDS ha sido mucho menor que en el caso con *P. putida* CECT279.

Estos valores de X_{BDS} son inferiores a los observados en el apartado anterior, y aunque podría concluirse que *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 tiene una menor capacidad de desulfuración en las condiciones de ensayo mostradas, ha de tenerse en cuenta que ha incrementado menos su biomasa que *P. putida* CECT5279. Por tanto, no es la capacidad de desulfuración sino el menor número de células con capacidad desulfurante lo que ha provocado que los valores de conversión alcanzados hayan sido menores, siendo necesario estudiar las velocidades de producción específica de HBP para discernir qué microorganismo alcanza un rendimiento superior en el proceso.

En la figura 4.9. se muestra de nuevo la evolución de los compuestos de la ruta 4S.

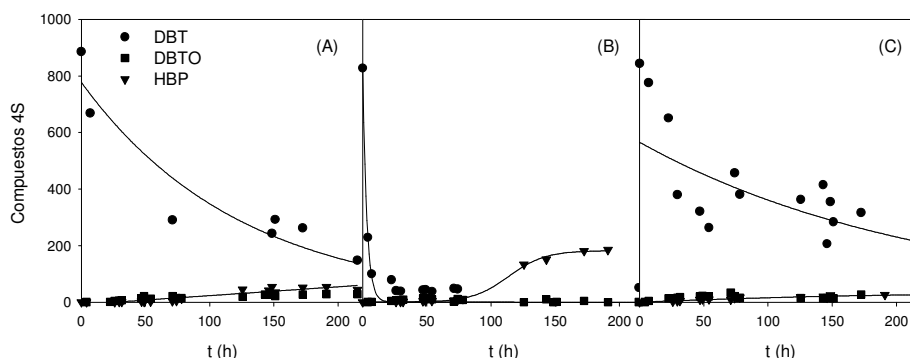


Figura 4.9.- Evolución de los compuestos de la ruta 4S, para *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, con A) DBT/2-Propanol, B) DBT/Etanol y C) DBT/2-Propanol y D-Glucosa. Compuestos en μM .

4.2.3. Influencia de la fracción de fase orgánica.

El estudio de la influencia de la fracción de fase orgánica (FFO) sobre la BDS con células en crecimiento se ha realizado con *Pseudomonas putida* CECT5279, dado que este microorganismo es más sensible a la presencia de solventes orgánicos en medios de crecimientos con DBT.

Todos los crecimientos se llevaron a cabo en erlenmeyer de 250ml con 50ml de volumen total de trabajo, con BSM, (2.3.2.), 20g/L de ácido L-Glutámico como fuente de carbono y un inóculo inicial de biomasa de 0.10g/L. Las

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

condiciones de operación fueron 30°C y 250rpm. Las FFO utilizadas han sido 0, 30 y 50% v/v.

En el ensayo acuoso, el DBT fue introducido disuelto en 2-Propanol, de forma que el porcentaje de alcohol en este ensayo fue el 1.8% v/v. En los ensayos bifásicos, el DBT se disolvió en hexadecano (C16).

La fuente de azufre única en el crecimiento fue 10mg de DBT. Sin embargo, y dada la elevada solubilidad del DBT en el hexadecano, la concentración del mismo ha variado conforme se incrementaba la FFO. Las concentraciones han sido 200, 667 y 400ppm para 0, 30 y 50% v/v de FFO, respectivamente.

En la siguiente figura se muestra la evolución de la biomasa variando la FFO en el medio de crecimiento. La concentración de biomasa se ha calculado con la ecuación 2.9.

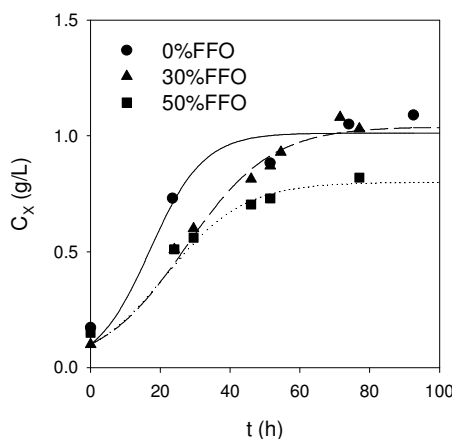


Fig. 4.10.- Evolución de la biomasa de *Pseudomonas putida* CECT5279 en crecimientos con distintas FFO.

Aplicando el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1.), se obtienen las siguientes constantes:

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Tabla 4.10.- Constantes cinéticas obtenidas en crecimientos con *Pseudomonas putida* CECT5279, distintas FFO y distintas concentraciones de DBT.

FFO (%)	μ_{\max} (h ⁻¹)	C _{Xmax} (g/L)
0	0.130	1.01
30	0.082	1.04
50	0.090	0.80

Como puede apreciarse en la figura y en la tabla, conforme se aumenta la fracción de fase orgánica hay un pequeño retardo en la velocidad de crecimiento, y un descenso de la concentración de biomasa final obtenida, en el caso de usar una FFO del 50% v/v.

Ha de citarse que, a pesar de no mostrarse en la gráfica, en el ensayo acuoso hubo una fase de latencia de 150 horas que no se ha considerado puesto que, como se ha descrito previamente, puede ser el tiempo que requiere el DBT, introducido en 2-propanol, para solubilizarse en la fase acuosa.

En la figura 4.11. se muestra la evolución de las cantidades eliminadas de DBT, (DBT_e), y producidas de HBP, (HBP_p), a lo largo de la reacción de BDS.

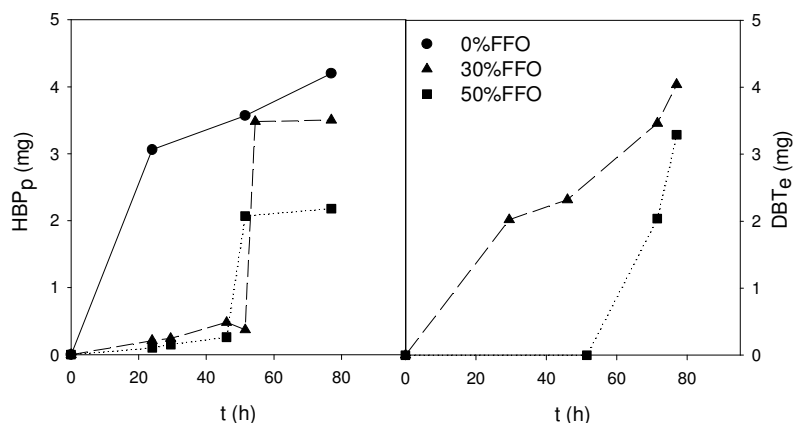


Figura 4.11.- Evolución de la BDS en crecimientos con *Pseudomonas putida* CECT5279 y distintas FFO y concentraciones iniciales de DBT.

En la figura anterior no se muestran los valores de eliminación de DBT con 0% de FFO dado que el DBT, debido a su baja solubilidad en fase acuosa, no se cuantifica con precisión debido a los problemas de muestreo descritos anteriormente.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Respecto a los datos en los ensayos bifásicos, se observa que se produce una menor eliminación de sustrato a mayores fracciones de fase orgánica, coincidiendo con menores producciones de HBP y menores valores de biomasa final alcanzada. Ha de indicarse que los datos se presentan en mg, y no en unidades de concentración, puesto que la concentración ha sido diferente en las distintas FFO ensayadas. Los porcentajes de desulfuración alcanzados han sido de 42, 35 y 22%, para las FFO de 0, 30 y 50% v/v, respectivamente.

La disminución de las concentraciones finales de biocatalizador y de los rendimientos obtenidos en el proceso de BDS no se debe por tanto a la presencia del solvente orgánico, como se ha justificado previamente en el apartado 4.1.2. y 4.1.3., sino a los problemas de transferencia de DBT a la fase acuosa conforme se incrementa la FFO, (Setti y col., 2003), y dado que no se mantiene constante la concentración inicial de DBT.

Como ya se ha indicado en numerosas ocasiones, el DBT es un compuesto muy hidrofóbico, por lo que la concentración del mismo en la fase acuosa de medios bifásicos es escasa. *P. putida* CECT5279 no tiene la capacidad de adherirse a los alcanos, (Monticello, 2000), y por tanto no puede capturar el DBT de la interfase entre las fases acuosa y orgánica.

4.2.4. Influencia de la concentración de DBT en medios bifásicos

El estudio de la concentración de DBT es elemental para identificar posibles efectos de inhibición, tanto del crecimiento como de la BDS.

En nuestro estudio, para analizar el efecto de la concentración de DBT sobre el crecimiento se han llevado a cabo experimentos con diferentes fracciones de fase orgánica (FFO), y siempre con *P. putida* CECT5279.

Con 27% v/v de FFO se ensayaron concentraciones de 200, 400 y 800ppm de DBT disuelto en hexadecano, y con 50% v/v, 400, 800, 1600 y 3200ppm.

Ensayos con 27% v/v de FFO

Estos ensayos se realizaron en erlenmeyer de 500ml, con 150 de volumen total de trabajo, con BSM (2.3.2.) y 20g/L de ácido L-Glutámico como fuente de carbono. La FFO en todos los crecimientos fue del 27% v/v.

En todos los ensayos la concentración de inóculo inicial parte de 0.1g/L. La temperatura y la velocidad de agitación se mantuvieron constantes e iguales a 30°C y 250rpm.

En la siguiente figura puede observarse el incremento de biomasa de los caldos de crecimiento, (ecuación 2.10).

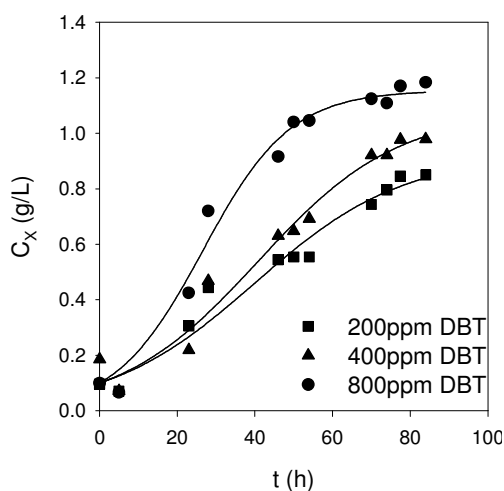


Figura 4.12.- Crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 en erlenmeyer, con 27% v/v FFO y distintas concentraciones de DBT como fuente de azufre.

El incremento en la cantidad biodisponible de fuente de azufre por la mayor difusión del DBT a la fase acuosa incrementa la densidad óptica y por tanto, la concentración de biomasa en el caldo, si bien no se incrementa significativamente la velocidad específica máxima de crecimiento ni la concentración final obtenida hasta que no se añaden 800ppm de DBT, como puede apreciarse en la tabla 4.11., donde se muestran las constantes cinéticas obtenidas aplicando el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1)

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Tabla 4.11.- Constantes cinéticas obtenidas en crecimientos con *Pseudomonas putida* CECT5279 con distintas concentraciones de DBT y 27% v/v de FFO.

C_{DBT} (ppm)	μ_{max} (h^{-1})	C_{Xmax} (g/L)
200	0.052	0.82
400	0.056	1.05
800	0.088	1.15

En ninguno de los casos se ha observado una fase de latencia apreciable.

En relación con las curvas de biomasa, en literatura no se han encontrado estudios similares donde se evaluara el crecimiento de las células en caldos de cultivo bifásicos, y con distintas concentraciones de DBT inicial. Por otro lado, en sistemas acuosos de crecimiento con *Rhodococcus* sp., Maghsoudi y col., 2001, determinaron que las curvas de crecimiento no se veían afectadas por la concentración de DBT, para un rango de concentraciones de entre 9.2 y 92ppm de DBT inicial.

La figura 4.13. muestra la evolución de la concentración de la fuente de azufre, DBT eliminado (DBT_e), y el producto final de la ruta 4S, HBP producido (HBP_p), con las distintas concentraciones de DBT ensayadas.

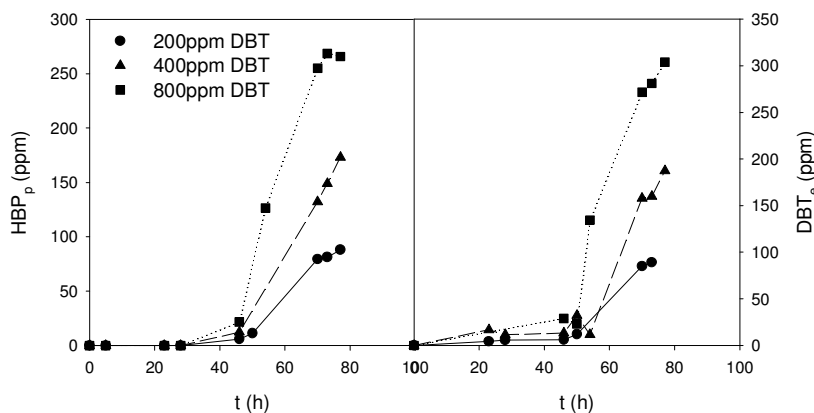


Figura 4.13.- Degradación de 200, 400 y 800ppm de DBT durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, con una FFO del 27% v/v.

Tan sólo pequeñas cantidades de compuestos intermedios de la ruta 4S, (dibenzotiofeno sulfóxido, DBTO, dibenzotiofeno sulfona, $DBTO_2$), aparecen en

la fase acuosa durante un tiempo, cerrándose prácticamente el balance con el DBT y el producto final (HBP) analizados en fase orgánica.

Como se ha descrito anteriormente, en ninguno de los casos el DBT llega a consumirse antes de que el microorganismo alcance la fase estacionaria. Según algunos autores, esto podría relacionarse con la acumulación de HBP, que por encima de 30-40ppm inhibe el crecimiento de las células, (Setti y col., 1999; Maxwell y Yu, 2000).

Sin embargo, y dado que en condiciones bifásicas prácticamente todo el HBP se encuentra en la fase orgánica, también podría ser el sulfato el que reprime la degradación de DBT, (Li y col., 1996), aunque hay bastante desconcierto en literatura ha este respecto, (Kaufman y col., 1997).

Por otro lado, no puede descartarse que el crecimiento se detenga debido a otras limitaciones en la fase acuosa, (Honda y col., 2001), e incluso Setti y col., 1999, determinaron que tanto el crecimiento como la formación de HBP dependen más de la concentración de la fuente de carbono utilizada, que de la concentración de DBT, en crecimientos acuosos de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8.

En relación a las velocidades de producción de HBP obtenidas, los valores alcanzados han sido de 0.007, 0.013 y 0.022 mM(HBP)·h⁻¹, para 200, 400 y 800ppm de DBT inicial.

Del mismo modo, Honda y col., 1998, obtuvieron actividades de 0.007 mM(HBP)·h⁻¹, con *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 y 110.55ppm de DBT, en un medio de cultivo muy similar pero en condiciones acuosas.

Por último, los porcentajes de desulfuración alcanzados se han mantenido prácticamente constantes en el rango de concentraciones de DBT ensayado, alcanzando 45.80, 50.80 y 41.52%, para 200, 400 y 800ppm de DBT inicial, respectivamente.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Honda y col., 1998, obtuvieron un rendimiento de 41.67%, en 15 horas de crecimiento, por tanto podemos decir que los resultados de nuestros estudios son similares a lo reportado por otros autores.

En ensayos acuosos ha sido observada una mayor producción de HBP conforme se utilizaban mayores concentraciones de DBT iniciales, debido a un incremento en la superficie de los micro-cristales de DBT, lo que permitía una elevada velocidad de transferencia de materia desde el sólido a la fase líquida, (Setti y col., 1994). En medios bifásicos la transferencia de DBT del solvente orgánico a la fase acuosa es la determinante en el proceso de BDS, especialmente con biocatalizadores que no tienen la capacidad de adherirse a la interfase, (Monticello, 2000; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Le Borgne y Quintero, 2003).

Ensayos con 50% v/v de FFO

Como se ha indicado previamente, las concentraciones de sustrato ensayadas en medios de crecimiento con 50% de hexadecano v/v fueron 400, 800, 1600 y 3200 ppm de DBT.

En este caso se utilizaron erlenmeyer de 250ml, siendo el volumen de trabajo 50ml. El medio de crecimiento y las condiciones de operación fueron las mismas que en la tanda de experimentos anterior.

Las curvas de crecimiento microbiano obtenidas se muestran en la siguiente figura, (ecuación 2.10.).

De nuevo, conforme aumenta la concentración inicial de DBT, se obtienen mayores concentraciones de DBT eliminado, y por tanto, de HBP producido.

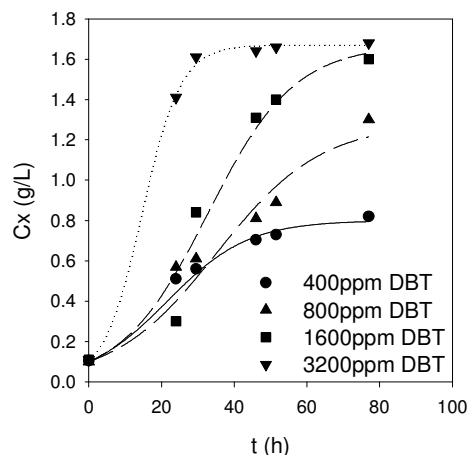


Figura 4.14.- Crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 en erlenmeyer, con 50% v/v FFO y distintas concentraciones de DBT como fuente de azufre.

Las constantes obtenidas aplicando el modelo logístico, (ecuación 4.1), y los porcentajes de desulfuración y velocidades específicas de producción de HBP alcanzados por el proceso de BDS se muestran en la tabla 4.12.

Ha de indicarse que, pese a que en la tabla 4.12. las μ_{\max} y $C_{X_{\max}}$ superan las observadas con 27% v/v de FFO, esto tan sólo se debe a interferencias en el análisis. Los pequeños volúmenes que se manejan no permiten eliminar correctamente todo el C16 de la muestra, a la hora de medir la concentración de biomasa en el caldo de crecimiento.

Tabla 4.12.- Constantes cinéticas y rendimientos de BDS obtenidos en crecimientos con *Pseudomonas putida* CECT5279 con distintas concentraciones de DBT y 50% v/v de FFO.

C_{DBT} (ppm)	μ_{\max} (h ⁻¹)	$C_{X_{\max}}$ (g/L)	X_{BDS} (%)	q_P (mmolHBP/KgCS·h)*
400	0.09	0.78	4.85	0.0015
800	0.07	1.28	6.25	0.0042
1600	0.08	1.67	5.16	0.0063
3200	0.18	1.67	7.13	0.025

*CS: célula seca

La figura 4.15. muestra la evolución de la desulfuración del DBT, en los experimentos realizados.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

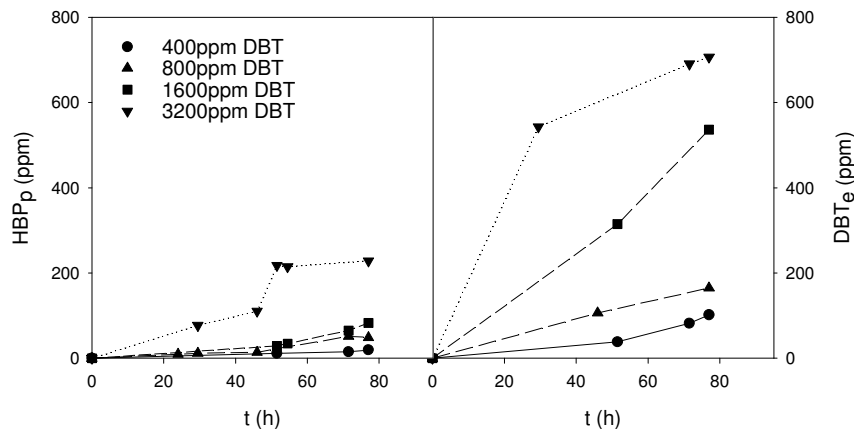


Figura 4.15.- Degradación de 400, 800, 1600 y 3200ppm de DBT durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, con una FFO del 50% v/v.

Como puede observarse en la figura, los valores de HBP producidos no coinciden con la concentración eliminada en cada caso. Estos resultados no pueden ser relacionados con procesos de inhibición, dado que se habría detenido la eliminación de DBT. Por otro lado, y puesto que no se ha observado la acumulación de ningún compuesto intermedio de la ruta de desulfuración, deben relacionarse con errores de análisis en la medida del HBP.

Considerando que la producción de HBP es estequiométrica con respecto a la eliminación de DBT, los porcentajes de desulfuración teniendo en cuenta los valores de DBT eliminado serían 25.4, 20.6, 33.5 y 22.1%.

De nuevo, tal como ocurría en los ensayos con 27% v/v de FFO, los porcentajes de desulfuración se han mantenido constantes en el rango de concentraciones de DBT ensayado.

En comparación con el estudio anterior, los rendimientos alcanzados en la BDS con 50% v/v de FFO son claramente inferiores. Dado que el efecto de la FFO sobre el crecimiento no es significativo, queda de nuevo patente la limitación de transferencia de DBT a la fase acuosa, y consecuentemente, su efecto negativo sobre el desarrollo de la ruta 4S.

4.2.5. Influencia de la adición de una fuente de carbono adicional.

Para incrementar la conversión final obtenida, disminuyendo el tiempo necesario de reacción, se han realizado diversos estudios enfocados a eliminar posibles deficiencias en el medio de cultivo o medio de reacción.

A parte del glicerol contenido en el medio BSM, (descrito en el apartado 2.3.2.), y en el inóculo, se ha considerado pertinente evaluar el efecto de la adición de una segunda fuente de carbono sobre los rendimientos alcanzados en la BDS, en 24h de reacción.

La introducción de una fuente energética adicional tiene como objetivo la regeneración del NADH, dado que 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).

Varios autores han demostrado la importancia del NADH en el proceso de BDS, e incluso indican que el problema de la regeneración del mismo es clave en el sistema, (Oshiro y col., 1994.; Setti y col., 1997).

Para la posible regeneración del NADH se ha añadido succinato de sodio, y etanol. En 2005, J. Michizoe y col., describen la regeneración enzimática del NADH por consumo de glicerol o etanol, y Bekhit y Faustman, 2005, han reportado que el NADH se regenera a partir del succinato, por transferencia de electrones.

La experimentación se ha realizado en régimen discontinuo con erlenmeyer de 250mL y 80mL de volumen de trabajo total. Todos los ensayos se han realizado en condiciones bifásicas, con 50% de hexadecano v/v y 50ppm de DBT disuelto en hexadecano. La fase acuosa ha sido BSM, (2.3.2.).

Las condiciones de operación han sido 30°C, 200rpm y el pH inicial ha comenzado siempre con un valor de 7.0. La concentración de inóculo ha sido de

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

1g/L de *R. erythropolis* IGTS8, obtenido tal y como se describe en los apartados 2.5.2. y 2.5.3.

El procedimiento experimental se resume entonces en un primer crecimiento de las células desulfurantes en un medio no selectivo, como se ha descrito en apartados anteriores, para luego inocular un nuevo medio de crecimiento con DBT y con una elevada densidad celular inicial.

En todos los ensayos hay una concentración de glicerol de 15.75g/L, procedente del glicerol contenido en el inóculo para su conservación sin congelación celular, y 2g/L más contenidos en el medio BSM.

En la siguiente tabla se indican la concentración de las fuentes energéticas adicionales, los porcentajes de desulfuración y velocidades específicas de producción de HBP obtenidas, y el pH observado a las 24 horas de reacción.

Tabla 4.13.- Rendimientos obtenidos en la BDS con fuentes energéticas adicionales y 50% v/v de FFO.

FUENTE DE CARBONO ADICIONAL	X _{BDS} (%) 24h	qP (mmolHBP/KgCS·h)		pH 24h
		3h		
-	62.50	1.00	6.2	
2g/L de Succinato	92.85	2.35	6.8	
2g/L de Succinato + 4g/L de Etanol*	92.27	1.20	6.9	

* % de alcohol = 0.7% v/v

Ha de indicarse que si bien el proceso de BDS se ha realizado en condiciones de crecimiento, el medio no sufrió variación en lo relativo a la densidad de biocatalizador durante las primeras horas, lo que se dedujo cualitativamente al no observar aumento de la turbidez del caldo durante 10 horas de reacción. En cambio, en las muestras correspondientes a las 24 horas de reacción si se observó aumento de la turbidez del caldo.

A la vista de los resultados queda demostrado que resulta conveniente añadir al medio de crecimiento una fuente de carbono adicional, y en principio, añadiendo 2g/L de Succinato de Sodio se obtiene una velocidad de producción de HBP significativamente mayor.

Debe ser recalcado que en anteriores estudios de BDS con células en crecimiento, en los que se ha utilizado L-Glutámico para el crecimiento de la *P. putida* CECT5279, no se alcanzaron porcentajes de desulfuración tan elevados, si bien la concentración inicial de inóculo era también muy inferior a 1g/L.

En estudios similares Yan y col., 2000 y Yoshikawa y col., 2002, determinaron en crecimientos acuosos con *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 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 y se mantenga constante e igual a 2g/L. Explican que el incremento en la actividad específica de las enzimas puede atribuirse en parte al suplemento de coenzima FMNH₂ que se origina en la ruta de degradación del alcohol, esencial para las reacciones catalizadas por las enzimas DszC y DszA.

En lo relativo al pH final registrado, ha descendido en los ensayos carentes de succinato. El consumo de este implica el aumento del pH, mientras que la acumulación de HBP, la acidificación del medio de reacción. Por tanto, pudiera ser que la mejora en los rendimientos obtenidos se debiera a la mayor estabilidad del pH. Por otro lado, un elevado consumo de succinato debería haberse traducido en una basificación del medio de reacción, que no ha sucedido. Por tanto, podemos deducir que no ha habido un consumo elevado, dado que probablemente no ha habido prácticamente incremento de la densidad celular.

También en lo relativo al pH, Wang, P. y col., 1996 usaron glucosa y etanol como fuentes de carbono y observaron que el pH disminuye durante el crecimiento, si bien esto no les afectó a la producción de HBP.

Contradiendo nuestros resultados, Luo y col., 2003, determinaron con *Pseudomonas delafieldii* R-8 que en crecimientos en condiciones similares a las aquí planteadas el sistema no requiere de la adición de cofactores o agentes reductores, a parte de los ya contenidos por el inóculo. Sin embargo, esto puede deberse a que su inóculo tenía una concentración inicial de biomasa de 20g/L.

4.2.6. Influencia de la adición de ciclodextrinas en medios bifásicos.

En medios bifásicos, donde la hidrofobicidad del DBT se traduce en pequeñas concentraciones del mismo en la fase acuosa, se ha evaluado la conveniencia de introducir receptores supramoleculares como las ciclodextrinas.

El uso de ciclodextrinas en sistemas de BDS se justifica porque, por un lado, al formar un complejo con el DBT incrementa su transferencia a la fase acuosa, (Marzona y col., 1997), pero dado que además tiene la capacidad de hacerlo con el HBP que pueda acumularse en la fase acuosa, disminuye posibles efectos de inhibición por producto, (Setti y col., 2003). Además, las ciclodextrinas son compuestos de bajo coste, no tóxicos para las células y no susceptibles de ser metabolizados por ellas.

Los ensayos se han realizado con erlenmeyer de 250mL y 80mL de volumen de trabajo total. Todos los ensayos se han realizado en condiciones bifásicas, con 50% de hexadecano (C16) v/v y 50ppm de DBT disuelto en C16. De nuevo la fase acuosa ha sido BSM, (2.3.2.), y las condiciones de operación, 30°C y 200rpm. El pH inicial en todos los ensayos fue 7.0.

La fuente de carbono utilizada para el crecimiento ha sido Succinato de Sodio, en concentración igual a 2g/L. La ciclodextrina utilizada ha sido del tipo β -ciclodextrina, siendo su concentración en todos los ensayos 15ppm.

En cuanto a la concentración de biocatalizador, obtenida como se describía en los apartados 2.5.2. y 2.5.3., fue de 1g/L de *R. erythropolis* IGTS8. Dado que el biocatalizador había sido crecido previamente en un medio no selectivo, en estos ensayos se reproduce el mismo medio de reacción, con condiciones de crecimiento y DBT como fuente de azufre, que se ha descrito en el apartado anterior.

En la figura 4.16. se comparan los rendimientos obtenidos con las condiciones de ensayo descritas en ausencia y presencia de ciclodextrina.

En primer lugar debe subrayarse que de nuevo, y respecto al aumento de concentración de biomasa, no se observó aumento de la turbidez del caldo durante las 10 primeras horas de reacción, lo que implicaría que probablemente no hubo replicación celular. A las 24 horas si se observaron los medios de reacción más turbios.

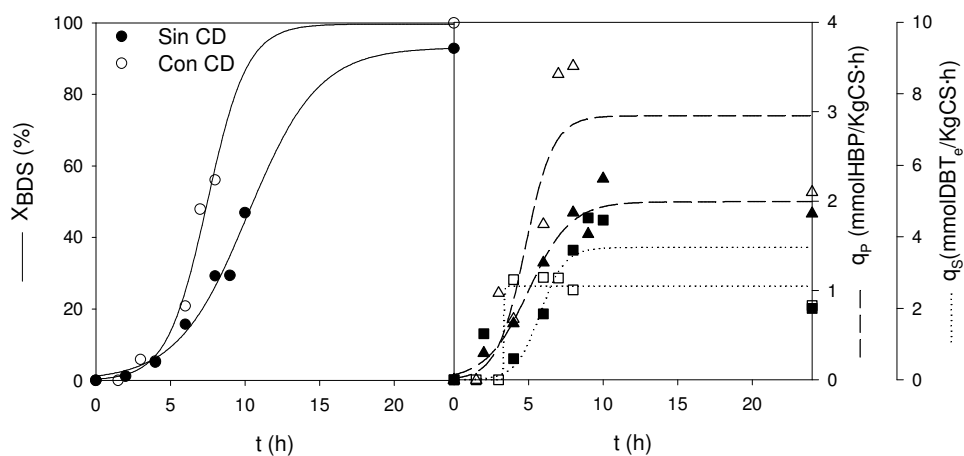


Figura 4.16.- Porcentaje de desulfuración y velocidades específicas de producción y consumo con 1g/L de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en ausencia y en presencia de 15ppm de β -ciclodextrina (CD), en medios con 50% v/v de FFO.

En presencia de 15ppm de β -ciclodextrina, como puede observarse, se incrementan el rendimiento de desulfuración y la velocidad específica de producción de HBP, mientras que la velocidad de consumo de DBT disminuye un poco. Por tanto, el efecto de la β -ciclodextrina favorece la producción de HBP, probablemente evitando los efectos de inhibición por la acumulación de HBP en el medio extracelular, (Setti y col., 2003).

En cambio, la transferencia de DBT a la fase acuosa no se vio incrementada, probablemente debido a que la interfase estaría saturada de células de *R. erythropolis* IGTS8 adheridas a la misma, y dado que con *Rhodococci*, la reacción de BDS se lleva a cabo en la superficie interfacial, (Le Borgne y Quintero, 2003).

Para observar mejor el efecto de la ciclodextrina sobre la producción de HBP, y por tanto, sobre el rendimiento del proceso de BDS, se ensayaron

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

concentraciones de biocatalizador entre 0.01 y 4g/L de *R. erythropolis* IGTS8, obtenidas en las mismas condiciones que se han descrito antes. La tabla 4.14. muestra los resultados obtenidos.

Tabla 4.14.- Rendimientos obtenidos en la BDS con β -CD, Rhodococcus erythropolis IGTS8 y 50% v/v de FFO.

C_X (g/L)	X_{BDS} (%) 3h	X_{BDS} (%) 24h	qP (mmolHBP/KgCS·h) 3h	qP (mmolHBP/KgCS·h) 24h	pH 24h
0.01	0.00	0.00	0.00	0	6.8
0.10	0.00	76.50	0.00	15.94	6.7
0.50	0.00	100.00	0.00	4.53	6.8
1.00	5.82	100.00	0.97	2.10	6.7
1.50	19.57	90.32	2.39	1.38	6.2
2.00	24.45	97.57	2.04	1.02	6.0
3.00	24.68	100.00	1.37	0.7	6.0
4.00	20.35	98.16	0.85	0.51	5.9

En lo relativo a la biomasa, los distintos caldos de cultivo no aumentaron su turbidez hasta pasadas las 10 horas de reacción, como se ha descrito previamente.

Por otro lado, y respecto a la BDS, en estos ensayos se han obtenido porcentajes de conversión muy elevados a las 24 horas de reacción, incluso con concentraciones de 0.1g/L. El porcentaje de desulfuración ha aumentado conforme se utilizaban mayores concentraciones de biocatalizador, estabilizándose a partir de emplear una densidad celular entre 1 y 2g/L, lo que podría estar relacionado con la saturación de la interfase por las células de biocatalizador.

En estas condiciones experimentales hay limitaciones de transferencia, (Maghsoudi y col., 2001), y a la vista de los resultados obtenidos a las 3 horas de reacción, la presencia de 15ppm de β -ciclodextrina no los ha solventado.

En cuanto a la velocidad de producción de HBP a las 3 horas de reacción, ésta alcanza un máximo con 1.5g/L, disminuyendo a concentraciones superiores de biocatalizador. Sin embargo, a 24 horas queda claro que, salvo en el ensayo de 0.01g/L de biocatalizador en el que no llegó a llevarse a cabo la reacción, las velocidades específicas de producción de HBP disminuyen conforme aumenta la

concentración de células, lo que indica que probablemente se estén combinando efectos de inhibición por producto y limitaciones de transferencia.

El pH, medido a las 24 horas de reacción, se mantuvo constante hasta que la concentración de biocatalizador superó 1g/L. A partir de ese umbral el valor de pH cayó un punto, debido probablemente a que la elevada producción de HBP acidificaba el medio.

A la vista de estos resultados puede concluirse que 15 ppm de β -ciclodextrina no mejoraron suficientemente la transferencia de materia, puesto que en tal caso se habrían alcanzado mayores velocidades específicas de producción de HBP, incluso cuando se empleaban elevadas concentraciones de biocatalizador. Y, en lo relativo a la inhibición, si bien disminuye respecto al mismo sistema en ausencia de ciclodextrina, no desaparece.

Nuestros resultados no coinciden con lo reportado por Setti y col., 2003, en el que si observaban claramente mejora de la transferencia de DBT y disminución de los efectos de inhibición por producto, pero su sistema de BDS se llevaba a cabo en condiciones puras de crecimiento, con hidroxipropil- β -ciclodextrina, y el pH en el que trabajaban era básico.

4.3. BIODESULFURACIÓN CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 2L.

Dado que la mayoría de los ensayos se han realizado a escala de erlenmeyer, se ha considerado pertinente evaluar algunas de las variables a escala de fermentador.

En todos los ensayos el fermentador utilizado ha sido un tanque agitado de 2L de volumen útil de trabajo, con eje concéntrico de agitación y dos turbinas de 6 palas cada una, situadas a diferentes alturas. Sus características están descritas en el apartado 2.1.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Los ensayos realizados se han enfocado al estudio de la influencia de la fracción de fase orgánica y a la comparación entre ácido L-glutámico y D-glucosa, como fuentes de carbono, con células en crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, sobre la BDS del DBT a escala de fermentador.

Finalmente se ha comparado el desarrollo del proceso de BDS del DBT con células en crecimiento de *P. putida* CECT5279, y *R. erythropolis* IGTS8

La siguiente figura esquematiza el proceso.

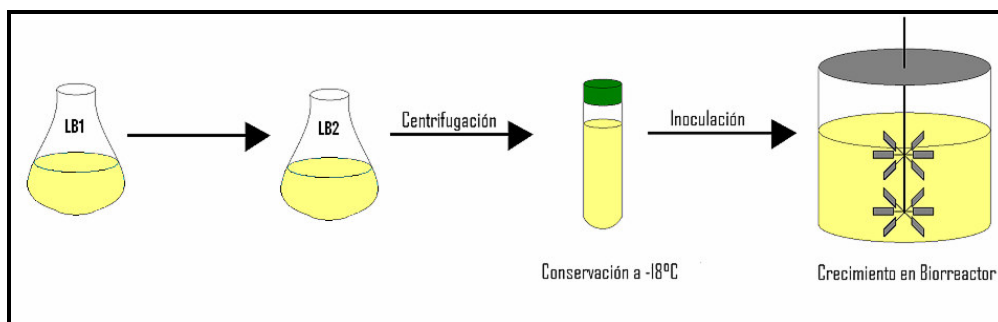


Figura 4.17.- Protocolo de ensayos de BDS en fermentador con células en crecimiento

4.3.1. Influencia de la fracción de fase orgánica (FFO)

Para analizar el efecto de la FFO se ensayaron crecimientos con 30 y 50% v/v en fermentador tipo tanque agitado, con 2L de volumen de trabajo.

Como en estudios anteriores, la fase acuosa estaba formada en todos los casos por BSM, (2.3.2.), con 20g/L de ácido L-Glutámico como fuente de carbono y 0.2g/L de biomasa inicial, que en este estudio ha sido la cepa de *P. putida* CECT5279 dado que presenta mayores problemas a la hora de llevar a cabo la BDS en medios bifásicos, como se ha ido describiendo a lo largo del presente capítulo.

La fase orgánica la ha constituido hexadecano con 300ppm de DBT. Las condiciones de operación han sido 30°C, 250rpm, y caudal de aire de 1L/L/min.

La figura 4.18. muestra la evolución de la biomasa en estos ensayos.

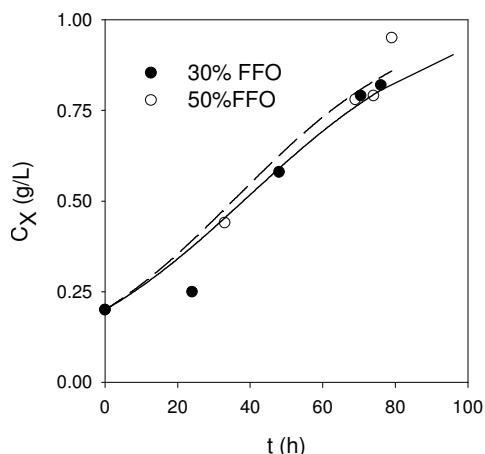


Figura 4.18.- Crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 con DBT en tanque agitado.

Aplicando el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1.), se obtienen valores de μ_{\max} y $C_{X\max}$ de 0.035 h^{-1} y 1.03 g/L , para la fracción de 30% v/v, y de 0.039 h^{-1} y 1.02 g/L , para la fracción de 50% v/v.

Ha de indicarse que las constantes obtenidas no son similares a las alcanzadas con el estudio realizado a escala de erlenmeyer, (apartado 4.2.4). Las μ_{\max} obtenidas han sido especialmente inferiores, si bien ha de indicarse que en el estudio a escala de erlenmeyer, se mantenía la cantidad de DBT constante e independiente a la FFO. En este estudio en cambio, se ha mantenido constante la concentración, siendo bastante inferior a las ensayadas en el apartado 4.2.4.

En lo relativo a los rendimientos del proceso de BDS, los porcentajes de desulfuración alcanzados son del 43.75 y del 37.5%, para las FFO de 30 y 50% v/v, respectivamente. Estos valores se deben a que en la FFO de 30% hay una mayor cantidad de células para convertir una menor cantidad de DBT. En cambio, con 50% v/v se aumentó la cantidad de DBT, y se disminuyó la de biomasa, al introducir menos volumen de fase acuosa. Por otro lado, estos relativamente bajos valores de rendimiento son debidos a la existencia de problemas de transferencia de DBT a la fase acuosa con mayores porcentajes de hexadecano en el medio.

La velocidad de producción de HBP expresa mejor la comparación entre ambos ensayos. Con 30% v/v de FFO se alcanzó el valor de $8.16 \cdot 10^{-4} \text{ gHBP} \cdot \text{h}^{-1}$, y con 50% v/v se obtuvo un valor un poco superior, e igual a $1.46 \cdot 10^{-3} \text{ gHBP} \cdot \text{h}^{-1}$.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Respondiendo a estos resultados se puede concluir que analizando de manera aislada la influencia de la FFO no se observa disminución en el rendimiento del proceso de BDS, y las curvas de biomasa son muy similares.

4.3.2. Influencia de la fuente de carbono

Para estudiar el efecto de la fuente de carbono en nuestras condiciones se llevaron a cabo ensayos de BDS con células en crecimiento de *P. putida* CECT5279, utilizando 20g/L de D-Glucosa o L-Glutámico, en fermentador tipo tanque agitado, con 2L de volumen de trabajo.

De nuevo la fase acuosa estaba formada en todos los casos por BSM, (2.3.2.), y 0.2g/L de concentración de inóculo inicial.

La fase orgánica la ha constituido una madre de 300ppm de DBT en hexadecano, manteniéndose la proporción entre fase acuosa y orgánica en el 50% v/v. Las condiciones de operación han sido 30°C, 250rpm, y caudal de aire de 1L/L/min.

La figura 4.19. muestra la evolución de la biomasa en ambos crecimientos.

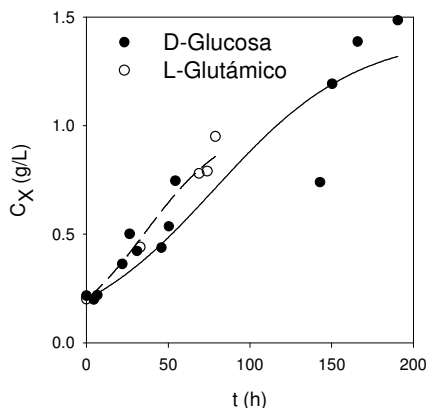


Figura 4.19.- Crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 con DBT en tanque agitado y 50% v/v de FFO.

Aplicando el modelo logístico de crecimiento, (ecuación 4.1.), para el crecimiento con D-Glucosa se alcanzan valores de μ_{\max} y $C_{X\max}$ de 0.023 h^{-1} y

1.42g/L. Con L-Glutámico, como se ha indicado con anterioridad, los valores observados han sido 0.039 h^{-1} y 1.02g/L de μ_{max} y C_{Xmax} , respectivamente.

En el apartado 4.2.2., (a escala de erlenmeyer y en condiciones acuosas), se observaban diferencias mucho más significativas en los valores que alcanzaban las constantes de crecimiento, siendo claramente inferiores en el caso de emplear D-Glucosa como fuente de carbono.

En fermentador se asume por tanto que la utilización de la D-Glucosa se realiza con un mayor rendimiento, que podría estar relacionado con el mejor suplemento de oxígeno, (Schilling y col., 2002).

En lo relativo al proceso de BDS, utilizando glucosa como fuente de carbono se ha obtenido un porcentaje de desulfuración y una velocidad de producción de HBP menor que cuando se ha empleado L-Glutámico. Así, mientras que el porcentaje de desulfuración alcanzó el 37.5% con L-Glutámico, con D-Glucosa sólo se llegó a un 6.8%. La velocidad de producción de HBP fue de $1.46 \cdot 10^{-3}$ y $1.41 \cdot 10^{-4} \text{gHBP} \cdot \text{h}^{-1}$ para los crecimientos con L-Glutámico y D-Glucosa, respectivamente.

Estos resultados en fermentador cambian la tendencia presentada en erlenmeyer. Así, y como se describía en el apartado 4.2.2., utilizando glucosa el porcentaje de desulfuración y la velocidad de producción de HBP eran mayores que cuando se empleaba L-glutámico como fuente de carbono aunque, por otro lado, las diferencias en los valores no eran tan elevadas como lo son en esta tanda de ensayos en fermentador.

Ha de señalarse además que los rendimientos obtenidos con glucosa son significativamente pequeños, comparados con lo que se ha ido obteniendo en la experimentación y con lo reportado en bibliografía en trabajos similares, (Schilling y col., 2002)

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Estos resultados demuestran que para llevar a cabo la BDS con células en crecimiento a escala de fermentador y con la cepa de *P. putida* CECT5279, es preferible emplear ácido L-Glutámico como fuente de carbono, frente a glucosa.

4.3.3. *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 frente a *Pseudomonas putida* CECT5279.

La BDS en fermentador con células en crecimiento de ambos microorganismos se ha llevado a cabo con BSM, (2.3.2.), siendo la fuente de carbono ácido L-Glutámico (20g/L) y la de azufre, DBT disuelto en hexadecano, (300ppm). La proporción fase orgánica-fase acuosa ha sido 50% v/v.

La utilización de D-glucosa o ácido L-Glutámico no afecta a la velocidad de crecimiento o concentración máxima de biomasa alcanzada de *R. erythropolis* IGTS8, ni a su capacidad de desulfuración de DBT, (H. del Olmo y col., 2005 A). Por tanto, y para comparar la BDS en fermentador con células en crecimiento de *P. putida* CECT5279 y *R. erythropolis* IGTS8 se ha decidido emplear en ambos casos la misma fuente de carbono.

Las condiciones de operación han sido 30°C, 250rpm, pH inicial 7.5 y caudal de aire controlado a 1L/L/min, tanto en el caso de emplear *R. erythropolis* IGTS8 como biocatalizador, (H. del Olmo y col., 2005 B), o *P. putida* CECT5279, (Martín y col., 2004).

En la figura 4.20. se muestran las curvas de crecimiento de ambos microorganismos en tanque agitado 2L, expresados en densidad óptica a 600nm.

Como se ha indicado previamente, *Rhodococcus* sp. se adhiere fuertemente a la fase orgánica, mientras que *Pseudomonas* sp. se encuentra dispersa en la fase acuosa del medio de crecimiento. Por ello, y dada la imposibilidad de separar completamente el hexadecano del cultivo de *R. erythropolis* IGTS8, el uso de la curva de calibrado 2.7. incurre en errores muy elevados.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

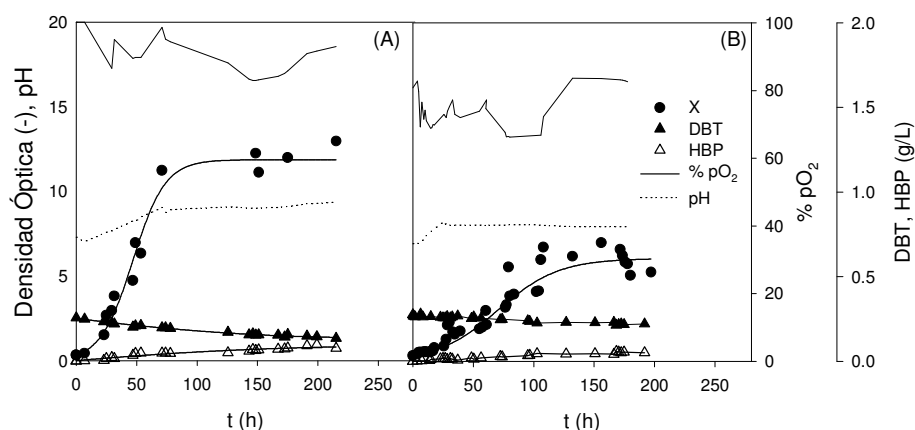


Figura 4.20.- Crecimientos de (A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y (B) *Pseudomonas putida* CECT5279 en tanque agitado y 50% v/v de FFO.

En estas condiciones, y aplicando el modelo logístico de crecimiento, *R. erythropolis* IGTS8 ha alcanzado una velocidad de crecimiento específica máxima de 0.077 h^{-1} . *P. putida* CECT5279 ha alcanzado una velocidad inferior, de 0.046 h^{-1} , debido a los problemas de biodisponibilidad del DBT en la fase acuosa. La densidad óptica inicial en ambos caldos ha sido de 0.3.

Debe subrayarse que en condiciones acuosas la cepa de *P. putida* CECT5279 utilizada tiene una velocidad de crecimiento 1.8 veces mayor a la de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, según puede observarse en el apartado 4.2.2.

La tabla 4.15. muestra los rendimientos alcanzados en ambos crecimientos.

Tabla 4.15.- Rendimientos del proceso de BDS en fermentador comercial, con células en crecimiento y 50% v/v de FFO.

Microorganismo	DBT _{F*} eliminado (ppm)	HBP _{F*} producido (ppm)	X _{BDSF*} (%)
IGTS8	152.5	120.3	37.84
CECT5279	59.3	57.5	20.81

En nuestros ensayos, con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 obtenemos actividades máximas de $1.12 \cdot 10^{-3} \text{ g HBP} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y $7.88 \cdot 10^{-4} \text{ g HBP} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ cuando se emplea *Pseudomonas putida* CECT5279.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Por tanto podría concluirse que en las condiciones de ensayo y en medios bifásicos, se obtienen mejores rendimientos y actividades de BDS cuando se utiliza *R. erythropolis* IGTS8, frente a *P. putida* CECT5279.

En bibliografía, Schilling y col., 2002, reportan que en ensayos de BDS a escala de tanque agitado 2L, y en condiciones bifásicas, obtuvieron con *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 porcentajes de desulfuración de 18.60% y una actividad de producción de HBP máxima de 0.09g de HBP·L⁻¹·h⁻¹ frente a 0.05 en régimen discontinuo. Sin embargo, estos estudios fueron realizados con 3500ppm de DBT, y una densidad óptica inicial a 660nm de 352. Por tanto, tanto la concentración de biocatalizador como la concentración de DBT fueron muy superiores a lo utilizado en nuestros ensayos, lo que puede explicar la diferencia en los valores de actividad.

Por último, y en referencia a todos los ensayos descritos de BDS de DBT con células en crecimiento, tanto a escala de erlenmeyer como de fermentador comercial, cuando el medio de reacción es bifásico no se observa una acumulación significativa de productos intermedios, ni en la fase acuosa ni en la orgánica. Por tanto, las diferencias observables entre el DBT eliminado y el HBP producido bien pueden considerarse errores en la medida del producto final, o acumulación de productos en el interior celular, o adheridos a la membrana.

4.4. ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

El estudio cinético del crecimiento microbiano es de gran importancia para identificar los procesos químicos que influyen en la metabolización del sustrato y predecir el comportamiento de la población de microorganismos en su medio de crecimiento, y así el desarrollo del proceso de la BDS.

El objetivo del presente estudio es simular la evolución de la biomasa junto con la eliminación de DBT y producción de HBP, en algunos de los estudios descritos en los apartados anteriores.

Sin embargo, debido a que el crecimiento se ha detenido normalmente antes de que se consumiera el DBT, no puede establecerse claramente que éste sea el sustrato limitante del crecimiento. Ha de indicarse además que los microorganismos crecen empleando el azufre que es liberado del DBT a través de la ruta metabólica 4S, (Monticello, 2000).

Por lo tanto, y aunque existan otros factores que afectan a la producción de biomasa, para aplicar un modelo cinético que describa conjuntamente el proceso de BDS y el crecimiento del biocatalizador, se supone que la velocidad específica de crecimiento (μ) está directamente relacionada con la concentración de sustrato limitante (S), que asumimos es la concentración de DBT añadida en cada caso.

En bibliografía apenas se han encontrado estudios cinéticos de crecimiento relacionados con el consumo de DBT. Hasta la fecha, sólo los trabajos de Guchhait y col., 2005A y B han aplicado un modelo cinético basado en el consumo de DBT como único sustrato limitante. Estos autores han realizado estudios cinéticos para sistemas de BDS con células en crecimiento de *Rhodococcus* sp. JUBT1, y concluyen que en un sistema modelo con 5% de fracción de fase orgánica, (con hexadecano como solvente orgánico), y un rango de concentraciones de DBT de entre 100 y 1000ppm, el patrón de desulfuración puede representarse con el modelo de Haldane, mejor que con el de Monod, dado que presenta inhibición tanto del crecimiento como de la BDS por la concentración de sustrato, DBT.

La cinética de crecimiento de Haldane viene expresada por la ecuación:

$$\frac{dX}{Xdt} = \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (4.2)$$

donde μ_{\max} es la velocidad específica máxima de crecimiento, h^{-1}

S, la concentración de sustrato limitante, $gDBT \cdot L^{-1}$

K_S , la constante de saturación, $gDBT \cdot L^{-1}$

K_I , la constante de de inhibición del crecimiento, $gDBT \cdot L^{-1}$

El consumo de sustrato se define de forma equivalente:

$$\frac{dS}{dt} = q_{S\max} \cdot X \cdot \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I'}} \right) \quad (4.3)$$

donde $q_{S\max}$ es la velocidad específica máxima de consumo de sustrato, $\text{gDBT} \cdot \text{L}^{-1} / \text{gCS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$

K_I' , la constante de inhibición del proceso de BDS, $\text{gDBT} \cdot \text{L}^{-1}$

Considerando que no se observa la acumulación de ningún intermedio, y que la producción de HBP mantiene una relación estequiométrica con el consumo de DBT, la ecuación que describe la acumulación de HBP es la siguiente:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} \cdot \left(\frac{170.21}{184.26} \right) \quad (4.4)$$

donde P es la concentración de producto, $\text{gHBP} \cdot \text{L}^{-1}$, y 170.21 y 184.26 los pesos moleculares del HBP y del DBT, respectivamente.

Empleando el modelo constituido por las ecuaciones 4.2, 4.3 y 4.4 se ha descrito el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 y *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, sobre DBT.

Los parámetros cinéticos empleados en los distintos ajustes han sido modificaciones de las constantes presentadas por Guchhait y col., 2005A y B. En sus trabajos, el valor de velocidad máxima de consumo de DBT es $6.45 \cdot 10^{-3} \text{gDBT/L} \cdot \text{h}$, y los valores de las constantes de saturación e inhibición de la ruta de desulfuración, 0.10gDBT/L y 1.66gDBT/L , respectivamente, con un rendimiento de biomasa en sustrato igual $0.4 \text{gCS}_{\text{Producida}} / \text{gDBT}_{\text{eliminado}}$.

Las diferencias en los valores de los parámetros se deben a las diferencias en el protocolo experimental y a las diferentes fracciones de fase orgánica utilizadas.

Modelo cinético con *Pseudomonas putida* CECT5279 en medios bifásicos

En primer lugar, ha de indicarse para simular los ensayos de BDS de DBT, con células en crecimiento de *P. putida* CECT5279, han sido aplicadas las mismas constantes, independientemente de que el ensayo estuviera realizado a escala de erlenmeyer o de fermentador comercial tipo tanque agitado, de 2L de volumen de trabajo.

A. Escala de Erlenmeyer

Los datos experimentales obtenidos en el estudio correspondiente con los apartados 4.2.3. y 4.2.4. han sido simulados con el modelo de Haldane.

En la tabla 4.16. se muestran las constantes determinadas para describir los crecimientos con 30 ó 27% v/v de hexadecano, mientras que la tabla 4.17 refleja los valores empleados para el ajuste de los crecimientos con 50% v/v.

Tabla 4.16.- Constantes cinéticas para la BDS con células en crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, y 27% o 30% de FFO v/v.

μ_{\max} (h ⁻¹)	K_I (gDBT·L ⁻¹)	q_{\max} (gDBT·L ⁻¹ /gCS·L ⁻¹ ·h)	K_S (gDBT·L ⁻¹)	K_I' (gDBT·L ⁻¹)
0.07	0.40	0.025	0.95	1.00

Tabla 4.17.- Constantes cinéticas para la BDS con células en crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, y 50% de FFO v/v.

μ_{\max} (h ⁻¹)	K_I (gDBT·L ⁻¹)	q_{\max} (gDBT·L ⁻¹ /gCS·L ⁻¹ ·h)	K_S (gDBT·L ⁻¹)	K_I' (gDBT·L ⁻¹)
0.07	2.00	0.025	2.00	2.50

Ha de indicarse que la velocidad específica máxima de crecimiento obtenida con el modelo logístico de crecimiento y con el modelo de Haldane muestra valores similares.

Por otro lado, y en referencia a los parámetros obtenidos, estos indican que la concentración de sustrato que inhibe el crecimiento y la ruta de BDS son diferentes.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

De igual modo, en sistemas de BDS acuosos con *R. erythropolis* KA2-5-1, Yoshikawa y col., 2002, indicaban que las concentraciones de DBT a partir de las cuales se observaba que disminuía la actividad de desulfuración y el crecimiento celular eran diferentes.

Comparando los parámetros obtenidos para los ensayos con 27 y 50% v/v de hexadecano, se observa un aumento significativo en las constantes de saturación e inhibición a mayor FFO. Habitualmente, los valores de constantes de saturación se ven influenciados por problemas de transferencia de materia.

En las siguientes figuras se muestra el buen grado de ajuste de los datos experimentales y calculados.

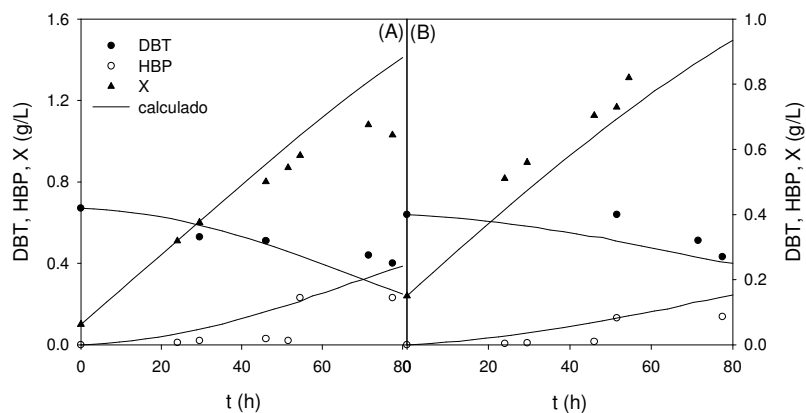
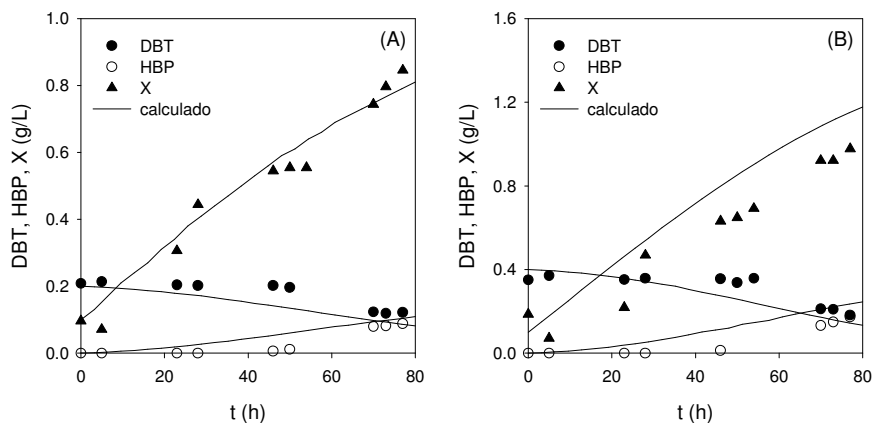


Figura 4.21.- Simulación del crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 con A) 30% y B) 50% v/v de FFO, ambos con 10mg de DBT inicial.



4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

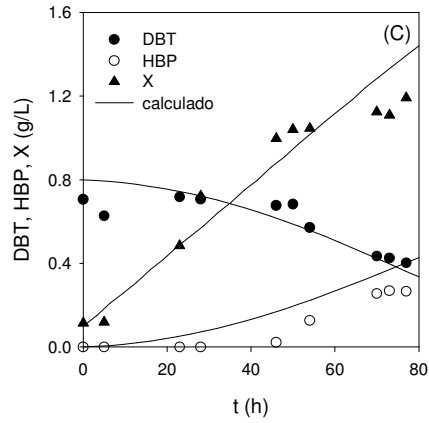


Figura 4.22.- Simulación del crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 con A) 200, B) 400 y C) 800 ppm de DBT, y 27% v/v de FFO.

La figura 4.23. representa los datos experimentales y los calculados, para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas, con 50% v/v de FFO.

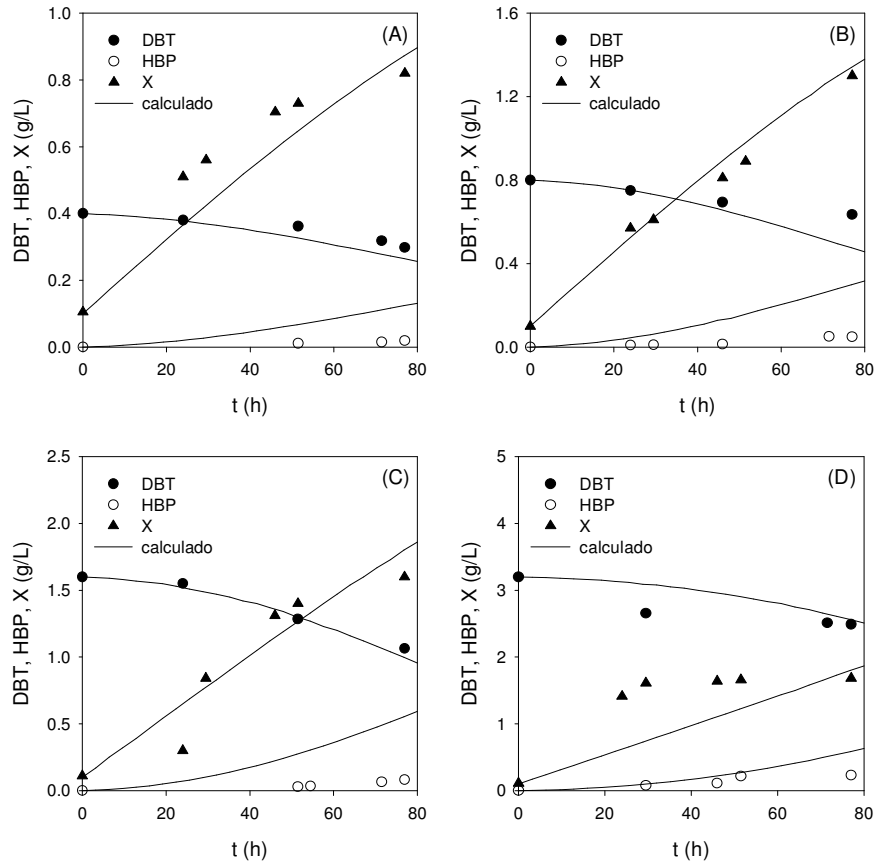


Figura 4.23.- Simulación del crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 con A) 400, B) 800 y C) 1600 y D) 3200ppm de DBT, y 50% v/v de FFO.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Es de destacar que en muchas de las simulaciones los valores calculados de HBP son superiores a los obtenidos experimentalmente. Como ha indicado con anterioridad, esto puede deberse a numerosas razones, principalmente errores de análisis. Por otro lado, Yoshikawa y col., 2002, indicaban que existe un tiempo de adaptación entre la captura del DBT por las células, y la excreción del HBP al medio extracelular, por lo que también estos autores observaban concentraciones de HBP inferiores a lo esperable.

B. Escala de Fermentador

En la figura 4.24. se presenta la evolución del crecimiento en fermentador comercial en medios con 30% y 50% v/v de FFO, y 300ppm de DBT, correspondientes a los ensayos descritos en el apartado 4.3.1., así como la evolución de los compuestos de la ruta 4S, y el buen ajuste con las curvas calculadas.

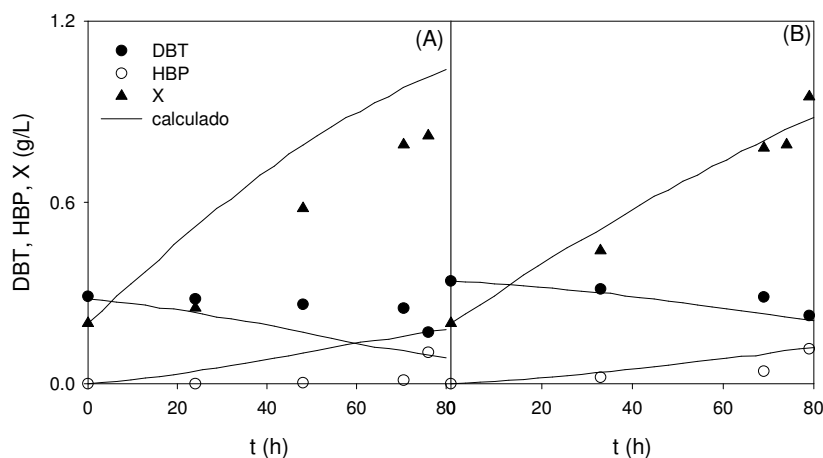


Figura 4.24.- BDS en fermentador con células en crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 con A) 30% y B) 50% v/v FFO.

Los crecimientos en fermentador con glucosa o ácido L-glutámico, (apartado 4.3.2.) y 300ppm de DBT han sido también ajustados con el modelo de Haldane. La tabla 4.18. muestra las constantes empleadas en el ajuste.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Tabla 4.18.- Constantes cinéticas para la BDS con células en crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 y distintas fuente de carbono, con 50% v/v de hexadecano.

Fuente de Carbono	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_I (gL ⁻¹)	q_{\max} (gS·L ⁻¹ /gCS·L ⁻¹ ·h)	K_S (g·L ⁻¹)	K_I' (g·L ⁻¹)
L-Glutámico	0.07	2.0	0.025	2.00	2.5
D-Glucosa	0.07	2.0	0.025	5.00	2.5

La constante de saturación en el caso de emplear D-Glucosa es 2.5 veces superior que usando L-Glutámico.

En la figura 4.25. se presenta la evolución del crecimiento y la de los compuestos de la ruta 4S. Las curvas teóricas corresponden con la simulación.

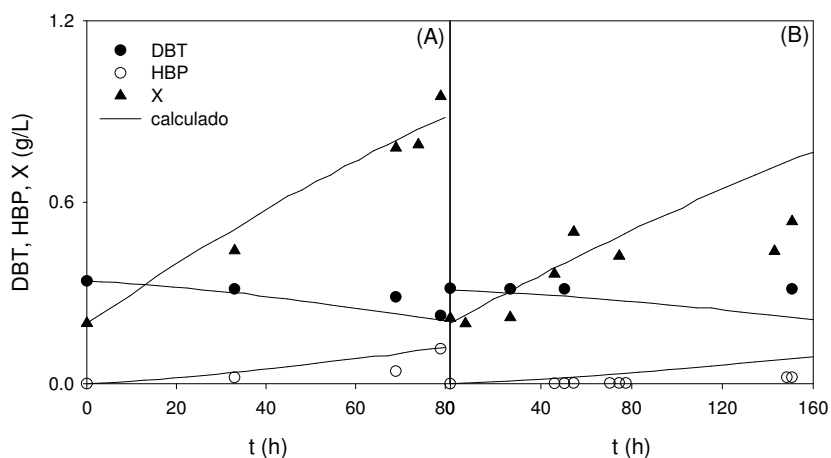


Figura 4.25.- BDS en fermentador con células en crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 con A) L-Glutámico y B) D-Glucosa y 50% v/v de FFO.

Modelo cinético con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medios bifásicos

El modelo cinético empleado con *R. erythropolis* IGTS8 es el mismo que se ha utilizado en los estudios con *P. putida* CECT5279.

En este caso, los ensayos han sido llevados a cabo a escala de erlenmeyer, simulándose los datos obtenidos en los estudios sobre la influencia de la adición de una segunda fuente de carbono adicional (4.2.5.) y sobre la influencia de la adición de ciclodextrinas (4.2.6.).

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Los ensayos sobre la influencia de la adición de una segunda fuente de carbono en el medio de reacción se han simulado correctamente con las constantes mostradas en la tabla 4.19. En la figura 4.26. se muestra el elevado grado de ajuste entre datos experimentales y calculados

Tabla 4.19.- Constantes cinéticas para la BDS con células en crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, 50% v/v de FFO y fuente de carbono adicional.

ENSAYO	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_I (gL ⁻¹)	q_{\max} (gS·L ⁻¹ ·gCS·L ⁻¹ ·h)	K_S (g·L ⁻¹)	K_I' (g·L ⁻¹)
BSM	20	2.0	0.025	2.5	2.5
BSM + Succinato	70	2.0	0.025	2.5	2.5
BSM + Succ. + Etanol	70	2.0	0.025	2.0	2.5

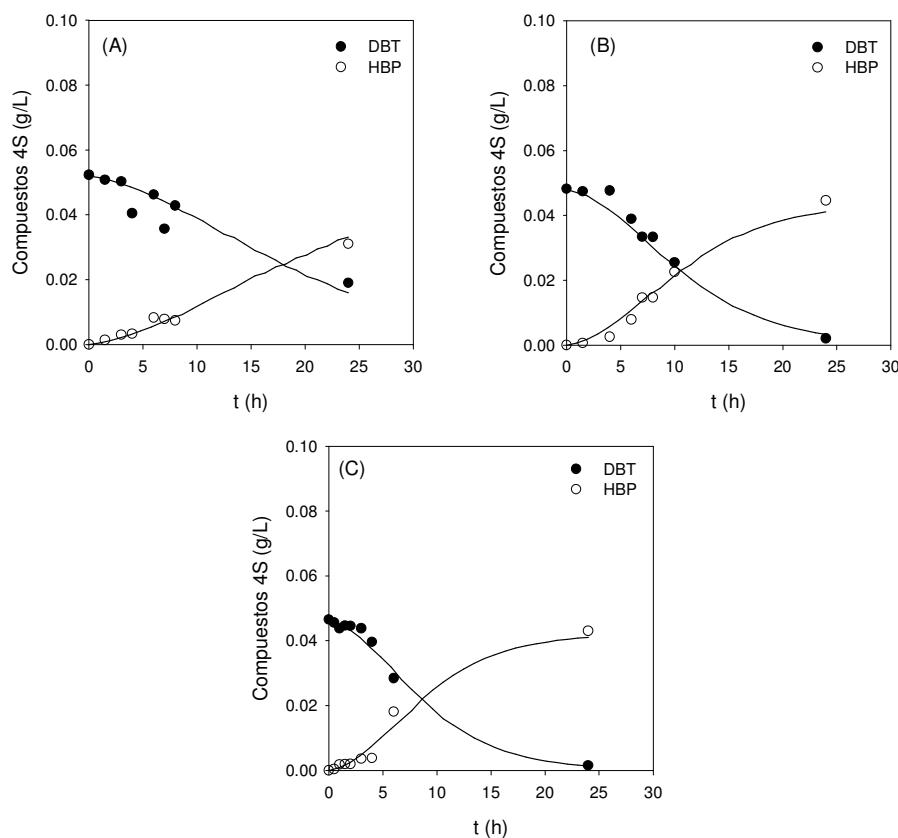


Figura 4.26.- Simulación de la BDS en crecimiento con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y A) ninguna fuente de carbono adicional, B) succinato de sodio y C) succinato y etanol.

Observando las constantes puede apreciarse que el valor de la constante μ_{\max} aumenta significativamente cuando se utiliza succinato de sodio, y que la

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

constante de saturación disminuye ligeramente al añadir además etanol. El etanol aumenta la solubilidad del DBT en la fase acuosa, afectando a la velocidad de transferencia y por tanto, a la K_S .

Además, ha de indicarse que los valores de μ_{\max} son muy superiores a los obtenidos en los ensayos descritos con *P. putida* CECT5279. A parte del cambio de biocatalizador utilizado, ha de tenerse en cuenta que las condiciones experimentales han sido muy diferentes, como se ha explicado en el apartado 4.2.5.

En relación a los ensayos del apartado 4.2.6., correspondientes a la adición de ciclodextrinas en medios bifásicos donde se lleva a cabo la BDS con células en crecimiento, han sido también simulados correctamente con el modelo de Haldane.

Para la simulación de los productos de la ruta 4S se utilizaron las constantes presentadas en la tabla 4.20.

Tabla 4.20.- Constantes cinéticas para la BDS con células en crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, 50% FFO y β -ciclodextrina.

μ_{\max} (h ⁻¹)	K_I (gL ⁻¹)	q_{\max} (gS·L ⁻¹ /gCS·L ⁻¹ ·h)	K_I' (gL ⁻¹)
70	2.00	0.025	2.50

La constante de saturación ha variado conforme se han empleado concentraciones distintas de biocatalizador. La tabla 4.21. recoge las K_S que simulan correctamente el comportamiento observado en cada uno de los distintos ensayos.

Tabla 4.21.- Constantes cinéticas de saturación para la BDS con células en crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, 50% FFO, β -ciclodextrina y distintas concentraciones de biocatalizador.

C_X (g·L ⁻¹)	K_S (g·L ⁻¹)	C_X (g·L ⁻¹)	K_S (g·L ⁻¹)
0.01	15.00	1.50	2.25
0.10	3.50	2.00	2.00
0.50	2.75	3.00	2.00
1.00	2.50	4.00	2.00

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Como puede observarse, cuando el ensayo ha sido realizado con BSM, succinato de sodio, 1g/L de *R. erythropolis* IGTS8 y 15ppm de β -ciclodextrinas, los parámetros cinéticos determinados han sido los mismos que se han descrito en ausencia de las mismas, (tabla 4.19).

En lo relativo al uso de diferentes concentraciones de biomasa inicial, en la tabla 21 puede observarse como disminuye la constante de saturación conforme aumenta la concentración de biocatalizador y en presencia de la ciclodextrina, hasta que se alcanza una densidad celular a partir de la cual se estabiliza. La misma tendencia se describía en el apartado 4.2.6., acerca de las velocidades específicas de producción de HBP.

Estos resultados podrían relacionarse con la saturación de la interfase cuando se utilizan elevadas densidades de células.

La figura 4.27. muestra la evolución de la ruta 4S en los distintos ensayos realizados con β -ciclodextrina.

4. CRECIMIENTO Y BDS CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

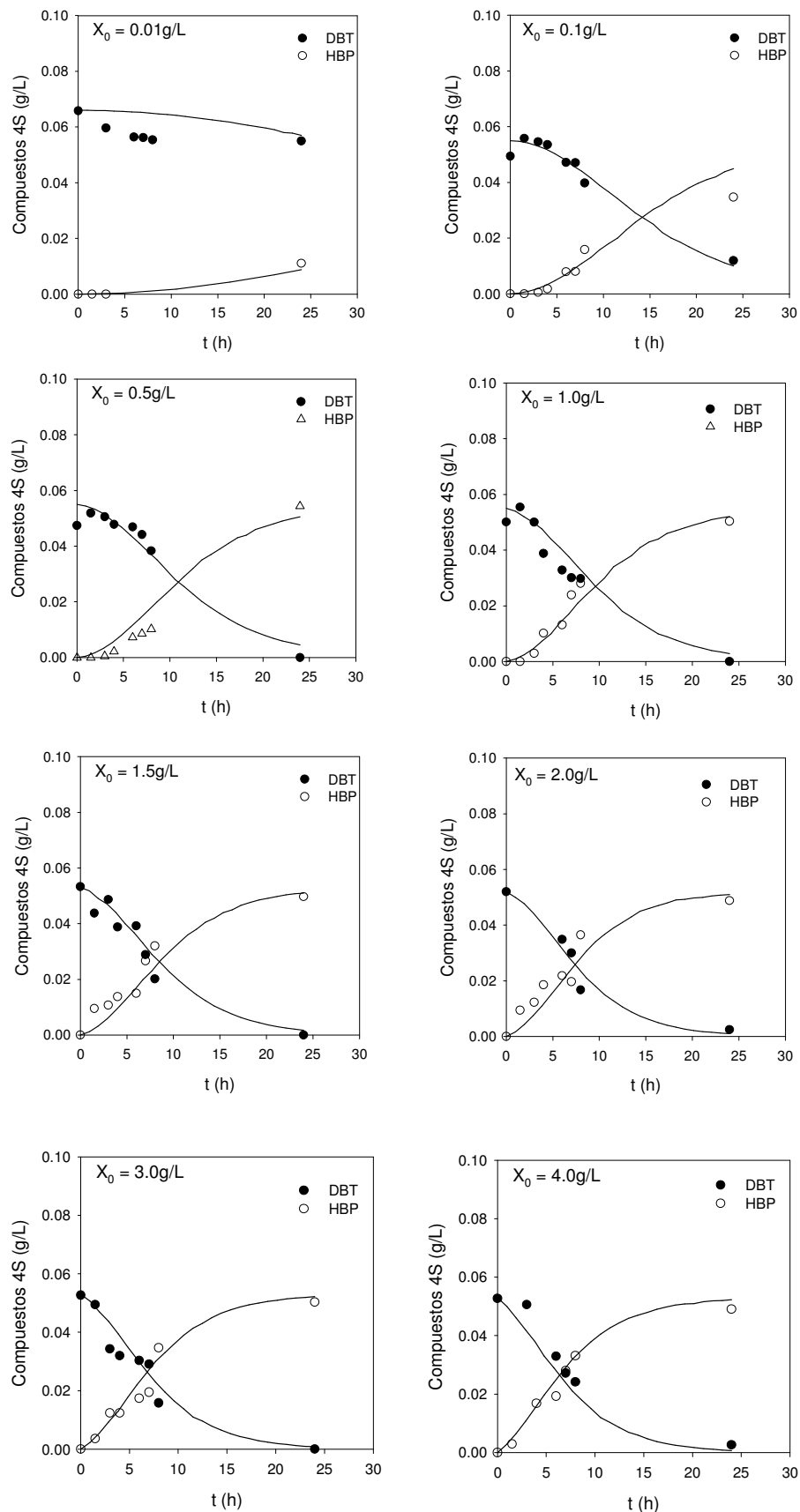


Figura 4.27.- Simulación de la BDS en crecimiento con β -ciclodextrina y 50% v/v de FFO.