

## 5. BIODESULFURACIÓN CON CÉLULAS EN RESTING CELL

Como se ha indicado anteriormente, la biodesulfuración, (BDS), puede llevarse a cabo con células con capacidad desulfurante tanto en condiciones de crecimiento como en parada de crecimiento o resting cell, (Nekodzuka y col., 1996; Konishi y col., 1997; Maghsoudi y col., 2001; Ohshiro y col., 2005; Rashtchi y col., 2006). Incluso hay trabajos en los que se ha demostrado que es posible desarrollar este proceso con extractos de células, (Ohshiro y col., 1994; Konishi y col., 2000), si bien, al ser una proceso metabólico multietapa, parece preferente el uso de células enteras, (Le Borgne y Quintero, 2003).

En bibliografía algunos autores indican que llevar a cabo el proceso de BDS con células en resting cell resulta preferible frente al sistema con células en crecimiento en términos de rendimiento, alegando principalmente una mayor conversión de DBT. Así, Ohshiro y col., 1996A, en un sistema bifásico y con temperaturas relativamente elevadas, observaron que las células de *Rhodococcus erythropolis* H-2 desulfuraban de forma más eficiente en modo de resting cell que en condiciones de crecimiento.

Sin embargo no se han encontrado estudios donde se realice esta comparación eliminando otro tipo de variables. En numerosas ocasiones se menciona que se lleva a cabo el proceso de BDS con células en resting cell por la mayor sencillez de la experimentación, y además, y dado que la biotransformación de dibenzotiofeno (DBT) con células en crecimiento suele realizarse en medios complejos, existen metabolitos que pueden interferir en el análisis de la ruta de desulfuración, (Konishi, y col., 1997).

En este capítulo, los ensayos de BDS con células en resting cell se han realizado utilizando de nuevo DBT como compuesto modelo a desulfurar, y principalmente hexadecano como solvente orgánico. Además, la mayoría de los ensayos en bifásico se han llevado a cabo con proporciones fase acuosa-fase

orgánica 1:1, dado que se conserva una actividad aceptable y el sistema modelo empleado se asemeja más a un sistema comerciable de BDS, (Abbad-Andaloussi y col., 2003).

Las características del sistema de reacción han constituido el primer bloque de estudio, identificado como estudios previos, y en el que se discrimina qué fase acuosa, qué fase orgánica, y qué pH, permiten alcanzar mayores rendimientos en el proceso. Además se ha estudiado la influencia de utilizar en el medio una segunda fuente de carbono adicional, y por otro lado, la de añadir emulsionantes, codisolventes, o incluso aumentar la velocidad de agitación, para mejorar la transferencia y solubilidad del DBT en la fase acuosa.

Una vez seleccionado el mejor medio de reacción para la BDS en resting cell en nuestras condiciones, el estudio se ha enfocado hacia la determinación de la influencia de la fracción de fase orgánica, de la concentración de DBT y de la concentración de biocatalizador. En este sentido, Luo y col., 2003, reportan que la velocidad y el alcance de conversión de la BDS en sistemas bifásicos dependen estrechamente de la fracción de fase orgánica, (FFO), de la concentración de DBT y de la concentración de biocatalizador.

Finalmente se han empleado modelos cinéticos, (basados en el modelo de cinética enzimática de Michaelis Menten), para describir la evolución del proceso de BDS y sus limitaciones.

Todos los ensayos realizados con células en resting cell se han llevado a cabo en régimen discontinuo y a escala de erlenmeyer, de 50, 100, 250 y 500mL, agitados en incubadora orbital.

Las condiciones de operación son siempre 30°C de temperatura constante, y 250rpm.

Las células utilizadas en los ensayos de resting cell son soluciones de caldo de crecimiento concentrado y resuspendido en suero salino, 9g/L, y glicerol, en relación 1:1, y mantenidas a -18°C.

Se ha comprobado que normalmente, el almacenamiento de las células en estas condiciones no implica pérdida de la capacidad desulfurante durante al menos un mes. Abbad-Andaloussi y col., 2003, reportan también que la actividad desulfurante de sus células, tras almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o justo empleadas tras la centrifugación del medio de cultivo, es similar.

En la figura 5.1. se esquematiza el protocolo seguido para llevar a cabo la BDS con células en resting cell, que se resume en tres etapas: producción del biocatalizador, conservación y reacción de desulfuración.

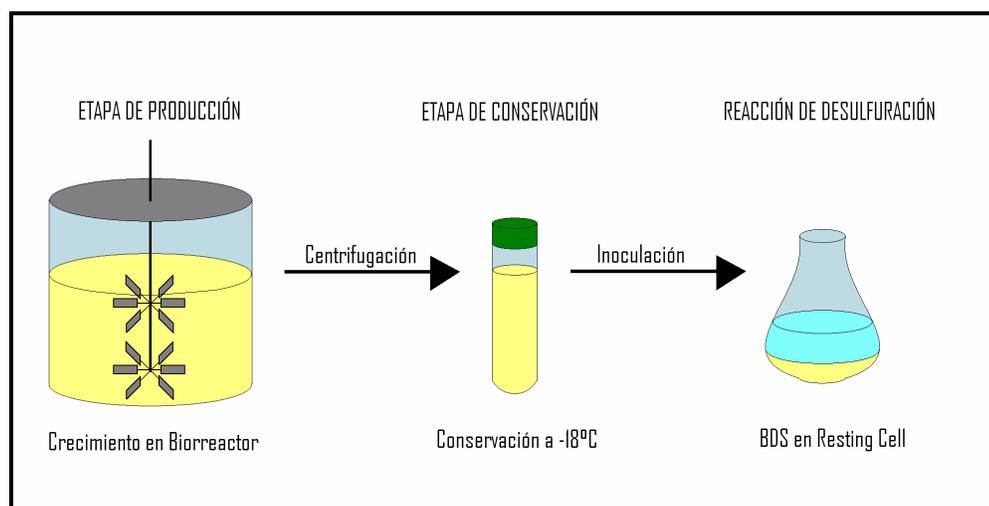


Figura 5.1.- Proceso de BDS con células en resting cell

**Etapa de producción del biocatalizador:** La obtención del inóculo se ha realizado en condiciones acuosas, tal y como se describe en los apartados 2.5.2. y 2.5.3. En el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se ha usado dimetilsulfóxido (DMSO) como fuente de azufre, en concentración de  $0.011\text{g/L}$ , y  $\text{MgSO}_4$ , en concentración  $0.44\text{g/L}$ , para el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279. En ambos casos la fuente de carbono son  $20\text{g/L}$  de L-Glutámico, y el pH se ha controlado a un valor de 7.5, adicionando  $\text{NaOH } 0.2\text{M}$ .

**Etapa de conservación del biocatalizador:** Como se ha descrito en el apartado 2.5.3., alcanzado el final de la etapa exponencial de crecimiento, el caldo de cultivo se centrifuga, se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende en suero salino y glicerol, al 50%, y se conserva a  $-18^{\circ}\text{C}$  para utilizarlo posteriormente en la etapa de reacción.

**Etapa de reacción de desulfuración:** El medio de reacción para que las condiciones de operación sean en parada de crecimiento o resting cell es un medio carente de los nutrientes necesarios para que el microorganismo continúe incrementando su densidad celular. Así, la reacción de desulfuración con células en resting cell tiene lugar en presencia de una fase acuosa que contiene el biocatalizador y una fuente de energía, para asegurar el suplemento fisiológico de electrones, (Le Borgne y Quintero, 2003).

En todos nuestros ensayos esa fuente de energía la constituye el glicerol contenido en el caldo de biocatalizador para su conservación.

Para optimizar el medio de reacción en el que se lleva a cabo la BDS con células en resting cell se han analizado los efectos de la composición del medio y el pH, comparando los porcentajes de desulfuración obtenidos y las velocidades de producción específicas de 2-Hidroxibifenilo (HBP), determinados como se ha explicado en el capítulo 2.5.5.

### **5.1. ESTUDIOS PREVIOS**

#### **5.1.1. Elección del tampón a utilizar como fase acuosa.**

En literatura no se han encontrado muchos estudios que comparen diferentes tampones a la hora de realizar la BDS en sistemas en resting cell.

Numerosos autores utilizan el tampón fosfato de sodio para llevar a cabo este tipo de reacciones, dado que este compuesto es muy económico. Algunos ejemplos de los autores que han reportado utilizarlo más recientemente son (Kirimura y col., 2001; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Luo y col., 2003; Konishi y col., 2005A y B; Nomura y col., 2005; Ohshiro y col., 2005; Jia y col., 2006).

Por otro lado, se han encontrado estudios donde la reacción de BDS se lleva a cabo con tampón [N-2-Hidroxietil]piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES), (Martin y col., 2004; Alcon y col., 2005; H. del Olmo y col., 2005A y B).

Para elegir entre ambos tampones, (en términos de rendimiento en la BDS), se han realizado ensayos en discontinuo en erlenmeyer de 100ml, con 3ml cuando el medio de ensayo era acuoso, o 6ml, cuando era bifásico.

El tampón HEPES se ha preparado con una concentración de 12g/L, ajustado a pH 8 adicionando NaOH 1M. El tampón fosfato de sodio se ha preparado de forma que el pH fuera también en torno a 8. El solvente orgánico utilizado en este estudio concreto ha sido siempre hexadecano (C16), dado que es un componente mayoritario de la fracción diesel, (Maghsoudi y col., 2001).

Se ha considerado importante determinar si el contacto previo con la fase orgánica producía algún efecto sobre el rendimiento en la BDS, teniendo en cuenta que la difusión de algún compuesto del hexadecano a la fase acuosa produjera potenciales efectos de toxicidad sobre las células. Para estudiar esta cuestión se ha mezclado un volumen de tampón HEPES y de tampón fosfato con un volumen de hexadecano, (C16), manteniendo la proporción 1:1 entre las fases, y se ha mantenido agitando en incubadora orbital a 250rpm y 30°C durante 24h. Posteriormente, se ha extraído la fase acuosa para utilizarla en ensayos acuosos de desulfuración.

Además, se ha evaluado la influencia de la presencia de fase orgánica sobre ambos tampones durante el desarrollo de la reacción de BDS, preparando medios bifásicos de reacción tampón/hexadecano, con 50% v/v de C16.

En todos los ensayos, la concentración de biocatalizador ha sido 2g/L, y la concentración inicial de DBT, 50ppm, procedentes de una madre de DBT en etanol de 7400ppm.

Para comprobar la concentración inicial de DBT en cada ensayo se han preparado réplicas en erlenmeyer independientes, y el muestreo se ha realizado en ausencia de microorganismo, dada la posible adsorción del DBT sobre las paredes celulares de los microorganismos.

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

En la tabla 5.1. se muestran los resultados obtenidos. Los porcentajes de desulfuración,  $X_{BDS}$ , y las velocidades específicas de producción de HBP,  $q_P$ , se determinan como se describe en el apartado 2.6.4.

**Tabla 5.1.- Porcentajes de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) y velocidades específicas de producción de HBP en resting cell con distintas fases acuosas.**

Tampón	% $X_{BDS}$ (3h)	$q_P^*$ (3h)	% $X_{BDS}$ (24h)	$q_P^*$ (24h)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8				
HEPES	18.54	7.49	53.95	2.72
FOSFATO	15.50	7.02	49.24	2.79
HEPES CONTACTO	21.10	7.64	44.97	2.58
FOSFATO CONTACTO	16.42	7.42	45.83	2.59
H + C16	20.78	8.39	55.31	3.12
F + C16	14.35	6.50	51.21	2.90
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279				
HEPES	11.40	2.74	38.60	2.17
FOSFATO	5.94	1.52	37.03	1.82
HEPES CONTACTO	8.34	2.02	38.24	2.03
H + C16	1.63	0.74	7.34	0.42

\*  $q_P$  (mmolHBP/Kg célula seca (CS)·h)

A la vista de los datos mostrados en la tabla es el tampón HEPES el más conveniente en términos de porcentajes de desulfuración, si bien las diferencias no son muy importantes.

En relación con el contacto previo del tampón con el C16, no se ha observado un detrimento de los porcentajes de desulfuración o de las velocidades de producción de HBP, por lo que podría interpretarse que ningún compuesto potencialmente tóxico para los microorganismos se transfiere de la fase orgánica a la acuosa.

En relación al efecto de la fase orgánica, tal y como puede apreciarse en los experimentos con *R. erythropolis* IGTS8, no se observan diferencias significativas en los valores de rendimientos alcanzados, por lo que de nuevo podemos asegurar que el hexadecano no produce mayor toxicidad sobre el tampón HEPES o el tampón fosfato.

Por otro lado, observando el comportamiento de ambos microorganismos en condiciones bifásicas, los porcentajes de conversión no disminuyen

excesivamente frente a lo obtenido en condiciones acuosas, cuando el inóculo es de *R. erythropolis* IGTS8. En cambio, supone casi la ausencia de conversión en el caso de usar *P. putida* CECT5279.

Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se adhiere fuertemente y de forma natural a las fases orgánicas, formando con ellas una biopelícula, donde se lleva a cabo la reacción, (Monticello, 2000). *Pseudomonas* sp. en cambio convierte tan sólo el DBT que se transfiere a la fase acuosa. Por tanto, y con el fin de ver conversión, sería necesario forzar la transferencia de este compuesto fuertemente hidrofóbico a la fase acuosa.

En cualquier caso, la influencia de la presencia de fase orgánica se ha estudiado con mayor profundidad en este capítulo.

### 5.1.2. Elección del solvente orgánico empleado como fase orgánica.

Los solventes objeto de estudio, dodecano (C12), tetradecano (C14), y hexadecano (C16), han sido utilizados frecuentemente en los trabajos publicados de BDS en sistemas bifásicos. Además, suponen un porcentaje muy elevado dentro de la composición de parafinas lineales de la fracción diesel.

Tabla 5.2.- Trabajos publicados de BDS con células en resting cell en condiciones bifásicas

SOLVENTE ORGÁNICO	ESTUDIOS BIFÁSICOS DE BDS EN RESTING CELL
C12	De Fatima y col., 1996; Kaufman y col., 1997; Oda y Ohta, 2002; Luo y col., 2003; Marcelis y col., 2003; Hou y col., 2005; Goubin y col., 2006 y Jia y col., 2006
C14	Ohshiro y col., 1995; Kobayashi y col., 2000; Osaka y col., 2000; Noda y col., 2003 y Konishi y col., 2005B
C16	Kaufman y col., 1997; Patel y col., 1997; Monticello, 2000; Maghsoudi y col., 2001 y Abbad-Andaloussi y col., 2003

No se han ensayado parafinas de cadena lineal corta dado que la polaridad y biotoxicidad de éstas es mayor que la de los alcanos objeto de estudio, (Oda y

Ohta, 1994), y dado que el diesel está mayoritariamente formado por las parafinas objeto de estudio.

Para la selección del solvente orgánico se realizaron experimentos sólo con *Pseudomonas putida* CECT5279, dado que a lo largo de la experimentación se ha observado que éste microorganismo es más sensible a la fase orgánica que *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Todos los ensayos se han realizado en erlenmeyer de 500mL, con 100mL de volumen total de trabajo. La fase acuosa utilizada ha sido HEPES, concentrado 12g/L, y ajustado a pH 8. El inóculo ha tenido una concentración de 0.75g/L de biomasa.

En este estudio la relación fase acuosa-orgánica se ha mantenido siempre en ratio 1:1. La cantidad de DBT añadida a cada ensayo ha sido de 500ppm, disuelto en etanol y las condiciones de operación fueron en todos los casos 30°C y 250rpm.

En la siguiente tabla se indican los valores medios obtenidos, de porcentajes de desulfuración a las 7 horas de reacción, velocidades específicas de producción de hidroxibifenilo (HBP), a las 3 horas de reacción, y DBT eliminado (DBT<sub>e</sub>) a las 7 horas de reacción.

*Tabla 5.3.- Rendimientos de desulfuración en resting cell al 50% FFO, con distintos solventes orgánicos y Pseudomonas putida CECT5279*

SOLVENTE ORGÁNICO	X <sub>BDS</sub> (%) - 7h	q <sub>p</sub> (mmolHBP/KgCS·h) - 3h	DBT <sub>e</sub> -7h (ppm)
C12	0.00	0.00	11.25
C14	1.91	26.55	21.05
C16	6.06	54.95	35.53

Con células en resting cell de *P. putida* CECT5279, como muestran los resultados, es con hexadecano con el que se obtiene mayor conversión de BDS.

Contrariamente, Oda y Ohta, 2002, observaron que la velocidad de desulfuración de DBT es mayor con dodecano en crecimientos en biorreactor con

*R. erythropolis* ATCC 53968, utilizando DBT como fuente de azufre y varios solventes como fase orgánica. Alegan que la elevada viscosidad de parafinas como tetradecano o hexadecano puede inhibir la difusión del oxígeno y/o del sustrato.

### **5.1.3. Elección del pH en el medio de reacción.**

El pH en el medio de reacción es otra de las variables fundamentales en el proceso de BDS. Sin embargo, se han encontrado pocos estudios en los que se evalúe su efecto, especialmente en condiciones de resting cell. En cualquier caso, la mayoría de los autores han trabajado a pH neutro.

Para la elección del pH óptimo en nuestro sistema de resting-cell se realizaron ensayos de BDS con células de *Pseudomonas putida* CECT5279, tanto en acuoso como en condiciones bifásicas, (manteniendo en ese caso la relación entre fases 1:1). La concentración de inóculo se ha mantenido constante e igual a 0.75g/L de biomasa.

Las fases acuosa y orgánica han sido HEPES y hexadecano (C16), y los volúmenes de trabajo fueron 50 y 100ml dependiendo de si eran ensayos acuosos o bifásicos, respectivamente. Se ha trabajado en erlenmeyer de 250ml, para los ensayos acuosos, y 500ml para los bifásicos.

En relación con la concentración inicial de DBT, y debido a los problemas de solubilidad del mismo, en los ensayos acuosos su concentración inicial ha sido de 10ppm, disuelto en 2-Propanol, mientras que en los bifásicos la concentración ensayada fue de 500ppm, para asegurar la difusión de DBT a la fase acuosa.

Los valores de pH evaluados fueron 7 y 8, alcanzados ajustando la fase acuosa a dicho valor mediante la adición de NaOH, 1M.

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

Tabla 5.4.- Rendimientos de desulfuración en resting cell con diferentes valores de pH en el medio de reacción.

ENSAYOS ACUOSOS	
pH = 8	X <sub>BDS</sub> (7h) = 75.66%
pH = 7	X <sub>BDS</sub> (7h) = 54.32%
ENSAYOS BIFÁSICOS, 50% v/v de FFO	
C12, pH = 8	X <sub>BDS</sub> (7h) = 0.00%
C12, pH = 7	X <sub>BDS</sub> (7h) = 0.00%
C14, pH = 8	X <sub>BDS</sub> (7h) = 2.95%
C14, pH = 7	X <sub>BDS</sub> (7h) = 1.90%
C16, pH = 8	X <sub>BDS</sub> (7h) = 6.03%
C16, pH = 7	X <sub>BDS</sub> (7h) = 5.59%

A la vista de estos resultados se ha seleccionado el valor de 8 para la realización de todos los ensayos de resting cell.

Estos resultados corroboran los obtenidos por Ohshiro y col., 1999 y H. del Olmo y col., 2005B, que determinan que el pH óptimo para la BDS con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y D-1, es de 8 y 7.5, respectivamente, debido, según Ohshiro, a que con dicho valor de pH se obtienen las mayores actividades y valores de estabilidad de la enzima DszA.

Por otro lado, Luo y col., 2003 determinan que el pH óptimo en reacciones en resting cell con *Pseudomonas delafieldii* R-8 es de 6.4, observando también que el cambio en la actividad desulfurante en el rango comprendido entre valores de pH de 4.6-8.5 es despreciable.

### 5.1.4. Influencia de la adición de una fuente de carbono adicional.

Como se ha descrito ampliamente con anterioridad, la ruta metabólica 4S es catalizada por cuatro enzimas y algunos co-factores como el NADH, (Ohshiro y col., 1996B).

Oshiro y col., 1994, demostraron la importancia del NADH en el proceso de BDS, y Setti y col, 1997 reportaron que por tanto, el problema de la regeneración del mismo era clave en el sistema.

Sin embargo, posteriormente los resultados aportados por Luo y col., 2003, y Alcon y col., 2005, concluyeron que en reacciones de resting cell con *P. delafieldii* R-8 y *P. putida* CECT5279, respectivamente, el sistema no requiere de la adición de cofactores o agentes reductores.

A pesar de estos estudios, y dada la ausencia de consenso a este respecto, se ha estimado conveniente evaluar el efecto sobre la conversión de DBT de la adición de una fuente de carbono adicional en el medio de reacción que posibilite a las células la regeneración del NADH.

Los ensayos se han efectuado sólo con cepas de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, y en condiciones bifásicas.

La fase acuosa se ha compuesto de tampón fosfato de sodio, a pH 7, y 1g/L de inóculo de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, crecido como se menciona en los apartados 2.5.2. y 2.5.3.

La fase orgánica ha estado constituida por el solvente, hexadecano, y 50ppm de DBT disuelto en hexadecano.

Todos los ensayos se realizaron con erlenmeyer de 250mL y 80mL de volumen de trabajo total. Las condiciones de operación fueron siempre 30°C y 200rpm.

En todos los ensayos hay una concentración inicial de glicerol de 15.75g/L, procedente del glicerol contenido en el inóculo para su conservación sin congelación celular.

Las fuentes de carbono adicionales han sido succinato de sodio, etanol y glicerol, tal y como se ensayó en condiciones de crecimiento, (apartado 4.2.5.). En los ensayos con etanol, el porcentaje de alcohol no ha superado el 1% v/v, evitando la aparición de posibles efectos de toxicidad, (Yan y col., 2000).

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

En la siguiente tabla se indican los ensayos realizados y los porcentajes de desulfuración y velocidades específicas de producción de HBP obtenidas.

Tabla 5.5.- Rendimientos obtenidos con fuentes de carbonos adicionales.

FUENTE DE ENERGIA ADICIONAL	X <sub>BDS</sub> (%)	qP (mmolHBP/KgCS·h)
	24h	3h
-	46.3	10.85
3g/L de Glicerol	31.0	5.23
4g/L de Etanol	43.3	5.15
2g/L de Succinato	43.9	7.6

El ensayo control, en el que no se ha añadido fuente adicional de carbono, parece alcanzar unos rendimientos algo superiores. Sin embargo, y dada su elevada similitud con el ensayo en el que se añade glicerol adicional, podemos asegurar que se debe simplemente al tiempo de almacenamiento del inóculo utilizado.

Lo que si se confirma, tal y como han reportado antes otros autores, es que en reacciones de BDS con células en resting cell, incluso con concentraciones relativamente bajas de biocatalizador, la adición de fuentes de carbono de fácil asimilación no afecta a la velocidad de BDS ni a la conversión final obtenida.

Del mismo modo, Alcón y col., 2005, demostraron que la concentración de los equivalentes reducidos y la actividad de la enzima DszD, responsable del consumo de NADH, no limitan la velocidad de desulfuración de DBT en ensayos acuosos con células de *Pseudomonas putida* CECT5279.

### 5.1.5. Mejora de la transferencia y solubilidad del DBT en medios bifásicos

En sistemas bifásicos, conseguir un elevado grado de mezcla entre ambas fases es fundamental para tener una buena transferencia de materia.

Debido a la baja solubilidad del DBT en la fase acuosa, (Monticello, 2000; Maghsoudi y col., 2001; Marcelis y col., 2003; Jia y col., 2006) es necesario optimizar las condiciones de mezcla en el ensayo para obtener una mayor difusión del DBT entre las fases.

Por otro lado, la biodisponibilidad de productos hidrófobos se incrementa si los microorganismos con capacidad desulfurante utilizados en medios bifásicos producen de forma natural biosurfactantes, que reducen la tensión superficial, incrementando el área de contacto, (Le Borgne y Quintero, 2003).

A este respecto hemos observado que en los ensayos con *R. erythropolis* IGTS8 en medios bifásicos hay mayor turbidez que en aquellos donde se emplea *P. putida* CECT5279, y además es más difícil separar la emulsión al proceder a la toma de muestras. Además está ampliamente reportado que *Rhodococcus* sp. IGTS8 es capaz de producirlos, (Gallardo y col., 1997; Kaufman y col., 1998).

Para incrementar la velocidad de transferencia de DBT de la fase orgánica a la fase acuosa existen varias alternativas, como incrementar la velocidad de agitación en el proceso, o adicionar al medio compuestos emulsionantes. Para incrementar la solubilidad del DBT en la fase acuosa, incrementando por tanto su disponibilidad, se pueden emplear, por ejemplo, codisolventes.

En los siguientes apartados se estudia la influencia de estos parámetros.

### Influencia del uso de Emulsionantes y/o Codisolventes

El uso de emulsionantes incrementa la superficie de contacto entre las fases orgánica y acuosa, favoreciendo la transferencia de materia. En el mercado existen numerosos compuestos que pueden lograr el incremento de área interfacial, (Tween 20, Tween 40, Tween 85, etc.).

Los codisolventes son sustancias que tienen elevada solubilidad en ambas fases, como los alcoholes. Su función es favorecer la solubilidad de productos muy hidrofóbicos en la fase acuosa.

En relación con los emulsionantes, en la literatura sobre procesos bifásicos de BDS con células en resting cell no se han encontrado prácticamente estudios donde se empleen este tipo de compuestos, pero tampoco se han publicado hasta

ahora muchos trabajos donde la BDS se desarrolle en sistemas con fracciones de fase orgánica elevadas.

Por otro lado, y en lo relativo al uso de codisolventes para sistemas de BDS en condiciones bifásicas se ha encontrado numerosos autores que disuelven los sustratos de la desulfuración, (DBT y derivados) en etanol, (Goubin y col., 2006; Jia y col., 2006; Konishi y col., 2005A; Luo y col., 2003; Maghsoudi y col., 2001; Onaka y col., 2000, etc.), si bien ninguno menciona un incremento en la transferencia de DBT a la fase acuosa debido a la actividad del etanol como codisolvente.

Para evaluar el efecto de la adición de emulsionantes o codisolventes a nuestro sistema de estudio se ha utilizado Tween 20 y etanol, como emulsionante y codisolvente, respectivamente.

Toda la experimentación se ha llevado a cabo en erlenmeyer de 500mL, con 100mL de volumen total de trabajo.

La fase acuosa utilizada ha sido 12g/L de HEPES, a pH 8, y 0.75g/L de *P. putida* CECT5279. No se han realizado ensayos con *R. erythropolis* IGTS8, dado que para incrementar la velocidad de transferencia de DBT este microorganismo produce biosurfactantes, como ya se ha mencionado previamente. Además, y dado que tiene la capacidad de adherirse a la interfase y capturar en ella el DBT, la mejora de la velocidad de transferencia de DBT a la fase acuosa probablemente no le afectaría de manera tan significativa.

Las fases orgánicas ensayadas han sido C12, C14 y C16. La relación fase acuosa-orgánica se ha mantenido siempre en ratio 1:1.

La cantidad de DBT añadida a cada ensayo ha sido de 500ppm, disuelto en la fase orgánica directamente. En los ensayos con emulsionante se ha añadido 1 gota de Tween 20, esterilizado previamente, mientras que en los ensayos con etanol se añade un volumen tal que su concentración asciende al 5% v/v.

Las condiciones de operación en todos los ensayos fueron 30°C y 250rpm.

**Tabla 5.6.- Rendimientos de desulfuración en BDS bifásica con células en resting cell con Tween 20 y/o etanol y 50% v/v de FFO.**

SOLVENTE ORGÁNICO	X <sub>BDS</sub> (%) 7h	q <sub>p</sub> (mmolHBP/KgCS·h) 3h	Codisolvente o/y Emulsionante
C12	0.00	0.00	-
C14	0.74	12.53	-
C16	2.87	29.06	-
C12	0.00	0.00	Tween 20
C14	0.67	6.68	Tween 20
C16	3.15	23.02	Tween 20
C12	0.00	0.00	5% v/v Etanol
C14	5.22	24.82	5% v/v Etanol
C16	10.04	35.98	5% v/v Etanol
C12	0.00	0.00	Tween 20 + 5% v/v Etanol
C14	3.48	18.84	Tween 20 + 5% v/v Etanol
C16	7.02	42.78	Tween 20 + 5% v/v Etanol

A la vista de los resultados mostrados en la tabla 5.6. se puede observar que el uso de emulsionantes no incrementa de forma apreciable los rendimientos de la BDS, en las condiciones ensayadas.

En cambio, Hou y col, 2005, han reportado que el uso de Tween 80 en reacciones de desulfuración en resting cell incrementa claramente la transferencia de DBT a la interfase, usando una fracción de fase orgánica del 20%.

Por otro lado, en la tabla se observa que el proceso de BDS alcanza la mayor conversión cuando se utiliza hexadecano y etanol, para las condiciones ensayadas.

Algunos autores han determinado que concentraciones de etanol superiores al 1% v/v inciden negativamente tanto sobre el crecimiento celular como sobre el proceso de desulfuración, (Wang y Krawiec, 1996; Yan y col., 2000).

Por ello, la concentración de etanol en todos los ensayos de BDS con células en resting cell realizados en el presente capítulo se ha mantenido por debajo de esa concentración límite.

Debe indicarse que, comparando las tablas 5.3., 5.4. y 5.6., en las que se describen los rendimientos obtenidos en medios de reacción donde el DBT se disolvía en dodecano, tetradecano o hexadecano, sin la adición de emulsionantes o etanol, se observa una cierta pérdida de capacidad desulfurante de las células, pese a que, como se ha indicado anteriormente, durante al menos un mes el tiempo de almacenamiento del stock celular no debería afectar. Esto puede deberse a posibles cambios de temperatura del stock en el área de almacenamiento.

Además, experimentalmente se ha comprobado que especialmente en el caso de *Pseudomonas putida* CECT5279, la capacidad desulfurante se ve afectada de forma notoria por los cambios bruscos de temperatura durante su manipulación.

### Influencia de la Velocidad de Agitación o el uso de Codisolventes

Otra forma eficaz de incrementar las condiciones de mezcla del sistema es cambiar el tipo de agitación, o la velocidad de la misma.

En bibliografía, y a escala de erlenmeyer, el rango de velocidades de agitación empleados en los estudios con células en resting cell, tanto en sistemas acuosos como bifásicos, está entre las 130-150rpm, (Maghsoudi y col., 2000 y 2001; Yoshikawa y col., 2002) y las 300rpm, (Ohshiro y col., 1995, 1996 (A); Abbad-Anadaloussi y col., 2003).

Todos los ensayos fueron realizados en erlenmeyer de 250mL, con 100mL de volumen total de trabajo, siguiéndose el proceso de BDS con 8g/L de *R. erythropolis* IGTS8, en condiciones bifásicas con proporción 1:1 de fases orgánica-acuosa, y 30°C de temperatura.

En los ensayos realizados a distintas velocidades de agitación se utilizó una madre de DBT en hexadecano de 50ppm, mientras que en los ensayos en los que se adicionaba etanol se utilizó una madre de DBT en etanol de 7400ppm, de forma que en el ensayo la concentración DBT era también de 50ppm, y la de etanol fue de 0.7% v/v.

El diseño experimental y los resultados se resumen en la tabla 5.7.

**Tabla 5.7.- Estudio de la mejora de las condiciones de mezcla en la BDS, CT, ensayo control, VA, ensayo velocidad de agitación, CD, ensayo uso de codisolvente.**

ENSAYO	N (rpm)*	C <sub>ALCOHOL</sub> (% v/v)	X <sub>BDS</sub> ** (%)	q <sub>p</sub> *** (mmolHBP/KgCS·h)
CT	250	0.0	22.0	0.60
VA	325	0.0	28.0	2.14
CD	250	0.7	83.6	6.20

\*revoluciones por minuto; \*\*24h de reacción; \*\*\*3h de reacción

A la vista de los resultados presentados en la tabla queda patente que el uso de etanol como codisolvente incide de forma más relevante sobre el rendimiento de la BDS que el incremento de la velocidad de agitación, en el rango ensayado. Por tanto, y teniendo en cuenta que para incrementar la velocidad de transferencia de DBT *R. erythropolis* IGTS8 cuenta con la producción endógena de biosurfactantes, se concluye que incrementar la solubilidad del DBT en la fase acuosa tiene una mayor influencia que mejorar la velocidad de transferencia, en las condiciones de ensayo planteadas.

Concluyendo este apartado de estudios previos, y a la vista de los resultados hasta el momento comentados, se ha decidido que, habitualmente, los estudios con células en resting cell se lleven a cabo usando HEPES ajustado a pH 8 como fase acuosa y hexadecano como solvente orgánico para los ensayos bifásicos. El DBT se disuelve en etanol, evitando que el porcentaje en volumen de alcohol por ensayo supere el 1%, debido a los posibles efectos de toxicidad sobre las células, (Wang y Krawiec, 1996 y Yan y col., 2000).

## 5.2. INFLUENCIA DE LA FRACCIÓN DE FASE ORGÁNICA

Las reacciones de biodegradación microbiana en sistemas bifásicos son normalmente llevadas a cabo en reactores agitados, donde se forma una interfase solvente orgánico-fase acuosa.

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

---

En nuestro estudio, para analizar el efecto de la fase orgánica sobre la BDS en resting cell los ensayos se realizaron en erlenmeyer de 100ml, con células de *Pseudomonas putida* CECT5279 y de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

La obtención del inóculo de ambos microorganismos se realizó en fermentador comercial tipo tanque agitado, como se ha mencionado en los apartados 2.5.2. y 2.5.3

Los erlenmeyer se han agitado en incubadora orbital a 250rpm y 30°C durante 3 horas, transcurridas las cuales se ha parado la reacción y procedido al análisis. Todos los ensayos se han llevado a cabo en régimen discontinuo.

Las concentraciones empleadas de biocatalizador y de sustrato, DBT, han sido 2g/L y 10ppm, respectivamente.

El volumen de reacción ha variado conforme se han ensayado distintas fracciones de fase orgánica. En la tabla siguiente se expresan tanto los volúmenes totales como los volúmenes de fase orgánica empleados. En todos los ensayos el volumen de fase acuosa ha sido 3000µL.

*Tabla 5.8. Volúmenes de ensayo, en el estudio de la influencia de FFO.*

% FFO	Vol. FO (µL)	Vol. Total (µL)
10	334	3334
20	750	3750
30	1300	4300
40	2000	5000
50	3000	6000
75	9000	12000
100	2880	3000

Dependiendo de la forma de preparación de los ensayos, se distinguen dos tipos:

A. **En los que se incrementa el volumen de hexadecano agregado:** en estos ensayos la fase acuosa consta de tampón HEPES, biocatalizador y DBT, introducido disuelto en etanol, para alcanzar una concentración de 10ppm

(54.27 $\mu$ M) en dicha fase. El porcentaje de alcohol en el ensayo no ha superado el 1% v/v.

La fase orgánica se ha preparado añadiendo diferentes volúmenes de hexadecano, de forma que se obtengan fracciones de fase orgánica, (FFO), de entre 10-100%.

Debido a la baja solubilidad del DBT en fase acuosa, todo el DBT añadido en etanol se ha solubilizado en el volumen de C16, por lo que conforme aumenta la FFO, disminuye la concentración de DBT en fase orgánica.

**B. En los que se incrementa el volumen de fase orgánica:** en la segunda tanda de ensayos la fase orgánica consiste en una solución de 54.27  $\mu$ M de DBT disuelto en hexadecano, por lo que la concentración inicial de DBT en fase orgánica es independiente de la FFO. La fase acuosa comprende el tampón HEPES y el biocatalizador, no conteniendo por tanto etanol.

No se ha podido comparar la fracción de 0% v/v de fase orgánica puesto que en condiciones acuosas 10ppm de DBT supera ampliamente el rango de solubilidad, y durante las tres horas de ensayo se encuentra precipitado en el medio, no pudiendo cuantificarse con precisión la conversión del mismo

### RESULTADOS OBTENIDOS

#### Resultados con *P. putida* CECT5279

Las figuras 5.2. y 5.3. muestran la evolución de los compuestos de la BDS y los porcentajes de desulfuración, las velocidades específicas de consumo y las velocidades específicas de producción de HBP, en los dos tipos de ensayos llevados a cabo.

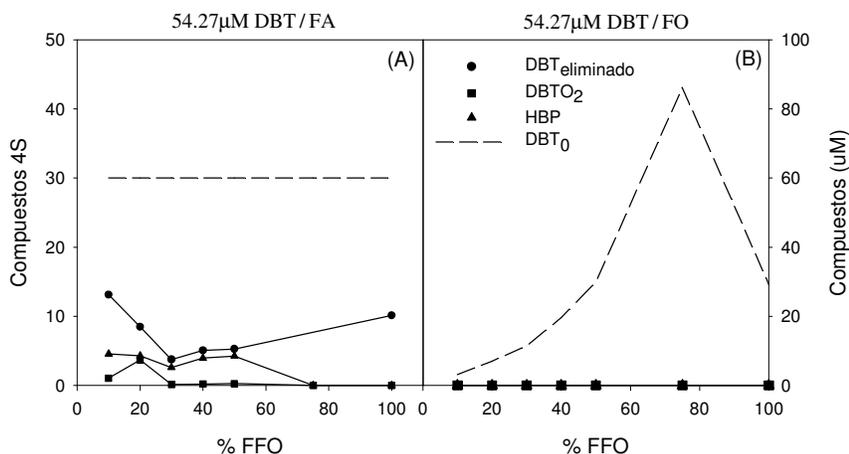


Figura 5.2.- Evolución de los compuestos en la BDS de DBT, con *Pseudomonas putida* CECT5279 y distintas fracciones de fase orgánica (C16). Compuestos en μg.

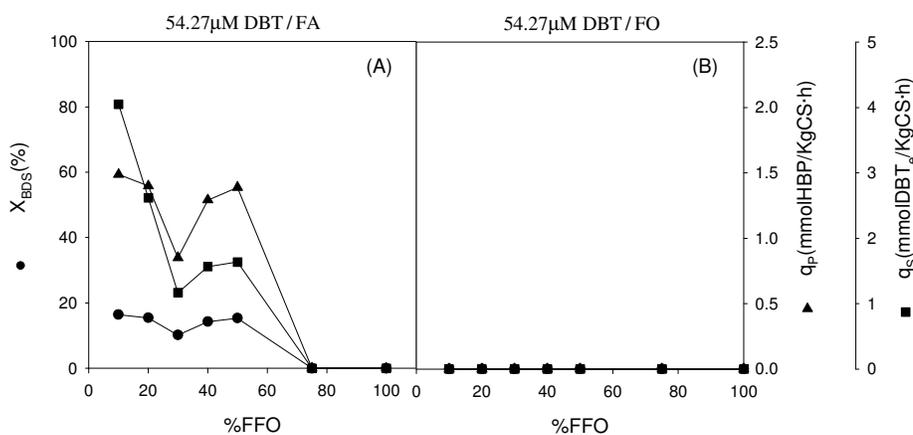


Figura 5.3.- Porcentajes de desulfuración y velocidades específicas de producción y consumo a distintas fracciones de fase orgánica (C16), con *Pseudomonas putida* CECT5279.

Incremento del volumen de hexadecano, C16.

La figura 5.2.A muestra la cantidad remanente en el medio de los distintos compuestos de la ruta de desulfuración 4S a las 3 horas de reacción. En lo relativo a la ruta 4S, en todos los ensayos en los que ha existido conversión se han acumulado pequeñas cantidades de sulfona, (DBTO<sub>2</sub>).

Como se observa en la figura 5.3.A, tanto el porcentaje de desulfuración como la velocidad específica de producción de HBP se mantienen más o menos

constantes hasta fracciones de fase orgánica de 50% de C16 v/v, no produciéndose reacción con fracciones superiores.

En nuestros ensayos, la velocidad específica de consumo de DBT disminuye al aumentar el porcentaje de FFO, desde el principio. Además, el mayor rendimiento de desulfuración y la mayor velocidad específica de producción se obtuvieron con 10% de FFO, y los valores son 17% y 1.41 mmolHBP/KgCS·h, respectivamente.

En un estudio similar, pero con 20g/L de *Pseudomonas delafieldii* R-8, Luo y col., 2003, obtuvieron que sólo por encima del 50% v/v de FFO la velocidad específica de consumo de DBT era menor que cuando no había presencia de fase orgánica, que en ese caso era dodecano. Por otro lado, dicha velocidad descendía considerablemente conforme se incrementaba la FFO, tal y como reflejan nuestros resultados, estabilizándose en valores muy bajos de actividad, dado que la fase acuosa es imprescindible para que se desarrolle actividad enzimática. Según estos autores, la razón por la que la presencia de pequeñas cantidades de solvente incrementa la velocidad de consumo de DBT puede ser la formación de una emulsión donde se incrementa la superficie interfacial.

### *Incremento del volumen de fase orgánica, FO*

En la figura 5.2.B se refleja la cantidad de DBT inicial, que varía según lo hace la FFO, de forma que su concentración permanece constante para todo el rango ensayado.

En los ensayos en los que se incrementa el volumen de fase orgánica, no se produce desulfuración para ninguna fracción de fase orgánica ensayada, (figura 5.3.B). El DBT no se encuentra biodisponible en la fase acuosa en cantidad suficiente como para que la ruta 4S se exprese en *P. putida* CECT5279.

Debe añadirse que resulta sorprendente no haberse observado la expresión de la ruta 4S en ninguna de las FFO ensayadas, si se asume que la cepa de

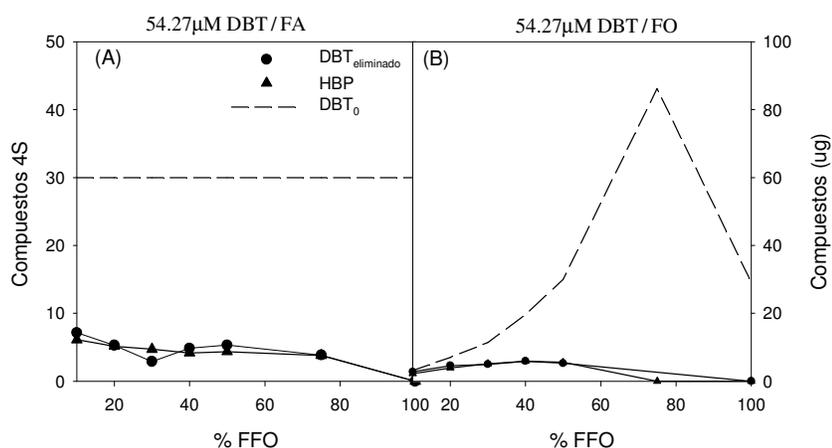
## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

*Pseudomonas putida* CECT5279 es capaz de sintetizar biosurfactantes, como otras cepas análogas, (Noda y col., 2003B y Goubin y col., 2006).

Debemos por tanto asumir que de hacerlo, la concentración de los mismos no es suficiente como para posibilitar que el DBT se encuentre biodisponible en la fase acuosa, y dado que *P. putida* CECT5279 no tiene capacidad de adherirse a los alcanos y en este estudio no se ha añadido etanol como codisolvente, se explica la total ausencia de desulfuración.

### Resultados con *R. erythropolis* IGTS8.

En las figuras 5.4. y 5.5. se muestran los resultados obtenidos en ambos tipos de experimentos con *R. erythropolis* IGTS8.



**Figura 5.4.- Evolución de los compuestos en la BDS de DBT, con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y distintas fracciones de fase orgánica (C16). Compuestos en µg.**

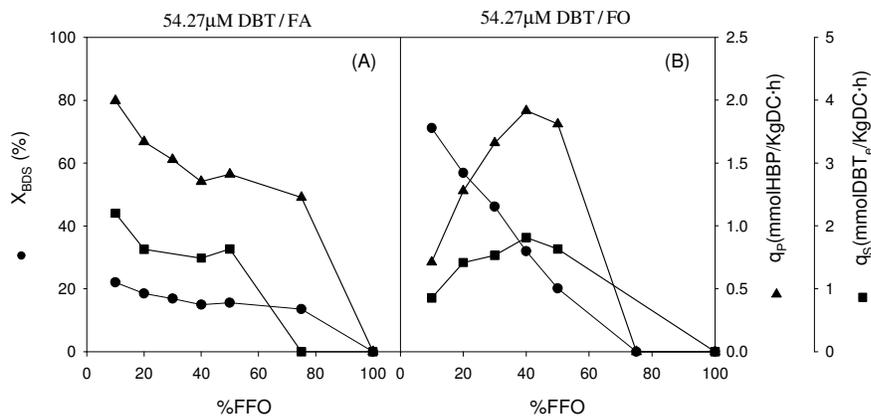


Figura 5.5.- Porcentajes de desulfuración y velocidades específicas de producción y consumo a distintas fracciones de fase orgánica (C16), con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

#### Incremento del volumen de hexadecano, C16.

En las figuras 5.4.A y 5.5.A puede observarse la cantidad de compuestos remanentes en el medio a las 3 horas de reacción de BDS, así como los porcentajes de desulfuración y velocidades específicas de producción y consumo para cada una de las FFO ensayadas, respectivamente.

Debe señalarse que no se observa acumulación de intermedios de la ruta 4S, coincidiendo los moles totales de DBT eliminado y los de HBP producido.

En el estudio del incremento del volumen de C16 añadido, (figura 5.5.A), se observa la disminución continua, aunque poco acusada, tanto del porcentaje de desulfuración como de la velocidad específica de producción de HBP y la de consumo de DBT, conforme aumenta el volumen de C16, y se observa el descenso brusco de los rendimientos para fracciones superiores al 75% v/v.

Así mismo, Jia y col., 2006, reportan que la velocidad específica de consumo de DBT disminuye cuando la FFO varía de 15 a 25% v/v, para la misma concentración inicial de DBT y densidad celular.

De nuevo, y en referencia a los resultados mostrados en la figura 5.5. A, es con 10% v/v de FFO donde se obtiene el porcentaje más alto de desulfuración,

21%, y el mayor valor de velocidad de producción específica de HBP, con un valor de 1.99 mmolHBP/KgCS·h.

En cambio, Maghsoudi y col., 2001, observan que la velocidad de producción específica de HBP con 75% de fracción de fase orgánica, (FFO) es aproximadamente 2.5 veces superior a la determinada con 25% FFO, con una densidad celular de 40g/L de *Rhodococcus* sp. P32C1 y hexadecano como solvente orgánico.

Tal y como han observado otros autores, en nuestros experimentos existe desulfuración hasta que se ensaya una FFO del 75% v/v, mientras que en el ensayo con 100 % no llega a expresarse la ruta, en el tiempo de reacción evaluado.

Estudios similares como los de Abbad-Andaloussi, 2003, muestran que, para un amplio espectro de cepas desulfurantes pertenecientes al género *Gordonia*, con 2g/L de biomasa, 50ppm de DBT y FFO de entre 50 y 99% v/v de hexadecano, la actividad de consumo de DBT y de producción de HBP disminuye progresivamente según se incrementa el porcentaje de FFO, no habiendo actividad con 99%. Además, determinan que la velocidad de consumo de DBT se ve más afectada por la FFO que la de producción de HBP, y que hasta el 95% de C16 existe actividad.

Sin embargo, y comparando con condiciones acuosas, con la fracción del 50% v/v observaban velocidades específicas de producción de HBP superiores, indicando que podía deberse a una mayor disponibilidad en este caso del DBT y a un incremento de la transferencia de oxígeno, pero también a la reducción de los efectos de inhibición causados por la acumulación de HBP en la fase acuosa ante la presencia de hexadecano.

Esta última conclusión fue adoptada también previamente por Ohshiro y col., 1995, y Patel y col., 1997 en sus estudios sobre *Rhodococcus* sp. Sus resultados revelaron que existe una extracción del HBP de la fase acuosa a la orgánica, potente inhibidor de la actividad de degradación de DBT.

### *Incremento del volumen de fase orgánica, FO.*

De nuevo la situación de los compuestos de la ruta 4S y los rendimientos de la BDS a las 3 horas de reacción se muestran en las figuras 5.4.B y 5.5.B.

Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, no se observa acumulación alguna de compuestos intermedios de la ruta 4S.

En lo relativo al incremento del volumen de fase orgánica, el porcentaje de desulfuración disminuye notoriamente conforme aumenta la FFO, dado a que cada vez hay mayor cantidad de DBT para la misma concentración de biocatalizador. Mientras tanto, la velocidad específica de producción aumenta hasta alcanzar un valor máximo en la fracción del 40%, con 1.92 mmolHBP/KgCS·h, y luego se anula, con la fracción de 75% v/v. La velocidad específica de consumo de DBT también aumenta hasta el 40% FFO, y luego disminuye bruscamente.

Dada la capacidad de *Rhodococci* de adherirse fuertemente a los solventes orgánicos, capturando los compuestos orgánicos en ellos disueltos, parece que el aumento observado en las velocidades de la figura 5.5.B podría explicarse por la creación de mayor superficie interfacial en las emulsiones. El descenso a partir de la fracción del 50% podría coincidir con el cambio de las propiedades de la emulsión, que resulta en la formación de gotas acuosas en vez de orgánicas, disminuyéndose el contacto entre las células y las gotas de hexadecano. Además, puede que los efectos tóxicos debidos a la presencia del solvente inhiban fuertemente la actividad de desulfuración a esas elevadas FFO.

Como en los ensayos anteriores, es en la fracción de 10% donde se observa el mayor valor de rendimiento de desulfuración alcanzado, 75 %, y a partir del ensayo de 75% v/v FFO no se observa conversión alguna. Del mismo modo, Ohshiro y col., 1996, observaron que la actividad desulfurante de *R. erythropolis* H-2 se inhibe fuertemente a FFO superiores al 80% v/v.

Observando las figuras 5.5.A y B se observa claramente que la tendencia a disminuir de los porcentajes de desulfuración,  $X_{BDS}$ , es mucho más acusada cuando la concentración de DBT se mantiene constante en todo el rango de FFO ensayadas. Sin embargo, la brusca variación del porcentaje de desulfuración puede no deberse exclusivamente al aumento de FFO, dado que en este caso al aumentar la proporción de fase orgánica aumenta la cantidad de DBT presente, mientras que la concentración de biocatalizador es siempre la misma. Para evitar ese efecto en la serie de ensayos anterior, al mantenerse constante la cantidad de DBT se puede apreciar mejor el efecto aislado del aumento de FFO.

Como conclusión general, y comparando el comportamiento de los dos microorganismos frente a la presencia de fase orgánica, queda demostrado que dicha variable afecta mucho más a *P. putida* CECT5279 que a *R. erythropolis* IGTS8.

En la misma línea de conclusiones Abbad-Andaloussi y col., 2003, reportan que la inserción de los genes *dsz* en cepas de *Pseudomonas* incrementa la velocidad de desulfuración, pero que la hidrofobicidad de las células de *Rhodococcus* es más conveniente dada su mayor capacidad de capturar compuestos disueltos en la fase orgánica.

### 5.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DBT

Tal y como se ha demostrado en el capítulo 4, la concentración de sustrato es una variable fundamental, también en las reacciones de BDS llevadas a cabo con células en resting cell, (Luo y col., 2003).

Para estudiar el efecto de la concentración de DBT sobre la BDS con células en resting cell, y una vez se ha obtenido el inóculo, (apartados 2.5.2 y 2.5.3), se han realizado ensayos en erlenmeyer de 100ml, tanto en condiciones acuosas, con 3ml de volumen total de trabajo, como bifásicas, con 6ml. Los ensayos bifásicos se han realizado con una proporción HEPES-C16 1:1.

En todos los ensayos, la concentración de biomasa ha sido siempre de 2g/L en fase acuosa, y las condiciones de operación, 250rpm y 30°C.

En la siguiente figura se muestran los porcentajes de desulfuración y velocidades de producción específica obtenidos, para 24 y 3h de reacción respectivamente, con A) *Pseudomonas putida* CECT5279 y B) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, tanto en sistemas acuosos como bifásicos.

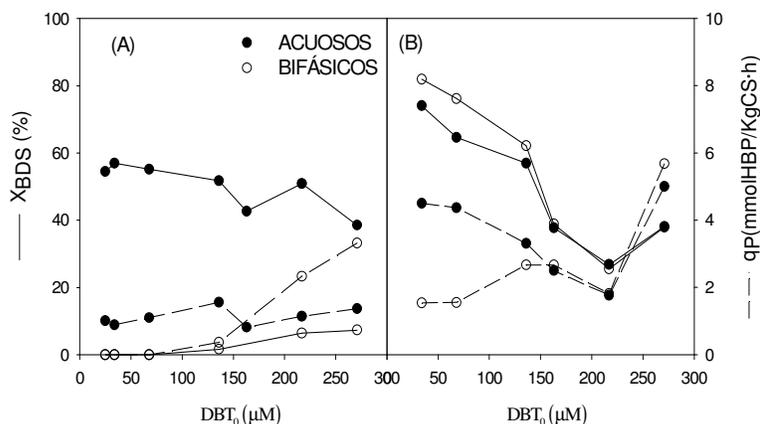


Figura 5.6.- Porcentajes de desulfuración,  $X_{BDS}$ , y velocidades específicas de producción de HBP,  $q_P$ , frente a la concentración inicial de DBT.

A la vista de los resultados presentados en la gráfica 5.7, lo primero que cabe destacar es la diferencia del comportamiento en la BDS de un microorganismo y otro.

#### Resultados con *Pseudomonas putida* CECT5279

En condiciones acuosas se observa que los porcentajes de desulfuración disminuyen ligeramente conforme aumenta la concentración de DBT, entre valores de concentración de 25 y 271  $\mu\text{M}$ .

Las velocidades específicas de producción de HBP, ( $q_P$ ) se mantienen estables, no observándose prácticamente diferencias para un rango tan amplio de concentraciones iniciales.

Dado que en medios acuosos el límite de solubilidad del DBT es de  $5\mu\text{M}$ , (Maghsoudi y col., 2001), y todos nuestros ensayos tienen concentraciones superiores, en los casos en que la reacción se lleva a cabo en un sistema acuoso el DBT se encuentra precipitado, y la  $q_p$  no se incrementa con el aumento de concentración del mismo.

Por otro lado, en sistemas acuosos se ha descrito ampliamente la inhibición de la ruta 4S por la acumulación de HBP, (Ohshiro y col., 1996A y B; Maxwell y col., 2000; Watkins y col., 2003), lo cual se traduce en la estabilidad de  $q_p$  frente a la concentración de DBT. La acumulación de sulfato también podría reprimir la producción de las enzimas Dsz, (Kilbane, 1990), si bien hay autores que han reportado que la acumulación de sulfato no afecta a la expresión de la ruta de BDS, (Kaufman y col., 1997).

Para el caso de los ensayos en condiciones bifásicas, cuando la bioconversión se produce con una proporción fase orgánica-acuosa 1:1 aumenta sustancialmente el porcentaje de desulfuración al incrementarse el valor de DBT inicial. De hecho, no se produce conversión alguna en 24h de reacción hasta que no se ensayan concentraciones de DBT inicial superiores a  $136\mu\text{M}$ .

Del mismo modo que el porcentaje de desulfuración, la  $q_p$  aumenta de forma significativa conforme se incrementa la concentración de DBT en los ensayos bifásicos.

Luo y col., 2003, también alcanzaron resultados similares evaluando el patrón del proceso de BDS en resting cell con 50% v/v de dodecano y 20g/L de *Pseudomonas delafieldii* R-8, indicando que la velocidad y cantidad de desulfuración depende estrechamente de la concentración de DBT, no observando inhibición de la ruta incluso con concentraciones de sustrato de 14mM de DBT.

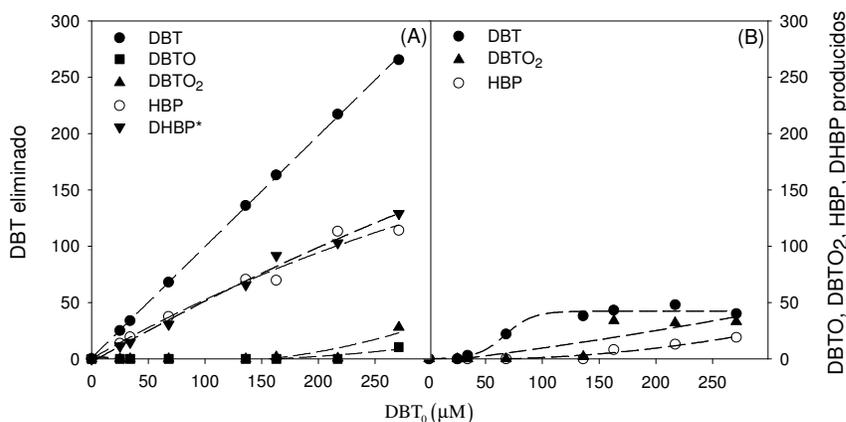
La significativa diferencia entre la evolución de la BDS en un sistema acuoso y otro bifásico con células de *P. putida* CECT5279 podría explicarse teniendo en cuenta que el DBT es un compuesto muy hidrofóbico, y que

*Pseudomonas* sp. no tiene capacidad de adherirse fuertemente a los medios orgánicos (Monticello, 2000; Abbad-Andaloussi y col., 2003).

Dado que la BDS es una conversión enzimática que tiene lugar en el interior celular, (Oda y Ohta, 1994; Monticello, 2000; Abbad-Andaloussi y col., 2003), sólo reaccionan efectivamente aquellas moléculas de DBT que por gradiente de concentración se disuelven en la fase acuosa, traspasando la membrana celular.

La figura 5.7. muestra la acumulación de metabolitos de la ruta de desulfuración 4S a las 24 horas de bioconversión, conforme se incrementa la concentración de DBT.

En los ensayos acuosos existe acumulación de productos intermedios de la desulfuración, que no aparecen en ensayos en bifásico, o que lo hacen en cantidades despreciables, (Yang y Marison, 2005).



\*: estimado

**Figura 5.7.- Evolución de los compuestos durante la BDS en sistemas A) acuosos y B) bifásicos, con *Pseudomonas putida* CECT5279. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

Además, como se aprecia en la figura 5.7A, la suma de compuestos de la ruta 4S no coincide con la concentración de DBT desaparecido. Existen varias explicaciones para este déficit.

En primer lugar, y como ya se ha indicado con anterioridad, la solubilidad del DBT en agua es del orden de 5  $\mu\text{M}$ , aunque puede aumentar por la acción de los surfactantes producidos por las células. Por tanto, es muy posible que en todo el tiempo ensayado queden cristales sólidos de DBT no disueltos en el medio. De hecho, Jia y col., 2006, utilizan concentraciones de DBT menores a 1 ppm, (5.4  $\mu\text{M}$ ), para disminuir la turbidez formada por los cristales de DBT.

También existe un posible error en la toma de muestra, dado que el DBT, al ser un compuesto muy hidrofóbico, es muy difícil de extraer de la superficie celular o de la cara interna de los tubos de muestreo, (Honda y col., 1998). Para disminuir este problema, en todos los tubos eppendorf donde se recogen muestras de ensayos en medios acuosos se adiciona previamente el mismo volumen de acetonitrilo que el volumen que va a ser añadido de muestra.

Otro de los compuestos que debiera aparecer en el medio de reacción es el HBPSi, especialmente teniendo en cuenta que se ha determinado que la conversión del sulfinato es el paso limitante de la ruta 4S, (Gray y col., 1996).

Sin embargo, en ningún caso hemos determinado en nuestros ensayos concentraciones de HBPSi significativas en el medio de BDS. Del mismo modo, Abbad-Andaloussi y col., 2003, no detectan HBPSi en el medio de reacción de la BDS, ni por Cromatografía de Gases ni por HPLC, e indican que esta ausencia del mismo se debe a un problema de selectividad analítica, dado a que su tiempo de retención es muy cercano al del HBP, y a que la concentración ha de ser muy pequeña y cercana al límite de detección.

Por otro lado, en el interior celular se acumulan compuestos. En algunos ensayos se han sonificado las células y se ha observado que el porcentaje de compuestos acumulados intracelularmente asciende a un 13% p/v, con respecto al total. De ese porcentaje, los compuestos que más abundan son el HBP y otro compuesto no identificado, que pensamos es el DHBP.

Gallagher y col., 1993, reportan que *R. rhodochrous* IGTS8 sigue rutas de desulfuración distintas dependiendo de si se encuentra en condiciones de

crecimiento o parada de crecimiento. En parada, la desulfuración de DBT implica la formación única de HBP, como único compuesto final libre de azufre, mientras que en crecimiento la ruta deriva a la formación de DHBP.

En nuestros ensayos, el medio en que la BDS se desarrolla con células en resting cell incluye glicerol, dado que éste se utiliza para la conservación del inóculo. Con esta fuente de carbono, si bien no puede incrementarse la biomasa debido a la ausencia de otras fuentes nutricionales necesarias, sí puede existir cierta actividad propia de la replicación celular, desarrollándose los dos caminos posibles de la ruta 4S. En el medio extracelular no se han detectado concentraciones significativas de DHBP, por lo que se supone puede haberse formado y acumulado en el interior celular, o haberse adherido a la membrana de las células.

En condiciones bifásicas, al DBT y HBP se une la acumulación de sulfona, DBTO<sub>2</sub>. La acumulación de DBTO<sub>2</sub> y la producción de HBP coinciden con el DBT eliminado, cerrándose el balance de materia.

Además se han sonicado células procedentes de ensayos bifásicos de BDS en condiciones de resting cell, y se ha observado que en el interior celular el porcentaje de compuestos almacenados es tres veces inferior que en el caso de hacer el mismo ensayo en condiciones acuosas. Los compuestos almacenados son esencialmente DBT y DBTO<sub>2</sub>, siendo las concentraciones poco importantes, no acumulándose prácticamente HBP ni DHBP.

### Resultados con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8:

Con *R. erythropolis* IGTS8, los porcentajes de desulfuración en ensayos acuosos y bifásicos varían de forma similar al incrementar la concentración de DBT.

*Rhodococcus* sp., como ya se ha mencionado con anterioridad, tiene una afinidad natural muy elevada por los medios orgánicos, y en especial por el

hexadecano, de forma que se crea un fuerte enlace entre su membrana y la interfase del medio orgánico-acuoso, (Setti, L. y col., 1997).

Le Borgne y Quintero, 2003, han reportado que la reacción de BDS en condiciones bifásicas se produce en la interfase solvente orgánico-fase acuosa.

Como se observa en la figura 5.6.B, los porcentajes de desulfuración, tanto en acuoso como en bifásico, disminuyen al incrementarse el valor inicial de concentración de DBT.

Como ya se ha mencionado, manteniendo constante la concentración de biocatalizador, el aumento de concentración de DBT implica la disminución de la conversión en el proceso de BDS.

En literatura no se han encontrado estudios en los que se describa la inhibición por sustrato para sistemas de BDS de DBT con células en resting cell. La disminución de la conversión por tanto puede estar relacionada con la acumulación de HBP, si bien, como se ha mencionado en el apartado anterior, la inhibición por producto no se observa claramente en medios bifásicos dada la afinidad del HBP por el solvente orgánico, (Kobayashi y col., 2001; Yang y Marison, 2005), y a pH neutro.

En este sentido, Yang y Marison, 2005, han confirmado la presencia de metabolitos inhibidores en la fase acuosa de sistemas en bifásicos, descartando que la inhibición de la BDS se deba a la acumulación del sulfato.

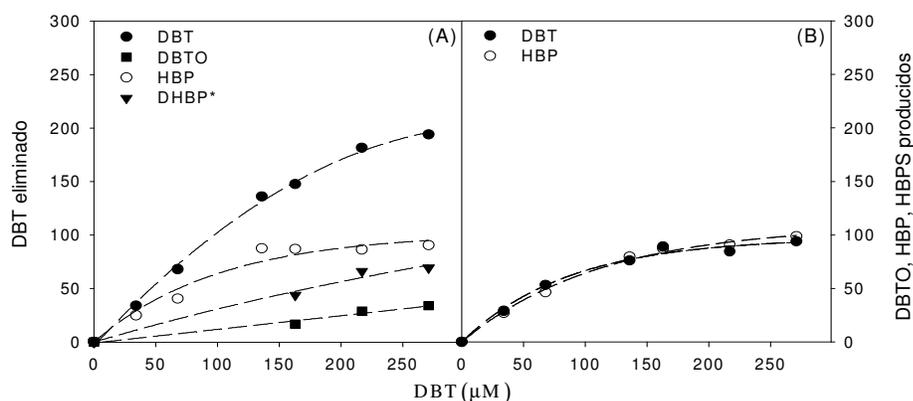
En lo relativo a los valores obtenidos de  $q_p$ , sólo se observan diferencias en las velocidades de producción específicas de HBP previas a los  $163\mu\text{M}$ . En los ensayos acuosos la producción de HBP se mantiene prácticamente constante según se incrementa la concentración de DBT, debido a que la mayor parte del DBT se encuentra precipitado y a que el HBP es un potente inhibidor de la ruta.

En cambio, y dado que en sistemas bifásicos el efecto de inhibición por acumulación de HBP es menor, el incremento de la concentración inicial de DBT se traduce en el aumento progresivo de los valores de  $q_p$ .

En la misma línea de conclusiones, Maghsoudi y col., 2001 han verificado que con 24mM de DBT se obtiene mayor velocidad de producción de HBP que con 1mM, con 50% de C16 y 20g/L de *Rhodococcus* sp., pero la conversión máxima de DBT es 4 veces menor.

Los estudios de Jia y col., 2006, han determinado que, con 20g/L de células de *Gordonia* sp. WQ-01 en resting cell y 20% v/v de dodecano, la velocidad de biodegradación de DBT disminuye conforme aumenta la concentración inicial del mismo en el ensayo.

Al igual que en la figura 5.7, en la figura 5.8. pueden observarse los productos de la BDS tras 24 horas de reacción con células de *R. erythropolis* IGTS8 en resting cell.



\*: estimado

**Figura 5.8.- Evolución de los compuestos durante la BDS en sistemas A) acuosos y B) bifásicos, con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

Tal y como se ha descrito en el caso anterior, en los ensayos acuosos de nuevo hay acumulación de productos intermedios, que no aparecen en ensayos en medios bifásico. Además, el balance de materia en medios acuosos nunca se cierra, (figura 5.8.A), por los motivos explicados en el apartado anterior.

Comparando los resultados obtenidos con ambos tipos de biocatalizadores se deduce que, si bien en condiciones acuosas los comportamientos son muy similares, en presencia de una segunda fase orgánica no miscible la hidrofobicidad de *R. erythropolis* IGTS8 le convierte en un biocatalizador más eficaz, ya que puede acceder al DBT directamente de la interfase.

Por otro lado se representa en la figura 5.9. la velocidad específica de consumo de DBT,  $q_s$ , frente a la concentración inicial del mismo, en condiciones acuosas y bifásicas, con ambos microorganismos.

En el caso de *Pseudomonas*, en condiciones acuosas y para el rango de concentraciones de DBT ensayadas, la velocidad específica de consumo es proporcional a la concentración de DBT inicial en el ensayo.

Para el caso de *R. erythropolis* IGTS8 se observa también que  $q_s$  es proporcional al aumento de concentración de DBT, con una ligera tendencia a la estabilización en los valores más altos de concentración de DBT ensayados.

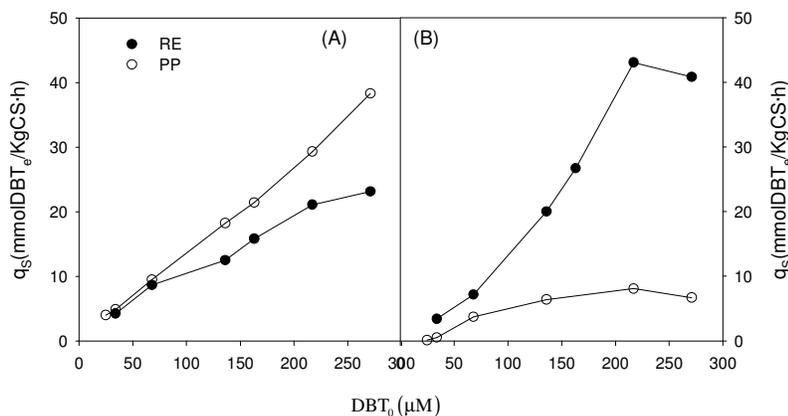


Figura 5.9.- Velocidades de consumo de DBT, (3h de reacción). 2g/L de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 o *Pseudomonas putida* CECT5279, (A) ensayos acuosos, (B) bifásicos.

En condiciones acuosas, Jia y col., 2006, han determinado que a muy bajas concentraciones de DBT, (para evitar la formación de cristales sólidos), la velocidad específica de consumo de DBT es mayor a mayor concentración del

mismo, eliminándose todo el sustrato más tarde cuanto más concentración inicial hay en el ensayo.

En condiciones bifásicas los comportamientos seguidos por ambos biocatalizadores son muy distintos. En el caso de *P. putida* CECT5279 se alcanzan pequeñas velocidades específicas de consumo, que además se mantienen prácticamente constantes en gran parte del rango de concentraciones ensayadas, debido a los problemas de difusión de DBT a la fase acuosa.

Con *R. erythropolis* IGTS8, en condiciones bifásicas, la velocidad específica de consumo aumenta conforme aumenta el DBT inicial añadido, hasta que se utiliza una concentración inicial de DBT de 217 $\mu$ M, a partir de la cual se estabilizan los valores.

### Estudio de BDS con compuestos intermedios de la ruta 4S como sustratos

Dado que para determinar la actividad desulfurante es necesario cuantificar la velocidad específica de producción de HBP, producto final de la ruta metabólica 4S carente de azufre, se ha considerado oportuno realizar un estudio que indique los valores de actividad enzimática de desulfuración alcanzados por *Pseudomonas putida* CECT5279 y *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 sobre los distintos sustratos que intervienen en la ruta, a un tiempo relativamente corto de reacción, y en condiciones de resting cell. Con estos estudios se puede corroborar que la acumulación de compuestos intermedios de la ruta 4S en medios acuosos se debe a las bajas velocidades enzimáticas de conversión de estos compuestos.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en condiciones acuosas, en erlenmeyer de 50mL con 3mL de fase acuosa consistente en tampón HEPES 12g/L, 1.5g/L de biocatalizador, (obtenido como se ha descrito en los apartados 2.5.2 y 2.5.3), y 25 $\mu$ M de sustrato disuelto en etanol. El porcentaje de etanol no superó el 1% v/v. Los medios inoculados se agitaron en incubadora orbital durante 30 minutos, a 250rpm y 30°C. Trascurrido ese tiempo se pararon las reacciones y se procedió al análisis.

Como ya se ha indicado anteriormente, la ruta 4S es una ruta metabólica de 4 pasos enzimáticos. Los sustratos de cada uno de los pasos sucesivos son DBT, DBT-sulfóxido, (DBTO), DBT-sulfona, (DBTO<sub>2</sub>) y 2-hidroxibifenil 2-sulfinato (HBPSi).

La figura 5.10. muestra los valores de velocidad específica de producción de HBP, ( $q_p$ ), obtenidos por ambos microorganismos, y sobre los distintos sustratos.

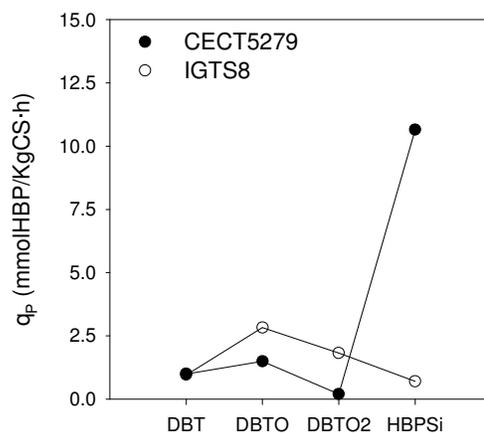


Figura 5.10.- Velocidad específica de producción de HBP a los 30 minutos de reacción.

Como puede observarse, existen ciertas diferencias entre ambos microorganismos, en lo relativo a las actividades específicas de desulfuración alcanzadas sobre los distintos sustratos de la ruta 4S, debido a que la enzima dszD, (responsable de la oxidoreducción del sistema NADH:FMN), de *P. putida* CECT5279 procede de *Escherichia coli* y no de *R. erythropolis* IGTS8, (Alcón y col., 2005).

En el caso de realizar la desulfuración sobre DBT se alcanza por ambos microorganismos el mismo valor de  $q_p$ . Además con todos los sustratos, salvo con DBTO<sub>2</sub> en el caso de *P. putida* CECT5279 y HBPSi, con *R. erythropolis* IGTS8, la  $q_p$  es mayor a la que se alcanza cuando se utiliza DBT.

Cuando se analizan las actividades específicas de desulfuración sobre DBTO se aprecia que *R. erythropolis* IGTS8 alcanza el doble de actividad que *P. putida* CECT5279, y 9 veces más cuando lo hace sobre DBTO<sub>2</sub>.

Con estos resultados se justifica que en el caso de *P. putida* CECT5279 se acumule DBTO<sub>2</sub> en los medios de reacción de BDS con células en resting cell.

Por otro lado, y a pesar de que en las reacciones de BDS con células en resting cell de *R. erythropolis* IGTS8 no se ha detectado sulfona en el medio extracelular, Setti y col., 1999, confirmaron que el DBTO<sub>2</sub> es un intermediario de la ruta de degradación del DBT por *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, puesto que puede asimilarlo como fuente única de azufre.

Por último, cuando el sustrato es el HBPSi, con *P. putida* CECT5279 se alcanzan valores de  $q_p$  15 veces superiores a los observados con *R. erythropolis* IGTS8.

### 5.4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA

La concentración de biocatalizador es otra de las variables frecuentemente evaluada en los estudios de BDS con células en resting cell, (Finnerty, 1993; Maghsoudi y col., 2001; Luo y col., 2003; Jia y col., 2006).

Para estudiar el efecto de la concentración de biocatalizador, tras obtener el inóculo como se ha descrito en los apartados 2.5.2 y 2.5.3, se han realizado ensayos en erlenmeyer de 100ml, con 3ml de volumen de trabajo cuando el medio era acuoso y 6ml, cuando era bifásico. Los ensayos en medio bifásico se han realizado con una proporción HEPES-C16 1:1.

En todos los ensayos la concentración de DBT inicial ha sido de 271μM, disuelto en etanol. El porcentaje de alcohol en la fase acuosa ha sido siempre un 0.7% v/v. Las condiciones de operación en todos los experimentos han sido 250rpm y 30°C.

En la figura 5.11. se muestran los porcentajes de desulfuración y velocidades de producción específica obtenidos, para 24 y 3h de reacción respectivamente, con **A) *Pseudomonas putida* CECT5279** y **B) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8**.

Lo primero que deber ser considerado, a la hora de analizar este tipo de experimentos es que el incremento en la concentración de biocatalizador supone la alteración de las condiciones del medio de reacción, en términos de viscosidad, concentración de biosurfactantes, etc.

Por otro lado, al aumentar la concentración inicial de biomasa la fase acuosa pasa de estar constituida por un tampón e inóculo disuelto, a ser prácticamente inóculo, y dado que éste se encuentra suspendido en una solución cloruro sódico-glicerol al 50%, a mayor concentración de biomasa mayor concentración de glicerol en el ensayo.

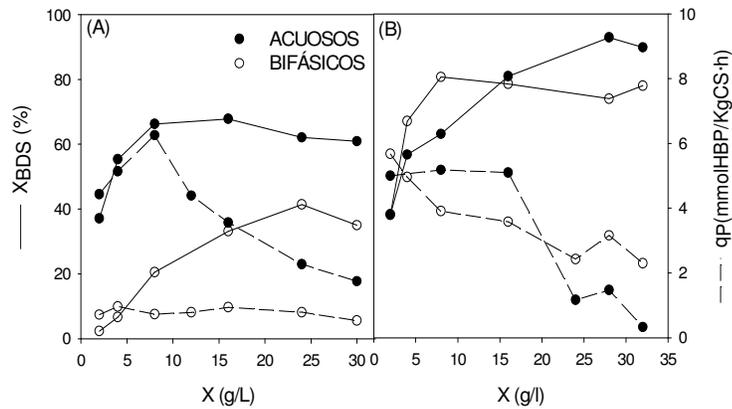


Figura 5.11.- Porcentajes de desulfuración,  $X_{BDS}$ , y velocidades de producción específica,  $q_p$ , frente a la concentración inicial de biocatalizador,  $X$ .

En ambos casos, (A y B), el incremento de la concentración de biocatalizador supone un incremento significativo en los porcentajes de desulfuración hasta que se alcanza una concentración de biocatalizador con la que los valores de conversión se estabilizan.

#### Resultados con *Pseudomonas putida* CECT5279

Como ya se ha demostrado anteriormente, al no tener capacidad *P. putida* CECT5279 de formar una biopelícula con el alcano, los rendimientos obtenidos en ensayos acuosos y bifásicos son muy diferentes.

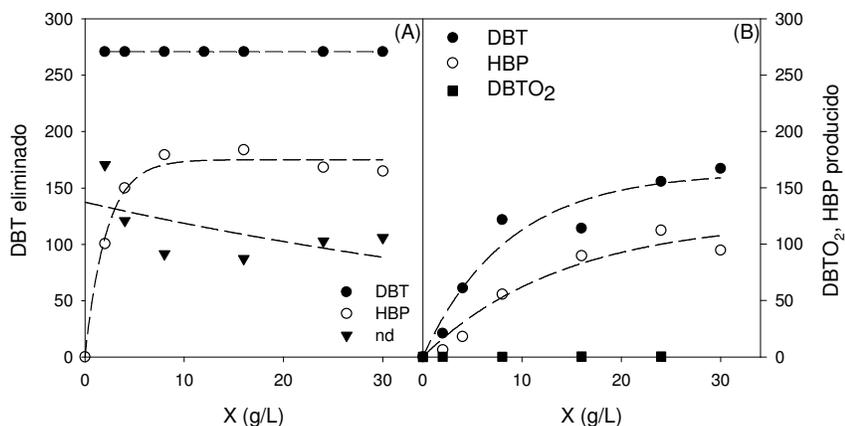
En los acuosos, el porcentaje de desulfuración aumenta hasta que se utiliza 8g/L de concentración de biocatalizador. Posteriormente se estabiliza para todo el rango ensayado, en un valor del 70%, aproximadamente. La velocidad de producción específica de HBP tiene la misma tendencia, aumentando hasta alcanzar 6.3 mmolHBP/KgCS·h, con 8g/L de biomasa, y disminuyendo luego según aumenta la concentración de biocatalizador.

En los ensayos bifásicos, al no capturar el DBT de la interfase, a mayor concentración de biocatalizador se obtiene mayor porcentaje de desulfuración, probablemente debido a una mayor transferencia de DBT entre las fases, y, asumiendo que *P. putida* CECT5279 produzca de forma endógena biosurfactantes, a una mayor concentración en el medio de los mismos. La velocidad de producción específica de HBP por tanto se mantiene constante a lo largo de todo el rango de concentraciones de biocatalizador ensayadas.

Otros estudios similares encontrados en bibliografía, como los de Luo y col., 2003, reportan que la velocidad específica de desulfuración de *Pseudomonas delafieldii* R-8 se incrementa significativamente cuando se incrementa tanto la concentración de sustrato como la de biocatalizador en el ensayo.

De la misma forma que en el estudio anterior, 5.3., la figura 5.12. muestra la concentración de compuestos remanentes en el medio de reacción, a las 24 horas de bioconversión, en condiciones acuosas y bifásicas.

En los ensayos en condiciones acuosas (A), *P. putida* CECT5279 es capaz de eliminar todo el DBT que se disuelve, no observándose la acumulación de ningún intermedio, si bien, como se ha descrito anteriormente, el balance de materia no se cierra, y por tanto consideramos que las cantidades que faltan son principalmente HBP y DHBP, acumulados en el interior celular, y DBT no soluble, precipitado en forma de micro-cristales sólidos.



nd: concentración de compuestos no detectados

**Figura 5.12.- Compuestos de la ruta 4S en el medio A) acuoso y B) bifásico, a las 24 horas de reacción. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

En cambio, en condiciones bifásicas (B) a las 24 horas de reacción hay aún una elevada concentración de DBT sin degradar, y se observan muy pequeñas concentraciones de sulfona. El aumento en la concentración de biocatalizador incrementa la degradación de DBT, estabilizándose a elevadas densidades celulares. La producción de HBP sigue la misma tendencia.

### Resultados con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

En la figura 5.11B, se muestran los valores de porcentajes de desulfuración ( $X_{\text{BDS}}$ ) y las velocidades específicas de producción de HBP ( $q_p$ ) obtenidos con *R. erythropolis* IGTS8, a las 24 y 3 horas de reacción, respectivamente.

En los ensayos acuosos, como puede observarse, el incremento en la concentración de biocatalizador ha supuesto mayores porcentajes de desulfuración, hasta prácticamente el final del rango de concentraciones ensayado, si bien el incremento es más acusado con concentraciones pequeñas de biomasa. A partir de utilizar concentraciones de biocatalizador de 25g/L, el rendimiento ha alcanzado prácticamente la desulfuración total de los 271  $\mu\text{M}$  de DBT introducido en los ensayos

Los valores de velocidades específicas de producción de HBP a 3 horas de reacción se mantienen constantes en el rango de concentraciones de 2 a 16g/L,

para presentar después una disminución muy acusada, a concentraciones superiores. La relación de concentraciones DBT/biocatalizador y el cambio de las propiedades del medio cuando la fase acuosa pasa a ser prácticamente biocatalizador podrían provocar el descenso del rendimiento en la bioconversión, aunque la inhibición por la acumulación de HBP en el medio podría ser la principal causa del descenso en las velocidades.

En los ensayos bifásicos, los porcentajes de desulfuración aumentan considerablemente cuando se emplea de 2 a 8g/L de concentración de catalizador, para estabilizarse a partir de ahí en un rendimiento del 80% aproximadamente, lo que se puede explicar suponiendo que la interfase está saturada de células de biocatalizador. Con estas condiciones experimentales existen problemas de transferencia de materia, (Maghsoudi y col., 2001), y por tanto, utilizar mayores concentraciones de biocatalizador no implica que se conviertan más moléculas de DBT. Por otro lado, incrementando la superficie interfacial se obtendrían mayores niveles de conversión.

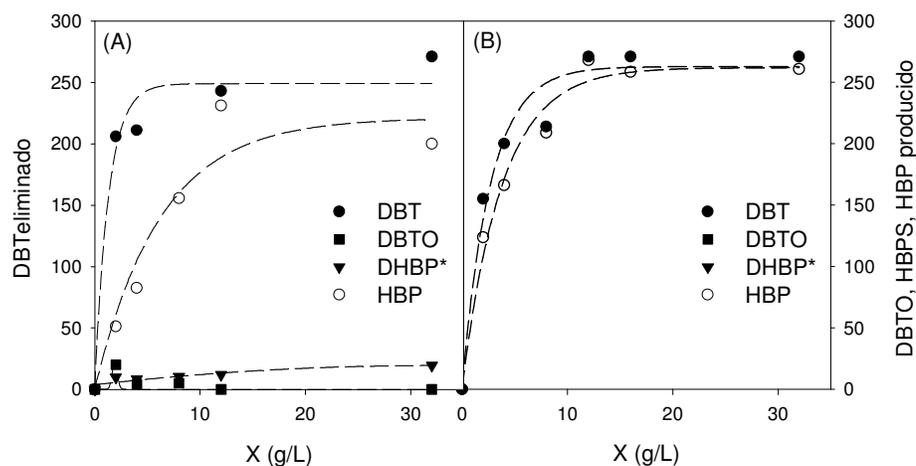
En cuanto a las velocidades específicas de producción,  $q_p$ , los valores alcanzados disminuyen conforme se incrementa la concentración de biomasa, dado que la interfase se satura de células de biocatalizador y hay problemas de transferencia.

Nuestros resultados han sido observados con anterioridad por Maghsoudi y col., 2001, quienes determinan que en resting cell con 50% v/v de C16, las velocidades de producción de HBP específicas a mayores densidades celulares eran inferiores, probablemente debido a limitaciones en la transferencia, especialmente del oxígeno requerido para la oxidación de DBT, mientras que las conversiones máximas de DBT eran mayores.

Ha de indicarse además que de nuevo, los rendimientos y las actividades obtenidas en estos ensayos en medios bifásicos no difieren excesivamente de lo alcanzado en condiciones acuosas, al contrario de lo que se describía en el caso de utilizar *P. putida* CECT5279 como biocatalizador. Como se ha descrito hasta ahora, la capacidad de *Rhodococcus* sp. de adherirse a los alcanos permite que en

experimentos bifásicos el DBT sea capturado de la interfase, y de ahí que se obtengan resultados similares con ambos tipos de medios.

En relación con el balance de materia, si bien de nuevo en condiciones acuosas no se cierra completamente, la concentración de compuestos que falta es muy inferior a la que se observaba con *P. putida* CECT5279. En medios bifásicos, tan sólo se observa DBT y HBP, que se produce estequiométricamente en todo el rango de concentraciones de biocatalizador ensayado.



\*: estimado

Figura 5.13.- Compuestos de la ruta 4S en el medio A) acuoso y B) bifásico, a las 24 horas de reacción. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .

La evolución de la concentración de los compuestos según se incrementa la concentración de biomasa en el medio muestra de nuevo la estabilidad de los valores desde prácticamente los 12g/L, tanto para ensayos acuosos como para bifásicos.

Por tanto, se puede concluir que ese valor de concentración de biocatalizador establece un límite, por debajo del cual la concentración de células es importante, mientras que por encima son otros los factores que controlan la velocidad del proceso de BDS, como por ejemplo, el área de superficie interfacial.

Por último, y combinando los resultados obtenidos por el estudio del efecto de la FFO, de la concentración inicial de DBT y de la concentración de biocatalizador en ensayos de BDS con células en resting cell, se resuelve que en el

proceso existe una transición del paso limitante, de la velocidad de consumo de sustrato a la velocidad de transferencia de materia. Así, la velocidad de transferencia de materia es la que controla el proceso en sistemas con valores relativamente bajos de FFO y de concentraciones iniciales de sustrato, y elevadas densidades celulares.

Nuestros resultados confirman las conclusiones aportadas por otros autores, en un rango bastante amplio de condiciones experimentales, (Maghsoudi y col., 2001; Abbad-Andaloussi y col., 2003; Luo y col., 2003; Jia y col., 2006; Rashtchi y col., 2006).

### 5.5. INHIBICIÓN DE LA BDS EN RESTING CELL

El rendimiento de la BDS depende de numerosos factores, y puede verse mermado por los efectos de inhibición de sustrato y/o producto.

En todo el estudio desarrollado y descrito anteriormente, así como en bibliografía, parece evidente la existencia de efectos de inhibición del proceso de BDS.

La inhibición por sustrato ha sido identificada en sistemas de BDS llevados a cabo con células en crecimiento, (Marzona y col., 1997; Guchhait y col., 2006A), y por tanto, en el capítulo 4 se ha estudiado este aspecto. En cambio, no se ha observado cuando se han empleado células en resting cell, incluso con concentraciones de DBT del orden de 14mM, para sistemas con relativamente altas densidades celulares, (Luo y col., 2003; Jia y col., 2006).

Las mismas conclusiones habían sido determinadas previamente por el grupo de investigación de Maghsoudi y col., 2000 y 2001, sin llegar a presentar un análisis cinético, con 24mM de DBT, equivalente a 1000ppm de azufre.

En referencia a los efectos de inhibición por la acumulación de los productos de la ruta metabólica de desulfuración, si bien Li, y col., 1996, han demostrado que la transcripción del cluster *dsz* se reprime por la acumulación de sulfato, empleando células de *Rhodococcus erythropolis* D-1 en resting cell

Ohshiro y col., 1996, apenas observan inhibición ante una muy elevada concentración de sulfato.

En este sentido, Goubin y col., 2006, indican también que la actividad desulfurante de las células de *P. delafieldii* R-8, que expresan el conjunto de enzimas Dsz de *R. erythropolis* IGTS8, no está afectada por la producción de sulfato, pero sí por la acumulación de HBP. Tal efecto decrece en sistemas bifásicos, dado que el coeficiente de distribución del HBP entre la fase orgánica y la acuosa alcanza un valor de 30, obteniéndose tan sólo un descenso del 20% de la actividad desulfurante incluso con la acumulación de HBP de 2g/L, (Kobayashi y col., 2001).

Como ya se ha mencionado, numerosos autores han descrito que el HBP, producto final de la ruta metabólica de desulfuración de DBT, es un potente inhibidor de la misma, sin embargo no se han encontrado estudios que profundicen en estos aspectos. Watkins y col., 2003, realizaron ensayos con concentraciones crecientes de HBP y sulfito en condiciones acuosas con *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, pero sólo observó el fenómeno sobre la última reacción de la ruta en la que el HBPSi es transformado en HBP, conversión catalizada por la enzima desulfinaasa DszB, no encontrando este tipo de efectos de inhibición con ninguno de los productos citados, ni siquiera a concentraciones de 100  $\mu$ M.

Teniendo en cuenta estos resultados se ha considerado importante abordar el estudio del efecto de la inhibición por la acumulación del producto final de la BDS, el HBP, sobre nuestro sistema con células en resting cell, tanto en condiciones acuosas como bifásicas.

El estudio se ha organizado determinando en primer lugar el efecto de la concentración de HBP sobre la velocidad de consumo utilizando como sustratos los distintos compuestos de la ruta 4S. En segundo lugar se ha seguido la evolución del proceso de BDS con células en resting cell, utilizando como sustrato sólo DBT, y distintas concentraciones iniciales de HBP.

### 5.5.1. Estudio de la inhibición de las etapas de la ruta metabólica 4S por la presencia de HBP

Para desarrollar el estudio de los efectos de inhibición por producto lo primero que se ha abordado es la evaluación de las velocidades específicas iniciales de consumo utilizando como sustrato los compuestos de la ruta 4S, tanto con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 como con *Pseudomonas putida* CECT5279, en condiciones acuosas y adicionando distintas concentraciones de inhibidor, HBP, al inicio del proceso.

Estos ensayos se han llevado a cabo en régimen discontinuo, en erlenmeyer de 50mL, con 3mL de tampón HEPES 12g/L y concentración de biocatalizador de 2g/L. El inóculo se ha preparado como se describe en los apartados 2.5.2 y 2.5.3. En todos los ensayos, las condiciones de operación han sido 30°C y 250rpm.

La concentración de los distintos sustratos ensayados, DBT, DBT-sulfóxido, (DBTO), DBT-sulfona, (DBTO<sub>2</sub>) y 2-hidroxibifenil 2-sulfinato (HBPSi), varía en el rango de 5 a 50 µM, dado que la solubilidad en medio acuoso de algunos de estos sustratos se encuentra en el rango nanomolar, (Monticello, 2000).

En las figuras 5.14, 5.15., 5.16. y 5.17. se muestran las velocidades específicas de consumo de sustrato a 15 minutos de reacción, utilizando para cada caso distintas concentraciones de inhibidor (I), HBP.

Como puede observarse en la figura 5.14., ambos microorganismos alcanzan prácticamente la misma velocidad de consumo de DBT a los 15 minutos de reacción. Además, en los dos casos y en el rango ensayado, la concentración de inhibidor no afecta a la velocidad de consumo, que es proporcional a la concentración inicial de sustrato.

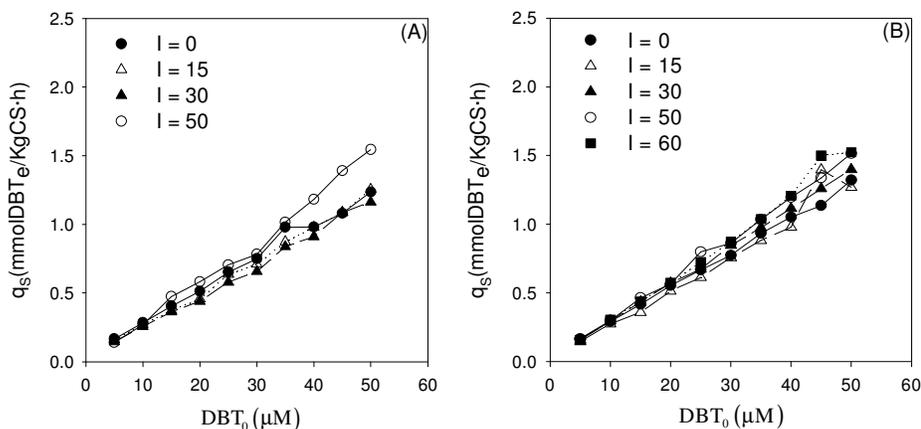


Figura 5.14.- Velocidades específicas iniciales de consumo de DBT con A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y B) *Pseudomonas putida* CECT5279.

En el consumo de DBTO si se observan diferencias significativas en el comportamiento de ambos microorganismos.

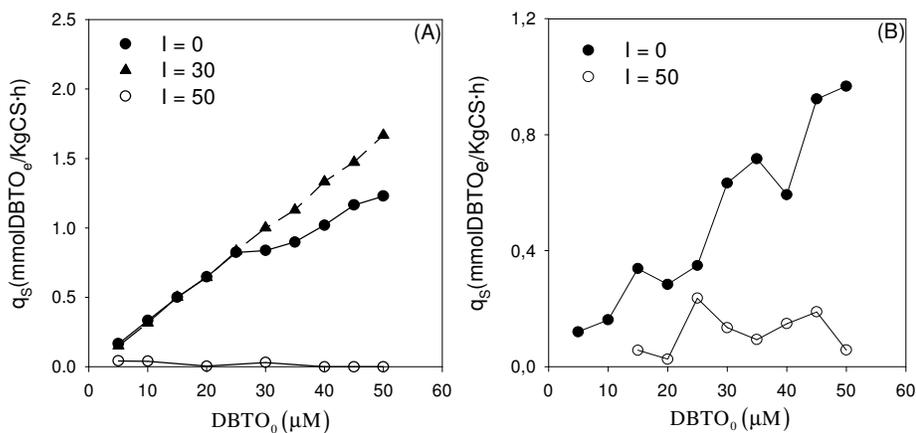


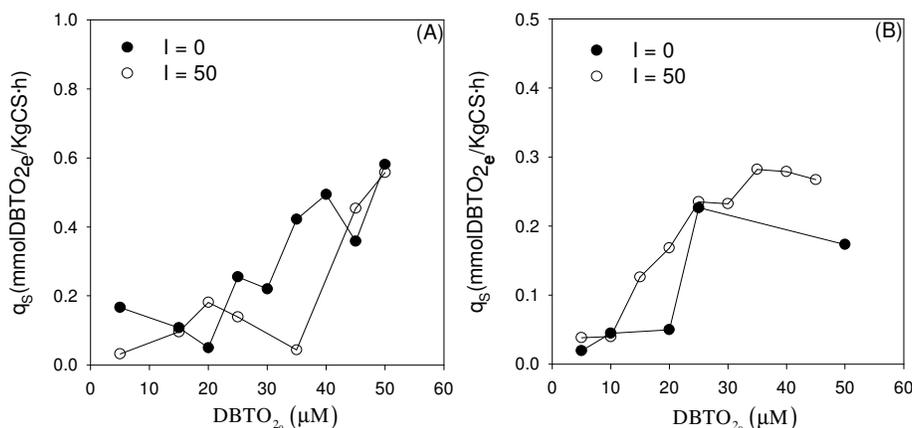
Figura 5.15.- Velocidades específicas iniciales de consumo de DBTO con A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y B) *Pseudomonas putida* CECT5279.

En el caso de *R. erythropolis* IGTS8, la velocidad específica de consumo no se ve afectada por concentraciones de hasta 30  $\mu\text{M}$  de HBP, si bien con 50 se ha observado una total ausencia de consumo, en el tiempo ensayado.

Mientras se ha producido desulfuración de DBTO, la velocidad específica de consumo ha sido proporcional a la concentración inicial de sustrato.

Observando la figura 5.15.B se deduce que *P. putida* CECT5279 tiene una menor velocidad específica de consumo de DBTO que *R. erythropolis* IGTS8, y que con 50  $\mu\text{M}$  de HBP inicial no se ha producido prácticamente consumo de DBTO.

De nuevo, en el rango de concentraciones ensayadas, la velocidad específica de consumo de sustrato es proporcional a la concentración inicial de sustrato en el medio.



**Figura 5.16.- Velocidades específicas iniciales de consumo de DBTO<sub>2</sub> con A) Rhodococcus erythropolis IGTS8 y B) Pseudomonas putida CECT5279.**

Cuando se emplea DBTO<sub>2</sub> como sustrato de la BDS con células en resting cell, con ambos microorganismos, las velocidades específicas de consumo a los 15 minutos de reacción sufren un descenso acusado, con respecto a los valores observados utilizando como sustrato DBT o DBTO, lo que podría sugerir que elevadas concentraciones de DBTO<sub>2</sub> podrían producir efectos de inhibición por sustrato.

En condiciones de crecimiento se ha reportado que la velocidad de crecimiento utilizando DBT ó DBTO<sub>2</sub> como fuentes únicas de azufre son iguales, (Gallagher y col., 1993), o incluso superior en el caso de emplear DBTO<sub>2</sub>, (Setti y col., 1999). Sin embargo, en procesos de BDS llevados a cabo en resting cell nuestros resultados muestran una clara disminución de la velocidad específica de consumo de DBTO<sub>2</sub>, a pesar de que con *R. erythropolis* IGTS8 nunca se ha detectado este compuesto en el medio de reacción.

En el caso de *R. erythropolis* IGTS8, como se observa en la figura 5.16.A, la velocidad de consumo de DBTO<sub>2</sub> no se ve afectada por la presencia de HBP, incluso ensayando una concentración inicial del mismo de 50 μM.

De nuevo, en todo el rango ensayado la velocidad específica de consumo aumenta proporcionalmente al incremento de concentración inicial de sustrato.

Con *P. putida* CECT5279 los resultados observados son similares a los indicados con *R. erythropolis* IGTS8, si bien los valores de velocidad alcanzados son inferiores.

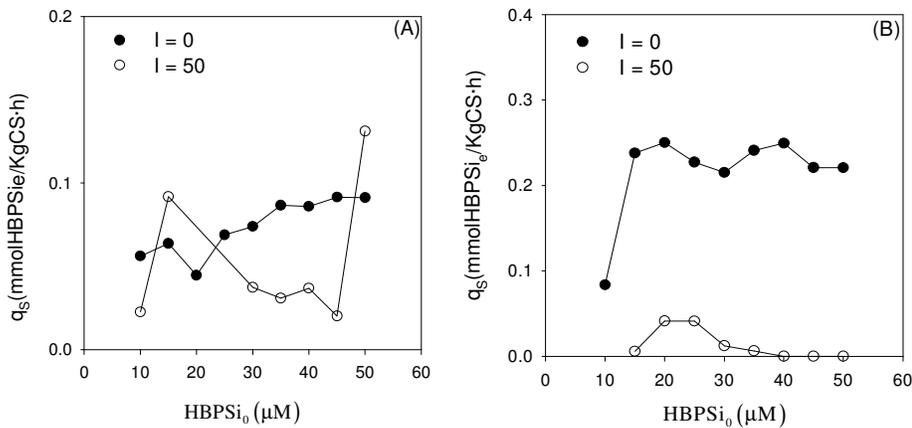


Figura 5.17.- Velocidades específicas iniciales de consumo de HBPSi con A) *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y B) *Pseudomonas putida* CECT5279.

En el caso de utilizar HBPSi como sustrato, a los 15 minutos de reacción la velocidad específica de consumo de HBPSi con *R. erythropolis* IGTS8 es muy pequeña, y con 50 μM de HBP inicial prácticamente inexistente.

Con HBPSi, y para el rango ensayado, los valores de velocidad específica de consumo son bastante estables, independientemente de la concentración inicial del mismo.

Los ensayos con *P. putida* CECT5279 presentan valores de velocidad específica de consumo de HBPSi más elevados que los alcanzados por *R. erythropolis* IGTS8, cambiando la tendencia presentada hasta el momento, y como se ha descrito previamente en el apartado 5.3. Y de nuevo, la velocidad

específica de consumo se ve significativamente afectada por la concentración del inhibidor.

Por último indicar que, como se observa en la figura 5.17.B, la velocidad específica de consumo de HBPSi alcanza un valor estable a partir de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  de HBPSi inicial.

Concluyendo, se puede apreciar que el comportamiento es distinto dependiendo del compuesto de la ruta 4S que se utiliza como sustrato, lo que puede estar relacionado con las distintas concentraciones de los mismos empleadas.

### **5.5.2. Inhibición del proceso de BDS por la acumulación de HBP.**

Una vez observados los efectos del HBP sobre las velocidades iniciales específicas de consumo de todos los sustratos probables de la ruta metabólica 4S, se realizan ensayos para seguir la evolución del proceso de BDS de DBT con ambos microorganismos, partiendo de distintas concentraciones iniciales de inhibidor.

Todos los ensayos fueron llevados a cabo en erlenmeyer de 250 y 500mL, dependiendo de si los ensayos eran acuosos o bifásicos, respectivamente.

En todos los experimentos desarrollados en condiciones acuosas, el volumen utilizado, 25mL, está constituido por tampón HEPES 12g/L, 1g/L de concentración de biocatalizador, (obtenido como se describe en los apartados 2.5.2 y 2.5.3), y 25 ó 10 $\mu\text{M}$  de DBT, disuelto en etanol. El porcentaje de etanol no supera el 1% v/v.

En los ensayos bifásicos la fase acuosa coincide con el medio de reacción de los experimentos acuosos, salvo por la concentración de DBT que asciende a 271 $\mu\text{M}$  de DBT, no superándose un 1% v/v de etanol por ensayo. La fase orgánica se compone de hexadecano, manteniendo la proporción 1:1 fase acuosa- fase orgánica.

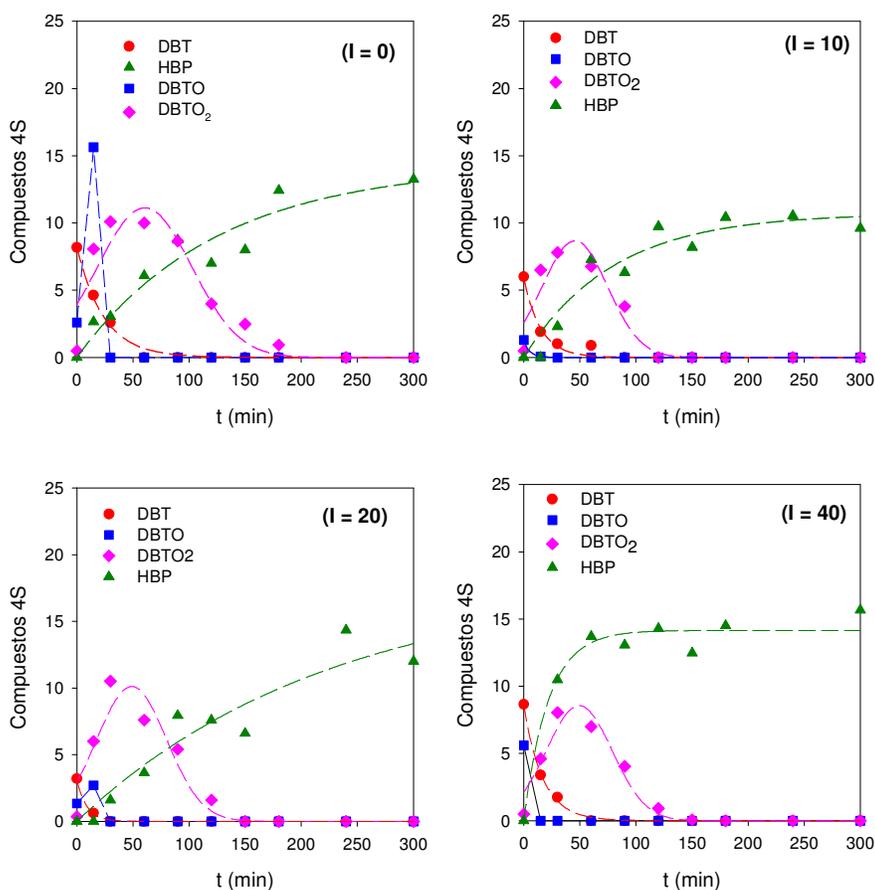
## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

La experimentación ha consistido en una serie de ensayos con *P. putida* CECT5279 y *R. erythropolis* IGTS8 en condiciones acuosas y bifásicas al 50% v/v, con distintas concentraciones iniciales de inhibidor, HBP.

### Evolución de la BDS en condiciones acuosas con *P. putida* CECT5279

En los ensayos acuosos, la concentración inicial de inhibidor,  $I$ , varía de 0 a 40  $\mu\text{M}$  de HBP.

La figura 5.18. muestra la evolución de los distintos compuestos de la ruta metabólica de desulfuración 4S.



**Figura 5.18.- Evolución de la BDS en condiciones acuosas con *Pseudomonas putida* CECT5279 y distintas concentraciones de inhibidor,  $I$ . Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

Como puede observarse en la figura anterior, la suma de compuestos no asciende a los 25  $\mu\text{M}$  iniciales de sustrato añadido. Las explicaciones para este

déficit han sido comentadas en el apartado 5.3. Por otro lado, y como puede apreciarse, los únicos compuestos intermedios de la ruta 4S que aparecen son el DBTO y el DBTO<sub>2</sub>, desapareciendo este último sobre los 150 minutos de reacción.

En relación a las producciones de HBP, no se observan diferencias apreciables entre los distintos ensayos.

Por tanto parece que incluso en condiciones acuosas, y a pesar de que el HBP es un potente inhibidor de la ruta de desulfuración, como ya se ha indicado previamente, no se observa que afecte al proceso de BDS con células de *P. putida* CECT5279 en resting cell, en el rango de concentraciones de inhibidor ensayado.

En el apartado 5.5.1. se concluía que las velocidades específicas iniciales de consumo de DBT y de DBTO<sub>2</sub> no se veían afectadas por la presencia de HBP. En cambio, la de consumo de DBTO se veía disminuida pero, sobre todo, era sobre la conversión de HBPSi a HBP donde se observaba mayor efecto del inhibidor. Sin embargo, dichos efectos se observaron a partir de 50µM de HBP, es decir, por encima del rango ensayado en estos ensayos de seguimiento.

### Evolución de la BDS en condiciones bifásicas con *P. putida* CECT5279

En la figura 5.19. se muestran los resultados del proceso de BDS en condiciones bifásicas. La concentración de inhibidor ensayada varía de 0 a 220µM.

Con *P. putida* CECT5279 apenas se observa conversión del DBT. Por otro lado, en el medio de reacción aparecen pequeñas cantidades de DBTO<sub>2</sub> que se acumula, y también pequeñas cantidades de HBP. En esta ocasión la concentración remanente de estos tres compuestos coincide con la concentración de sustrato consumido.

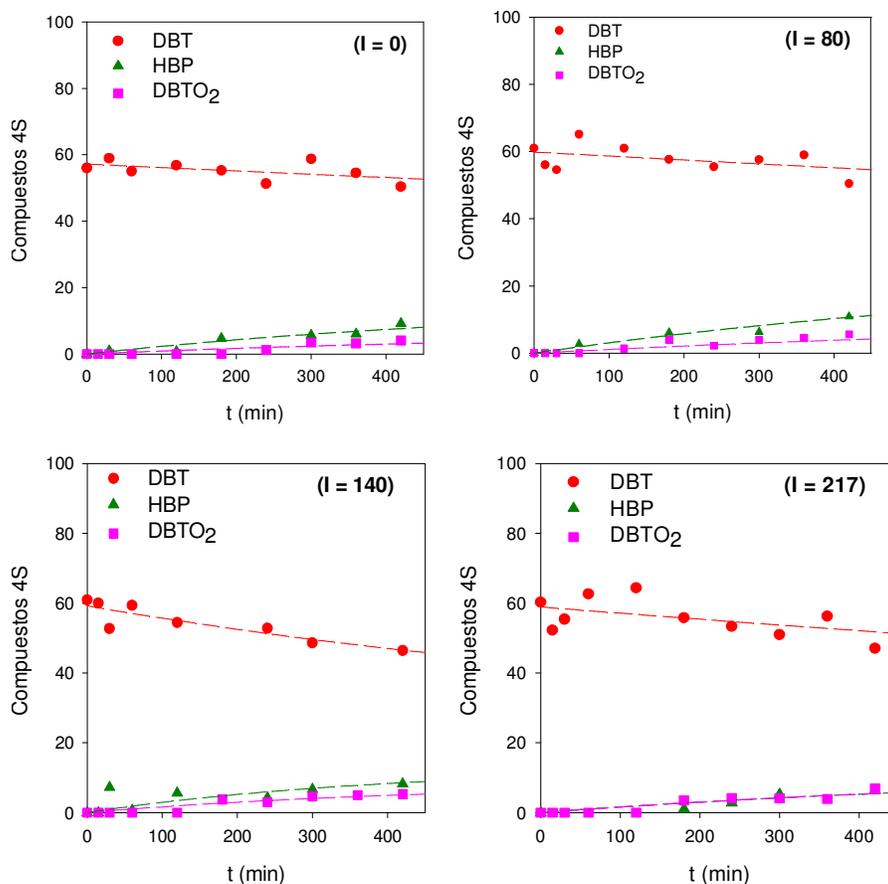


Figura 5.19.- Evolución de la BDS en condiciones bifásicas con *Pseudomonas putida* CECT5279 y distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .

En referencia a los efectos de inhibición, como puede observarse en la figura anterior, en el rango de concentraciones de inhibidor ensayado no se concluye claramente que las velocidades específicas de consumo de DBT y producción de HBP alcancen menores valores cuando se introduce HBP al inicio del proceso.

Para englobar toda la información obtenida, en la figura 5.20. se muestran las evoluciones de los porcentajes de desulfuración alcanzados en las distintas condiciones ensayadas, tanto en medios acuosos (A), como bifásicos (B).

Coincidiendo con los resultados comentados hasta el momento, tan sólo a concentraciones muy elevadas de HBP se nota una disminución de los porcentajes de conversión.

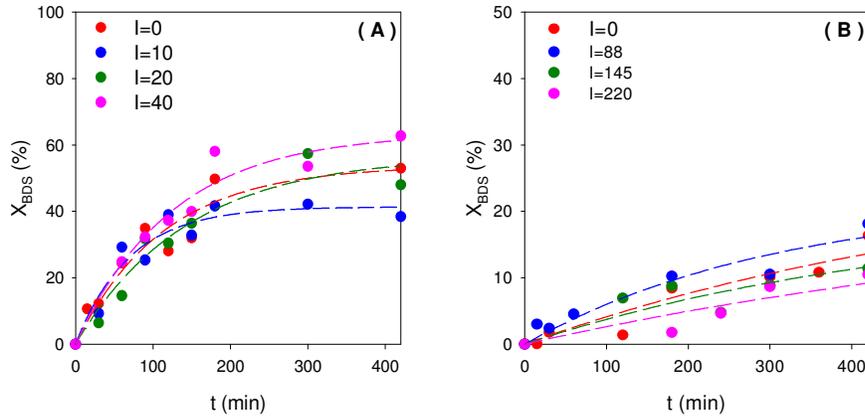
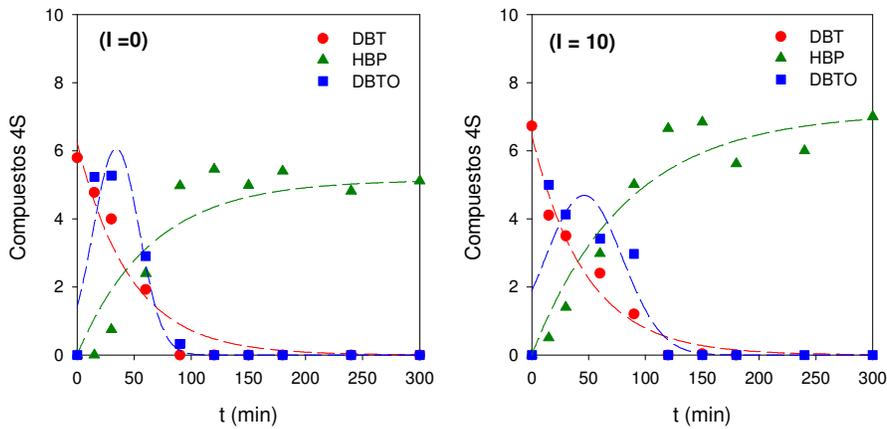


Figura 5.22.- Porcentajes de  $X_{BDS}$  alcanzados en procesos de BDS A) en medios acuosos y B) bifásicos, con *Pseudomonas putida* CECT5279 y distintas concentraciones de inhibidor, I.

Evolución de la BDS en condiciones acuosas con *R. erythropolis* IGTS8

La concentración inicial de inhibidor (I) utilizada ha variado entre 0 y 20  $\mu\text{M}$  de HBP.

La figura 5.21. muestra la evolución de los distintos compuestos de la ruta metabólica de desulfuración 4S.



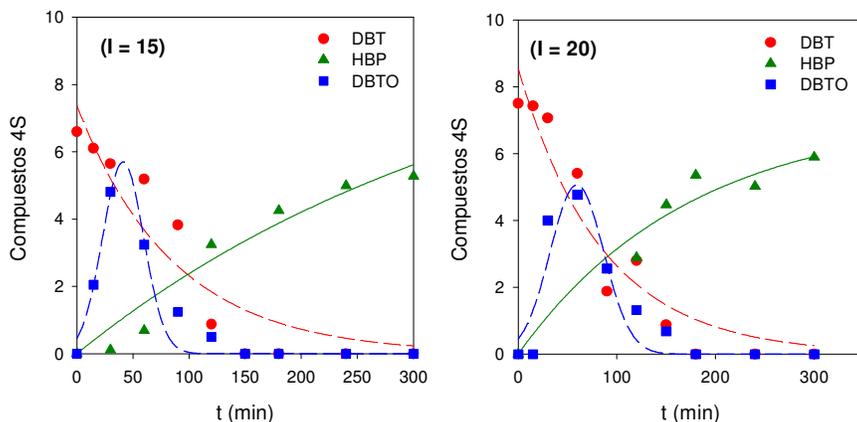


Figura 5.21.- Evolución de la BDS en condiciones acuosas con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .

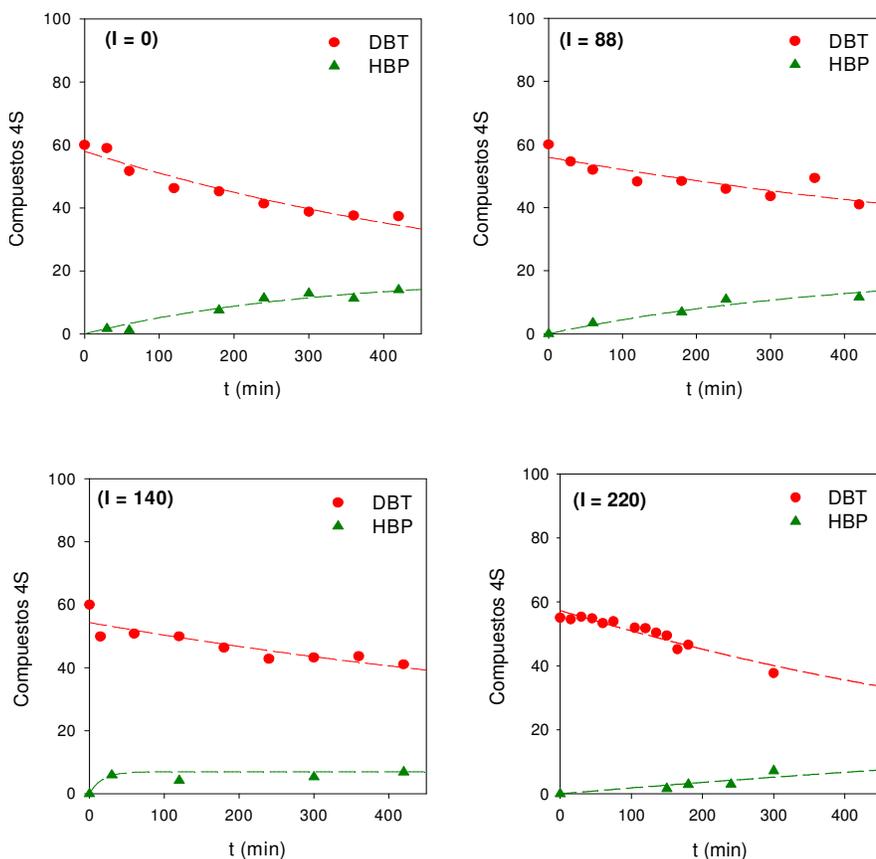
En la figura 5.21. se muestra la acumulación de DBTO, que llega a valores de concentración de hasta  $6\mu\text{M}$ , y la acumulación del producto final, HBP. En este caso no hay acumulación de sulfona. Según Gallagher y col., 1993, con *R. erythropolis* y en condiciones estacionarias, parece ser que la ruta de desulfuración de DBT más significativa se traduce en la conversión de DBT a DBTO, HBPSi y HBP, sin pasar por  $\text{DBTO}_2$ .

Sin embargo, de nuevo la concentración de compuestos disueltos en el medio de reacción, como se ha comentado en el sistema acuoso con células de *P. putida* CECT5279, no suma los  $10\mu\text{M}$  que se introdujeron en forma de DBT al inicio del proceso. Como ya se ha comentado, proponemos que la materia que falta es HBP y DHBP acumulado en el interior celular, y cristales de DBT no disueltos en el medio de reacción.

Como se aprecia claramente en la figura, aparecen efectos de inhibición cuando se utilizan mayores concentraciones de inhibidor. Así, la concentración de sustrato desaparece en torno a los 100 minutos de reacción cuando no se utiliza inhibidor, mientras que cuando se añaden  $20\mu\text{M}$ , el DBT no desaparece completamente hasta los 200 minutos.

Evolución de la BDS en condiciones bifásicas con *R. erythropolis* IGTS8

En la figura 5.25. se muestran los datos obtenidos en los experimentos realizados en condiciones bifásicas, variando la concentración de inhibidor de 0-220  $\mu\text{M}$ .



**Figura 5.22.- Evolución de la BDS en condiciones bifásicas con *Rhodococcus erythropolis*. IGTS8 y distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

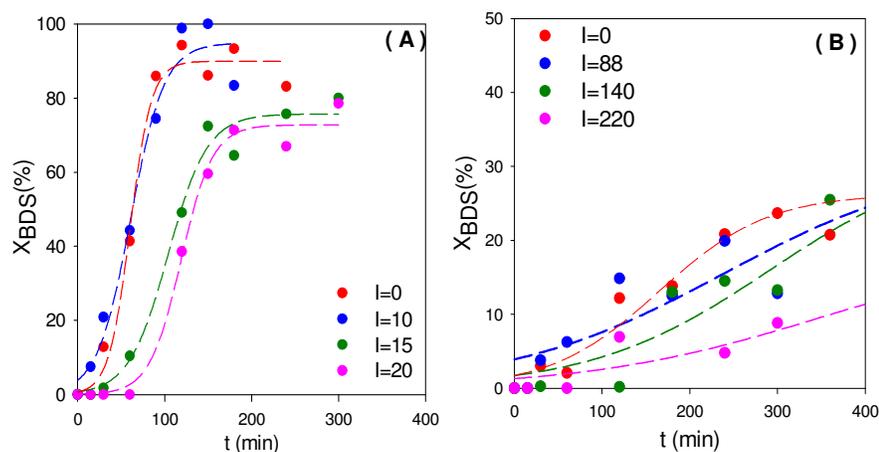
La primera diferencia con los ensayos en condiciones acuosas es la no acumulación de ningún producto intermedio de la ruta, de modo que la producción de HBP es estequiométrica con relación al DBT eliminado. Del mismo modo, Luo y col., 2003, observaban que en condiciones bifásicas *P. delafieldii* R-8 metabolizaba estequiométricamente DBT a HBP.

Por otro lado, ha de destacarse que la velocidad de conversión del DBT es mucho más lenta que en condiciones acuosas.

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

El efecto de inhibición debido a la acumulación de HBP, como ya se ha mencionado con anterioridad, es mucho menor en condiciones bifásicas, dado que prácticamente todo el HBP está concentrado en la fase orgánica. Así, y aún utilizando muy elevadas concentraciones de inhibidor, la concentración de DBT eliminada a los 300 minutos de reacción es muy similar en todos los ensayos.

En la siguiente figura se muestran los porcentajes de desulfuración,  $X_{BDS}$ , obtenidos con las distintas concentraciones iniciales de inhibidor ensayadas, tanto en condiciones acuosas (A) como bifásicas (B), mostradas en la siguiente figura.



**Figura 5.23.- Porcentajes de  $X_{BDS}$  alcanzados en procesos de BDS A) en medios acuosos y B) bifásicos, con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y distintas concentraciones de inhibidor,  $I$ .**

Tal y como se ha ido comentando, la acumulación de HBP produce un fuerte efecto de inhibición de la ruta de desulfuración 4S en condiciones acuosas, desde tan sólo 15  $\mu\text{M}$  de HBP. En cambio, en condiciones bifásicas, y debido a que el HBP producido en el interior celular migra a la fase de hexadecano, no se observan efectos de inhibición hasta que se utilizan concentraciones iniciales de HBP de 220  $\mu\text{M}$ .

### 5.6. ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

Por último, y al igual que en el capítulo de BDS con células en crecimiento, se procede a llevar a cabo un estudio cinético de la BDS con células

en resting cell. Se han empleado modelos cinéticos presentados en la bibliografía para simular la evolución de la BDS en sistemas con células en resting cell, y se ha propuesto el empleo de un modelo de cinética enzimática con inhibición competitiva para describir este fenómeno, observado en algunos de los ensayos descritos previamente.

En literatura no se ha encontrado ninguna publicación que concluya que se observa inhibición por sustrato cuando la conversión de DBT se lleva a cabo con células en resting cell. Por ello, para un rango muy amplio de concentraciones tanto de biocatalizador como de DBT, varios autores proponen que la reacción de BDS con células en resting cell sigue el patrón de cinética enzimática de Michaelis-Menten, (Kobayashi y col., 2001; Luo y col., 2003; Jia y col., 2006; Rashtchi y col., 2006).

Kobayashi y col., 2001, determinaron que el patrón de desulfuración seguido por *R. e. KA2-5-1* en ensayos en resting cell, con 12g/L de concentración de biocatalizador y 50% v/v de FFO, usando tetradecano como solvente orgánico, podía representarse con la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{dS}{Xdt} = q = q_{S_{max}} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (5.1)$$

donde  $X$  es la concentración de biocatalizador (biomasa), gCS/L,

$q$ , la velocidad específica de consumo de sustrato, mmolDBT/KgCS·min

$q_{S_{max}}$ , la velocidad específica máxima de consumo de sustrato, mmolDBT/KgCS·min

$S$ , la concentración de sustrato,  $\mu$ M de DBT

$K_S$ , la constante de saturación,  $\mu$ M de DBT.

Con este modelo, Luo y col., 2003, obtuvieron una  $q_{max}$  de 13mmolDBT/KgCS·min y una  $K_S$  de 1.3mM con cepas de *Pseudomonas delafieldii* R-8. Su sistema de estudio se realizó en erlenmeyer agitados, con 50% v/v de dodecano y 50% de tampón fosfato, 1mM de DBT y 20g/L de concentración de biocatalizador, liofilizado.

Posteriormente Jia y col., 2006, determinaron de forma equivalente para cepas de *Gordonia* sp. un intervalo de  $q_{\max}$  de entre 0.17-0.22mmolDBT/KgCS·min y constantes de saturación de entre 0.42-0.23  $\mu\text{M}$  de DBT, para fracciones de fase orgánica de entre 15-25% v/v en fermentador comercial. El solvente orgánico utilizado fue también dodecano, y las concentraciones de DBT y biocatalizador ensayadas de entre 2-5  $\mu\text{M}$  y 0.10-0.76 gCS/L, respectivamente. Por otro lado ha de destacarse que utilizan madres de DBT en etanol de 20mM de concentración.

En nuestros ensayos de BDS con células en resting cell, y dado que con los resultados mostrados ha quedado patente que en algunos casos existe inhibición por la acumulación de HBP, que también ha sido ampliamente descrito en bibliografía aunque no se haya presentado ningún modelo cinético que describa el proceso teniendo en cuenta este fenómeno, se ha empleado el modelo propuesto por Michaelis-Menten, 1913, cuando no se observe inhibición por producto, (ecuación 5.1), y un modelo para cinéticas enzimáticas afectadas por inhibición competitiva cuando si se observe, (ecuación 5.2)

$$q = q_{s \max} \cdot \frac{S}{K_s + S \cdot \left( 1 + \frac{P}{K_I} \right)} \quad (5.2)$$

donde  $P$  es la concentración del inhibidor, en este caso, el producto,  $\mu\text{M}$  de HBP.

$K_I$ , la constante de inhibición,  $\mu\text{M}$  de HBP

### Modelo cinético con *Pseudomonas putida* CECT5279 en medios acuosos

En medios acuosos y con *Pseudomonas putida* CECT5279, el modelo cinético que simula los resultados mostrados en la figura 5.18. es el modelo cinético de Michaelis-Menten, 1913:

La desaparición de DBT se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{dS}{dt} = -X \cdot q_{S_{\max}} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \quad (5.3)$$

Dado que la aparición del compuesto DBTO sólo sucede a tiempos iniciales de reacción, podemos suponer que la velocidad con la que aparece es prácticamente nula.

Y puesto que sí hay acumulación de DBTO<sub>2</sub>, hasta los 150 minutos aproximadamente, la expresión que describe la velocidad aparente de aparición es:

$$\frac{dS_i}{dt} = \left( X \cdot q_{S_{\max}} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \right) - \left( X \cdot q_{S_i_{\max}} \cdot \left( \frac{S_i}{S_i + K_{S_i}} \right) \right) \quad (5.4)$$

donde  $q_{S_{\max}}$ , la velocidad específica máxima de consumo de sustrato intermedio, mmolDBTO<sub>2</sub>/KgCS·min

$S_i$ , la concentración de sustrato intermedio, µM de DBTO<sub>2</sub>

$K_{S_i}$ , la constante de saturación de sustrato intermedio, µM de DBTO<sub>2</sub>

En relación con el HBPSi, dado que en ningún tiempo de reacción ha sido detectada una concentración significativa del mismo, se considera que su velocidad de aparición y de desaparición son iguales.

Por último, la producción de HBP se define con la ecuación 5.5.

$$\frac{dP}{dt} = \left[ X \cdot q_{S_i_{\max}} \cdot \left( \frac{S_i}{S_i + K_{S_i}} \right) \right] \cdot y \quad (5.5)$$

donde el rendimiento  $y$ , en principio, es la relación molar entre HBP producido y el sustrato consumido.

En la tabla 5.9. se indican las constantes cinéticas empleadas, basadas en bibliografía, (Jia y col., 2006).

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

Tabla 5.9.-Constantes cinéticas para la BDS en condiciones acuosas de *Pseudomonas putida* CECT5279.

$q_{Smax}^*$	$K_S$ ( $\mu M$ )	$q_{Si}^{**}$	$K_{Si}$ ( $\mu M$ )	X (gCS/l)	y (-)
0,55	0,15	0,15	0,15	1,00	0,50

\*( $mmolDBT/KgCS \cdot min$ ), \*\*( $mmolDBTO_2/KgCS \cdot min$ )

Para ajustar los datos experimentales el valor de rendimiento ha de ser 0.5, dado que la concentración de producto final obtenido no coincide con la concentración de sustrato consumido, como se ha descrito en el apartado 5.3.

La siguiente figura muestra el elevado grado de ajuste entre los datos experimentales (figura 5.18) y los calculados con el modelo planteado.

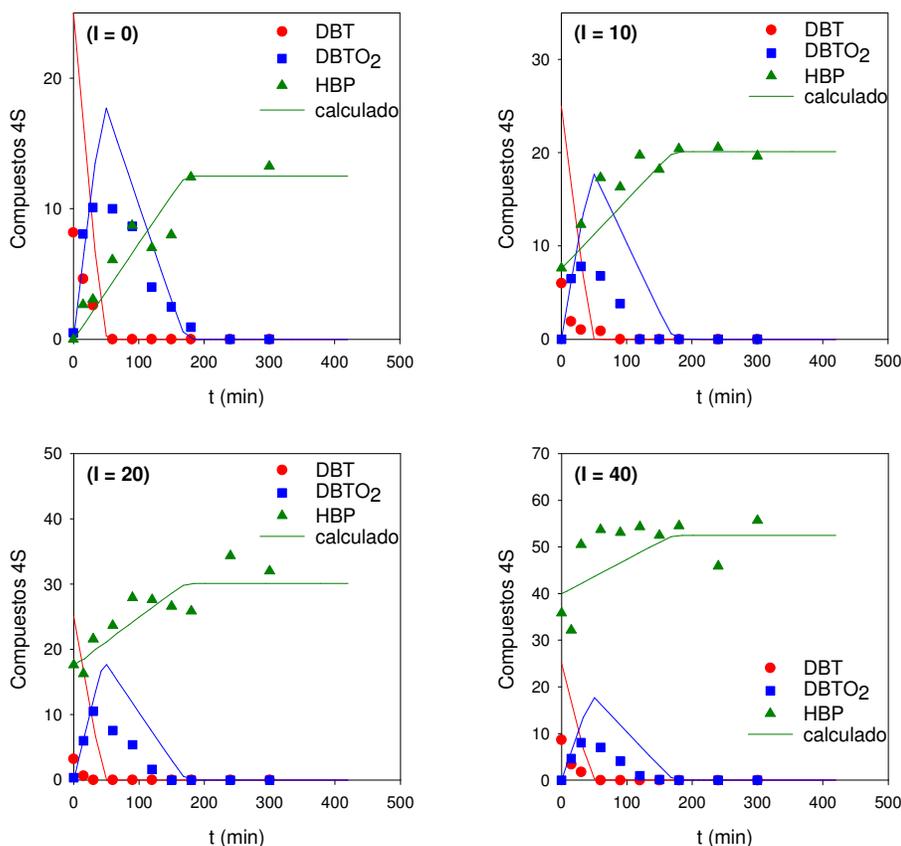


Figura 5.24.- Simulación de la BDS con *Pseudomonas putida* CECT5279, en condiciones acuosas y con distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en  $\mu M$ .

Debe indicarse que los datos calculados para el DBTO<sub>2</sub> son siempre mayores a los obtenidos experimentalmente. Sin embargo, la concentración

máxima para este compuesto disminuye al aumentar la concentración de inhibidor, tanto en los valores calculados como en los experimentales.

#### Modelo cinético con *Pseudomonas putida* CECT5279 en medios bifásicos

En condiciones bifásicas aparecen tan sólo DBT, DBTO<sub>2</sub> y HBP en el medio de reacción. Sin embargo, en este caso el DBTO<sub>2</sub> no desaparece en el tiempo de ensayo. Además, en la fase acuosa, las concentraciones de DBT, DBTO<sub>2</sub> y HBP son inferiores a 5µM, y esas concentraciones son despreciables frente a las existentes en fase orgánica, (Yang y Marison, 2005).

El modelo cinético que se plantea describe la desaparición del sustrato, DBT, y la aparición de producto, HBP, así como la aparición y acumulación de un producto intermedio, el DBTO<sub>2</sub>, mediante el modelo planteado por Michaelis-Menten.

La desaparición de sustrato, y la acumulación de sulfona y HBP se describen de nuevo con las ecuaciones 5.3., 5.4. y 5.5., respectivamente.

Las constantes cinéticas empleadas para la descripción del proceso son las presentadas en la tabla 5.10.

**Tabla 5.10.-Constantes cinéticas para la BDS en condiciones bifásicas de *Pseudomonas putida* CECT5279.**

$q_{Smax}^*$	$K_S$ (µM)	$q_{Si}^{**}$	$K_{Si}$ (µM)	X (gCS/l)	y (-)
0,25	750	0,007	0,15	1,00	1,00

\* (mmolDBT/KgCS·min), \*\* (mmolDBTO<sub>2</sub>/KgCS·min)

Los problemas de difusión de compuestos entre las fases implica la variación de las constantes cinéticas aplicadas en los medios acuosos.

Dado que el balance se cierra con la aparición de HBP como único producto final de la ruta de desulfuración el rendimiento, y, alcanza el valor 1.

La figura 5.25. muestra el elevado grado de ajuste entre las curvas simuladas y los datos experimentales obtenidos, (figura 5.19.), para concentraciones de inhibidor entre 0 y 220  $\mu\text{M}$  de HBP inicial.

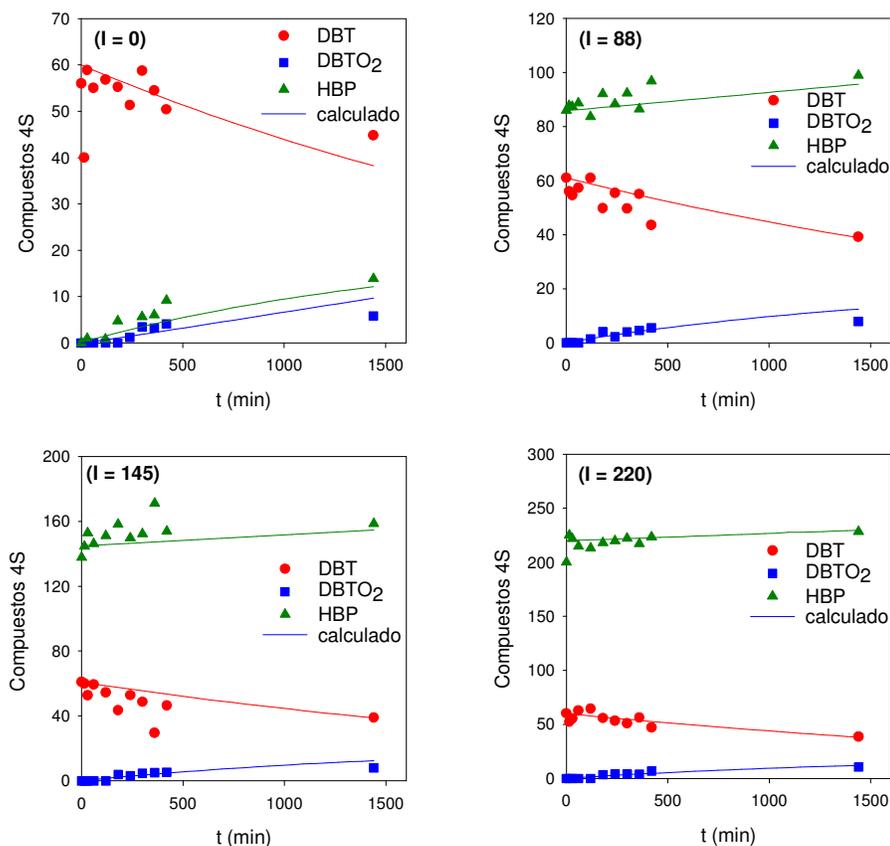


Figura 5.25.- Simulación de la BDS con *Pseudomonas putida* CECT5279, en condiciones bifásicas y con distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .

Modelo cinético con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medios acuosos

El modelo cinético que simula los resultados mostrados en la figura 5.23. es un modelo cinético típico de reacciones enzimáticas con inhibición competitiva.

Las ecuaciones 5.6, 5.7. y 5.8. describen la evolución de los compuestos que aparecen en el medio de reacción.

Así, la eliminación de DBT se describe con la expresión:

$$\frac{dS}{dt} = -X \cdot q_{S\max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S \cdot \left( 1 + \frac{P}{K_I} \right)} \right) \quad (5.6)$$

donde  $P$  es la concentración de producto,  $\mu\text{M}$  de HBP

$K_I$ , la constante de inhibición sobre el DBT,  $\mu\text{M}$  de HBP.

Dado que aparece DBTO en el medio durante los primeros 150 minutos de reacción, la aparición-desaparición del mismo se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{dS_i}{dt} = \left( X \cdot q_{S\max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S \cdot \left( 1 + \frac{P}{K_I} \right)} \right) \right) - \left( X \cdot q_{S_i\max} \cdot \left( \frac{S_i}{S_i + K_{S_i} \cdot \left( 1 + \frac{P}{K_I'} \right)} \right) \right) \quad (5.7)$$

donde  $q_{S_i\max}$ , la velocidad específica máxima de consumo de sustrato intermedio,  $\text{mmolDBTO/KgCS} \cdot \text{min}$

$S_i$ , la concentración de sustrato intermedio limitante,  $\mu\text{M}$  de DBTO

$K_{S_i}$ , la constante de saturación de sustrato intermedio,  $\mu\text{M}$  de DBTO

$K_I'$ , la constante de inhibición sobre el DBTO,  $\mu\text{M}$  de HBP.

Durante los ensayos no se han detectado concentraciones apreciables de  $\text{DBTO}_2$  y  $\text{HBPSi}$ , por lo se considera que las velocidades de las reacciones enzimáticas que los convierten son elevadas.

La producción de HBP se define con la ecuación 5.8.

$$\frac{dP}{dt} = \left[ X \cdot q_{S_i\max} \cdot \left( \frac{S_i}{S_i + K_{S_i} \cdot \left( 1 + \frac{P}{K_I'} \right)} \right) \right] \cdot y \quad (5.8)$$

En la tabla 5.11. se indican las constantes cinéticas empleadas.

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL

Tabla 5.11.-Constantes cinéticas para la BDS en condiciones acuosas de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

$q_{Smax}^*$	$K_S$ ( $\mu M$ )	$K_I$ ( $\mu M$ )	$q_{Si}^{**}$	$K_{Si}$ ( $\mu M$ )	$K_I'$ ( $\mu M$ )	X (gCS/l)	y (-)
0,25	0,35	0,50	0,10	0,15	0,80	1,00	0,50

\*( $mmolDBT/KgCS \cdot min$ ), \*\*( $mmolDBTO/KgCS \cdot min$ )

Al igual que en el caso anterior, y dado que no se cierra balance, la constante y tiene un valor de 0.5.

La figura 5.26. muestra el elevado grado de ajuste entre las curvas calculadas y los datos experimentales (figura 5.21).

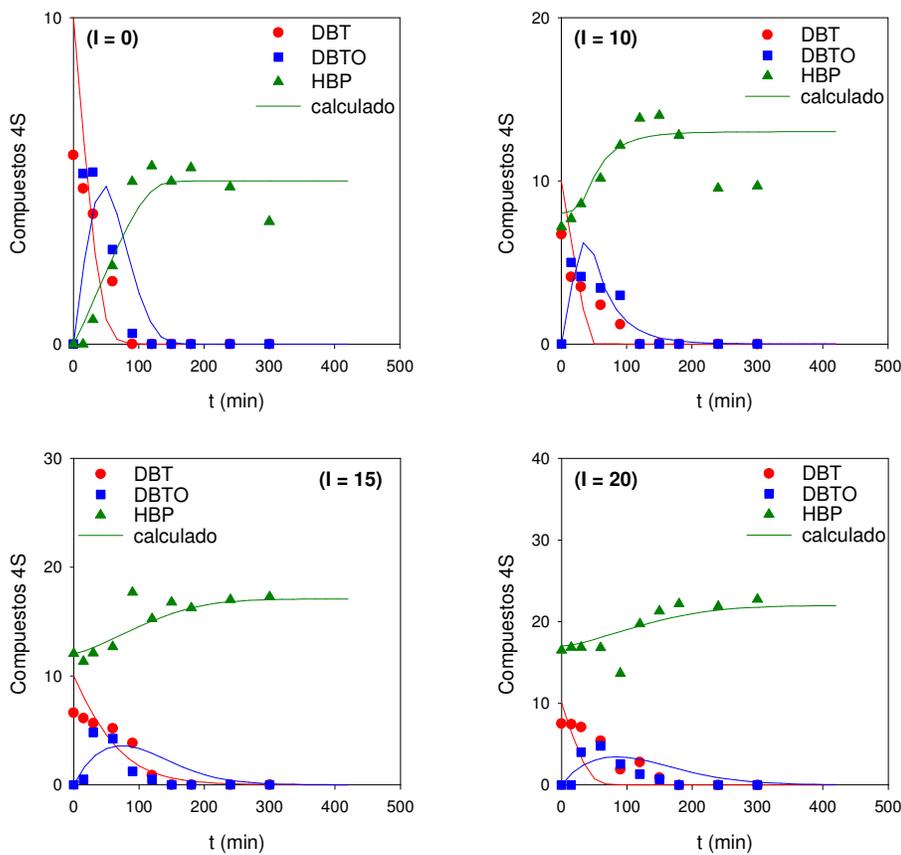


Figura 5.26.- Simulación de la BDS con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, en condiciones acuosas y con distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en  $\mu M$ .

Modelo cinético con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en medios bifásicos

En referencia a los estudios en condiciones bifásicas, ha de indicarse que no se observa la acumulación de ningún intermedio, ni de DHBP, en el medio de reacción.

En este caso se plantea un modelo cinético similar al anterior, en el que tan sólo se describe la desaparición del sustrato, DBT, y la aparición de producto, HBP, y donde el rendimiento,  $y$ , alcanza el valor 1, puesto que la producción de HBP es estequiométrica.

La desaparición se define por la expresión 5.6. y, dado que no hay acumulación de ningún compuesto intermedio, la evolución del producto se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = \left[ X \cdot q_{S_{\max}} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S \cdot \left( 1 + \frac{P}{K_I} \right)} \right) \right] \cdot y \quad (5.9)$$

Las constantes cinéticas empleadas para la descripción del proceso son las presentadas en la tabla 5.12.

**Tabla 5.12.-Constantes cinéticas para la BDS en condiciones bifásicas de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8**

$q_{S_{\max}}$ *	$K_S$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	X (gCS/l)	y (-)
0,25	150	100	1,00	1,00

\*(mmolDBT/KgCS·min)

La figura 5.27. muestra la correcta simulación de los datos experimentales, (figura 5.22.), para concentraciones de inhibidor entre 0 y 290  $\mu\text{M}$ .

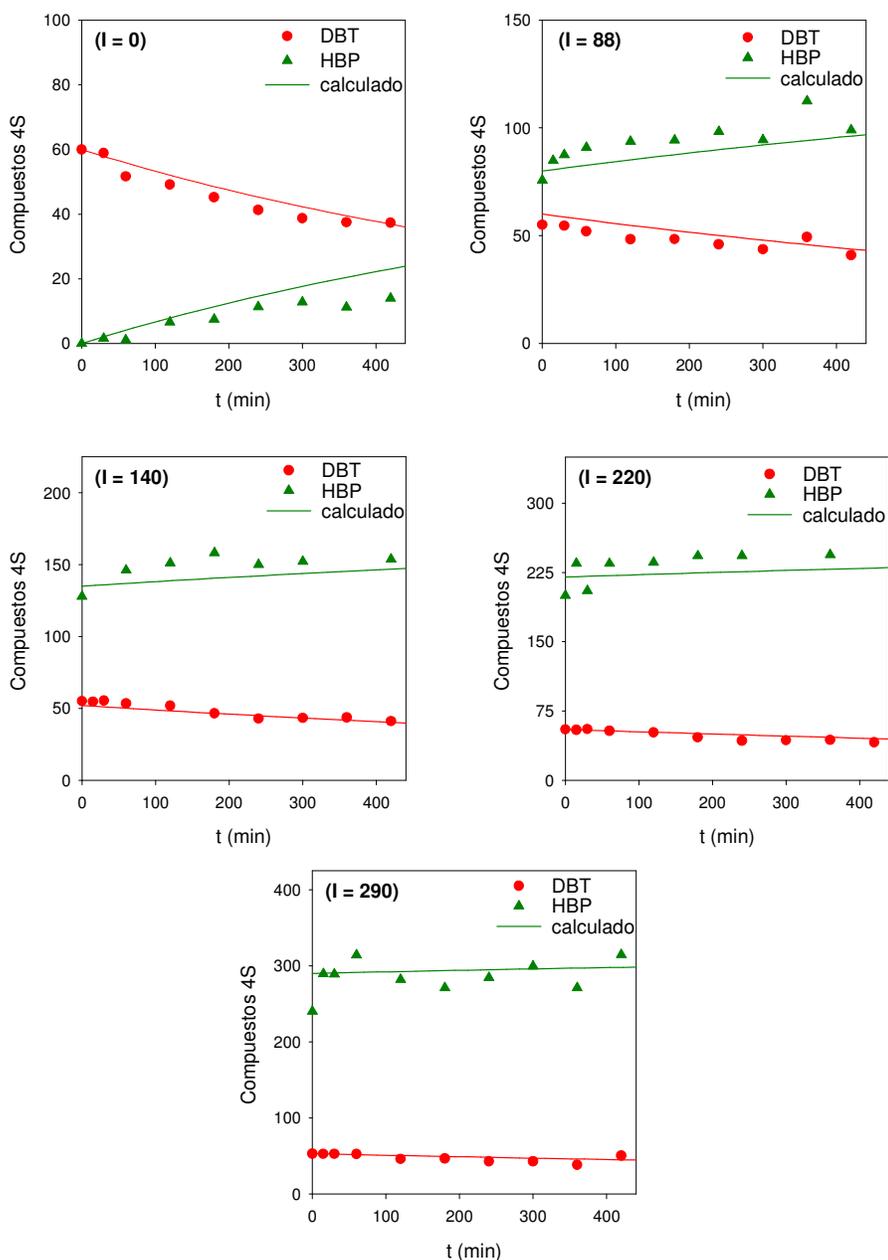


Figura 5.27.- Simulación de la BDS con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, en condiciones bifásicas y con distintas concentraciones de inhibidor, I. Compuestos en μM.

Este modelo propuesto para *R. erythropolis* IGTS8 se ha empleado con los ensayos descritos en los apartados 5.1.4. y 5.1.5., sobre la influencia de la adición de una fuente de energía adicional, (A), y sobre la mejora de la transferencia y solubilidad del DBT en los ensayos bifásicos en resting cell, (B).

A) En la tabla 5.13. se muestran las constantes utilizadas para la simulación de los ensayos de BDS con el medio de reacción bifásico que se ha definido en el apartado 5.1.4. (Fig. 5.28.a), o adicionándole una segunda fuente de energía como glicerol (Fig.5.28.b), etanol (Fig.5.28.c) y succinato de sodio (Fig.5.28.d).

Con las mismas constantes se ajustan los datos experimentales de todos los ensayos, que además son las mismas que se han utilizado en el apartado anterior, (tabla 5.12).

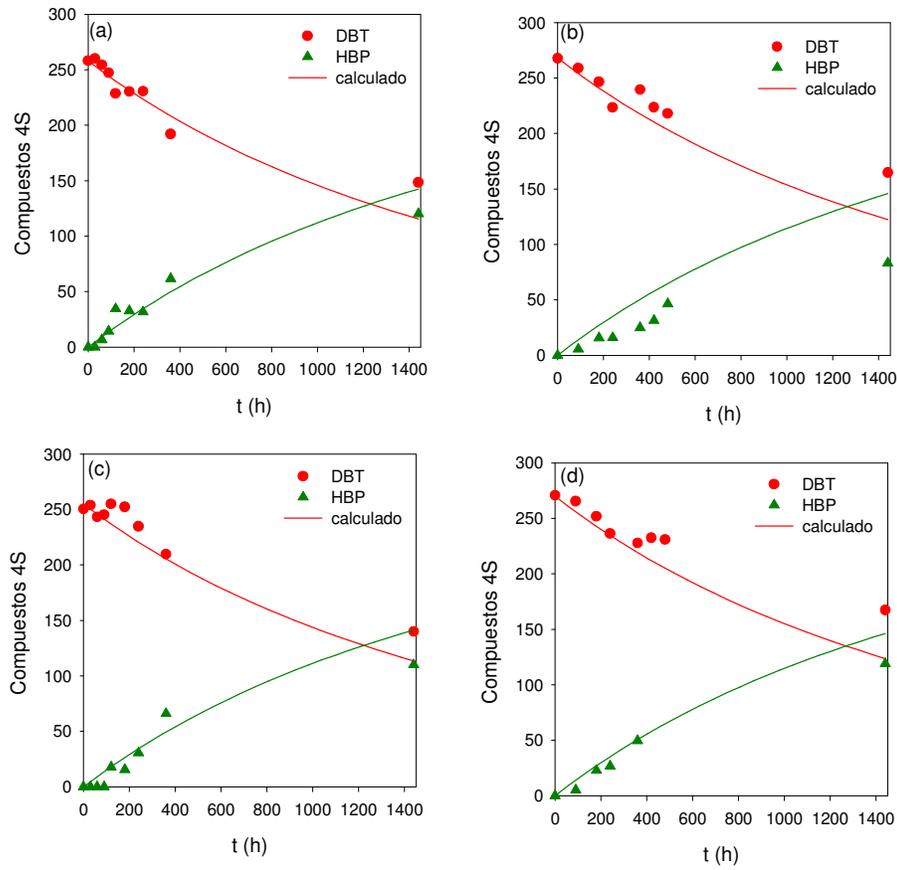
**Tabla 5.13.- Constantes cinéticas para BDS con células en resting cell y 50% FFO.**

$q_{Smax}$ (mmolDBT/KgCS·min)	$K_S$ (μM)	$K_I$ (μM)	X (gCS/l)	y (-)
0,25	150	100	1,00	1,00

La figura 5.28.muestra la evolución de la BDS y el buen grado de ajuste de los datos simulados.

Como ya se ha indicado en el apartado 5.1.4., en el sistema de estudio la adición de una segunda fuente de carbono no incrementa la conversión de la BDS, ni la velocidad del proceso.

## 5. BDS CON CÉLULAS EN RESTING CELL



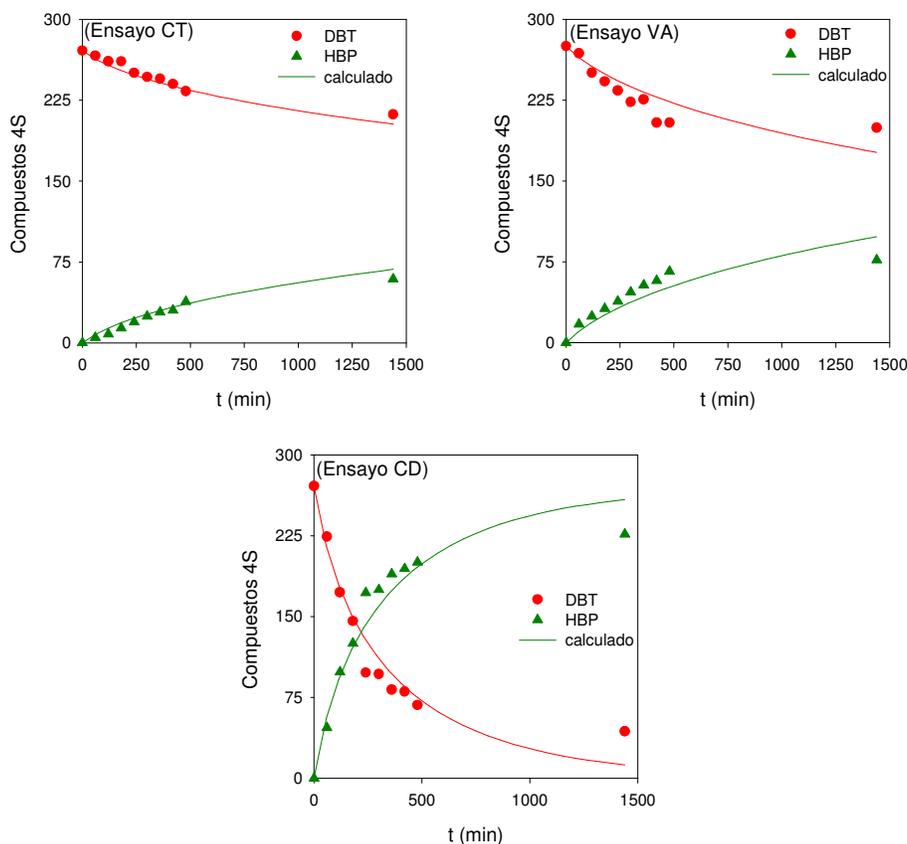
**Figura 5.28.- Simulación de la BDS con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, 50% FFO y A) sin fuente de carbono adicional, B) con glicerol, C) con etanol y D) con succinato de sodio. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

B) En la tabla 5.14. se muestran las constantes utilizadas para la simulación de las reacciones. Como se definió en el apartado correspondiente, en el ensayo control (CT) la velocidad de agitación era de 250rpm, y no había etanol en el medio. En el ensayo de velocidad de agitación (VA), las características del medio fueron las mismas que en el anterior, pero se empleaba una velocidad de agitación de 325rpm. En el ensayo de codisolvente (CD) se empleaba una madre de DBT disuelto en etanol, de forma que el porcentaje de alcohol ascendía a 0.7% v/v, y la velocidad de agitación utilizada eran 250rpm.

**Tabla 5.14.- Constantes cinéticas para BDS con células en resting cell, y 50% FFO.**

ENSAYO	$q_{s\max}$ (mmolDBT/KgCS·min)	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	X (gCS/l)	y (-)
CT	0,031	150,0	10,00	8	1
VA	0,031	62,5	6,25	8	1
CD	0,250	150,0	40,00	8	1

En la figura 5.29. se muestra el buen grado de ajuste de los datos experimentales y calculados.



**Figura 5.29.- Simulación de la BDS con 50%FFO, 8g/L de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y 50ppm de DBT, con CT) 250rpm, VA) 325rpm y CD) 250rpm y 0.7% de etanol v/v. Compuestos en  $\mu\text{M}$ .**

Como puede apreciarse en los valores de la tabla y en los gráficos presentados, el ensayo en el que se alcanza una mayor velocidad de consumo, y en el que las constantes cinéticas son más similares a lo encontrado en bibliografía, y por tanto, a los ensayos descritos hasta el momento, es en el que se disuelve el DBT en etanol.

Debe indicarse que la disminución de la constante de inhibición indica que hay más inhibición, y esto puede relacionarse con la mayor concentración de biocatalizador en el ensayo, y por tanto, con la mayor producción de HBP.