

La biotecnología actual y su impacto en la industria de la refinación del petróleo

Jorge Aburto, NG Rojas-Avelizapa, Rodolfo Quintero-Ramírez

Instituto Mexicano del Petróleo. Eje Central Lázaro Cárdenas 152, Col. San Bartolo Atepehuacan, 07730 México D.F., México. E-mail: jaburto@imp.mx

RESUMEN

El presente artículo provee un panorama general de la situación de la biotecnología actual y su futuro impacto en la industria de la refinación del petróleo. La refinación del petróleo presenta actualmente varios retos como son la disminución de las reservas petroleras, los precios variables del crudo, el aumento en la demanda de combustibles limpios y petroquímicos así como una normativa internacional más estricta para la conservación del medio ambiente. Estos retos persistirán y se intensificarán en los próximos años. El éxito de la biotecnología en otras ramas industriales motivó la investigación en biotecnologías aplicadas a la industria de la refinación como una tecnología complementaria o alternativa en la resolución de los mencionados retos y necesidades. Se revisaron los últimos avances en las tecnologías de biorefinación entre ellos la desulfuración, la desnitrificación y el mejoramiento del petróleo. Se identificaron asimismo los principales factores que dirigen o restringen la investigación y desarrollo tecnológico en la biorefinación del petróleo y finalmente, se propone una prospectiva tecnológica de la investigación futura en este campo.

Palabras claves: prospectiva tecnológica, industria del petróleo, biorefinación

Biotecnología Aplicada 2003;20:57-65

ABSTRACT

Biotechnology and Its Impact on the Petroleum Industry. This paper comes out from the need to provide a general overview of the current biotechnology situation and its future impact on the petroleum industry. This important industrial sector already encounters challenges as the decreasing oil reserves, the fluctuating oil prices, the increasing demand of petroleum, fuels and petrochemicals and finally more strict environmental regulations. These challenges will persist and strengthen in the following 25 years. Biotechnology has a long-way overcome since the 1950's and today impacts different industrial sectors as food, pharmaceuticals, medicine, agriculture, textile, etc. Because good experiences of the above industries, petroleum industry interests now in biotechnology as an alternative technology to resolve the challenges and needs of this worldwide important sector. We described throughout the paper the main factors that drive or restrain research and development (R&D) in biological processes applied to petroleum industry. We propose also a prospective of the biotechnology incidence to the petroleum sector. Moreover, we identified several challenges and opportunities, where R&D in petroleum biotechnology will play an important role to surmount the future industrial needs.

Keywords: technology prospective, biotechnology, oil industry, biorefining

Introducción

La biotecnología, vista como un conjunto de tecnologías enfocadas a la producción de bienes y servicios por medio de sistemas biológicos o sus productos, se encuentra presente en la vida diaria. El progreso tecnológico derivado de la modificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) permitió la industrialización de nuevos procesos en ramas tan diversas como la agroalimentaria, farmacéutica, agroquímica, ambiental y química (Tabla 1). El descubrimiento de diversos microorganismos capaces de utilizar al petróleo, gas natural y derivados como substratos en sus procesos metabólicos originó el interés e investigación en la rama energética. La biotecnología del petróleo se refiere entonces a la aplicación de procesos biológicos o productos en las diferentes actividades de la industria petrolera: exploración, producción, refinación, petroquímica y medio ambiente.

La investigación y el desarrollo tecnológico en la industria petrolera está controlada por varios impulsores claves como son: el incremento en la producción de crudo pesado, el crecimiento de la demanda de combustibles, la necesidad de aumentar la recuperación secundaria y terciaria de petróleo, la búsqueda de margen de ganancia atractivo y el cumpli-

Tabla 1. Investigación actual y futura en biotecnología del petróleo y áreas relacionadas [1]

❖	Alimentos para consumo humano y animal
❖	Producción de cultivos
❖	Producción animal
❖	Salud humana y animal
❖	Petróleo
•	Recuperación microbiana mejorada de petróleo (MEOR por sus siglas en inglés)
•	Combustibles limpios
•	Biointegración de petróleo
•	Productos biotecnológicos (Agentes tensioactivos, polímeros)
•	Biopetroquímicos
❖	Contaminación
•	Biodegradación de residuos agrícolas, pecuario y urbanos
•	Biorremediación de suelos y acuíferos contaminados
•	Biotratamiento microbiano de metales y efluentes
•	Biotratamiento de efluentes líquidos, sólidos y gaseosos
❖	Energía
•	Producción de biocombustibles (Biodiesel, alcohol, biogas, hidrógeno)

miento de normas ambientales más severas. En el caso particular de México, se adicionan otros impulsores como el mejoramiento del procesamiento del crudo

pesado de tipo maya, la explotación de yacimientos de tipo fracturado, el impulso de la rama petroquímica así como la limpieza de suelos y acuíferos contaminados por las actividades petroleras.

La industria petrolera se interesa entonces en la biotecnología como una alternativa que le permita afrontar los retos anteriores sobre la base de la gran versatilidad del metabolismo microbiano y su habilidad intrínseca para transformar substratos complejos en condiciones ambientales extremas, por ejemplo, temperatura, presión, salinidad, acidez, alcalinidad y medios hidrofóbicos. Diversos bioprocesos son investigados como tecnologías complementarias en la refinación del petróleo para reducir los costos de inversión y proceso así como superar las barreras tecnológicas en el mejoramiento del petróleo y gas (Figura 1) (Tabla 2). Sin embargo, los resultados no han sido del todo exitosos debido a escepticismo, falta de financiamiento, competitividad, relación costo/beneficio y políticas gubernamentales.

La biodesulfuración de gasolina y diesel fue considerada por el departamento de energía de los EE.UU (DOE) en el año 2000, una importante área de investigación y desarrollo tecnológico (I y DT) a mediano y largo plazo en el mapa tecnológico de la industria petrolera (Tabla 2). Cabe mencionar que no se señaló el potencial de la biotecnología en el mejoramiento biológico del petróleo. Consecuentemente este estudio

presenta la situación actual, los retos tecnológicos, los hitos y las oportunidades de investigación y desarrollo tecnológico en la biotecnología del petróleo, especialmente de la biorefinación. Finalmente, este estudio está dirigido a los centros de investigación, universidades y compañías petroleras interesadas en la planeación de la I y DT en biotecnología para los próximos años [1, 2].

Biorefinación

El petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos (parafinas, naftenos y aromáticos) que debe ser procesado en productos de mayor valor agregado tales como el gas licuado de petróleo (GLP), la gasolina, el diesel, disolventes, el queroseno, destilados medios, el aceite residual y el asfalto. El proceso de refinación comprende la realización de varias operaciones térmicas y catalíticas para convertir a las moléculas de la fracción pesada en moléculas más pequeñas, llamadas fracciones ligeras, que tienen una menor temperatura de destilación [3]. El azufre, nitrógeno y algunos metales como el níquel y el vanadio se concentran principalmente en la fracción pesada del petróleo y tienen una mayor resistencia a los procesos químicos convencionales, razones que dificultan su eliminación de los productos petrolíferos.

La biorefinación del petróleo, es decir la aplicación de biotecnologías en el fraccionamiento y mejoramiento

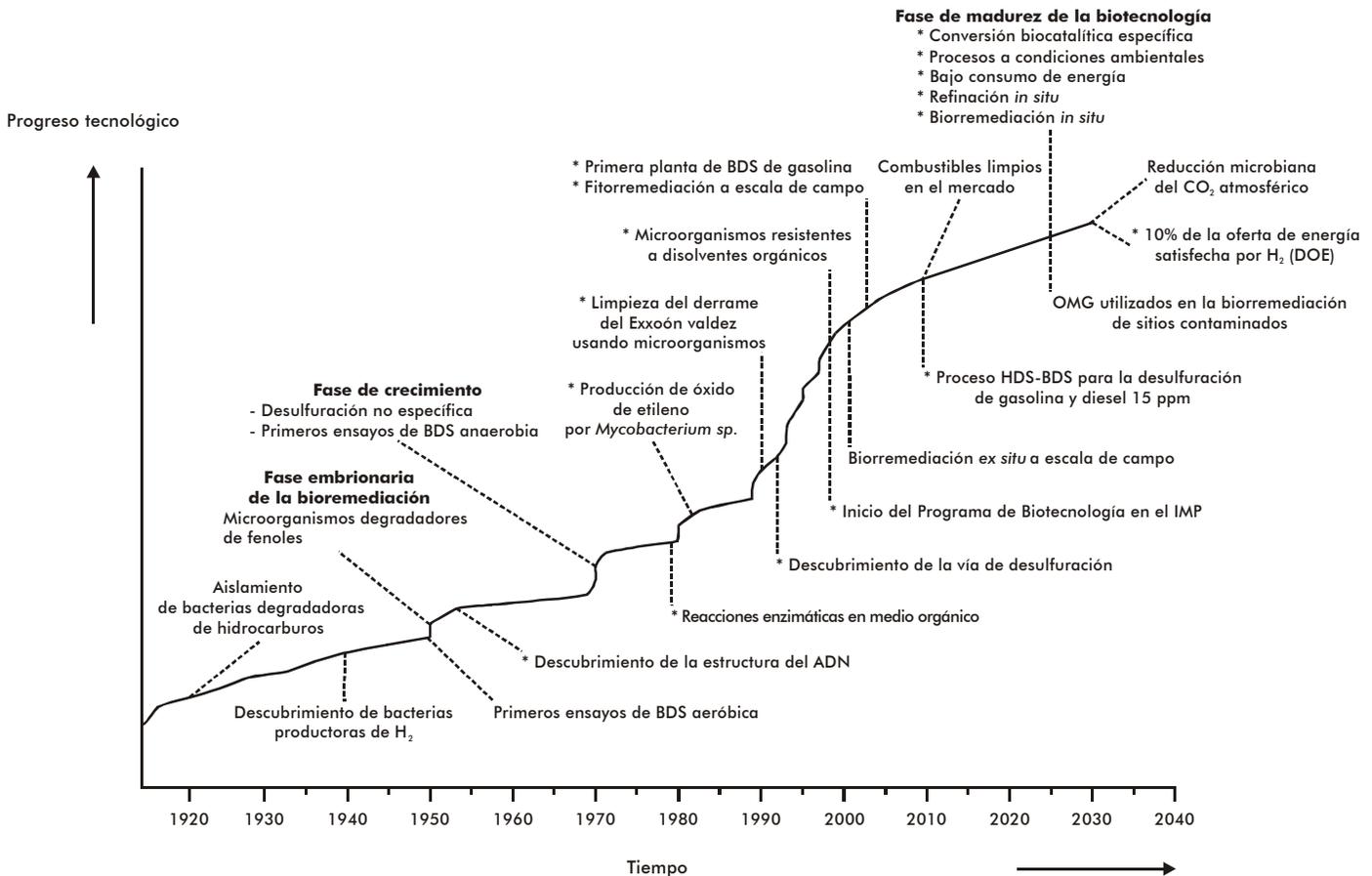


Figura 1. Progreso tecnológico de la biotecnología del petróleo.

del mismo, puede contribuir a la reducción de la contaminación y del consumo de energía y a la obtención de productos de mejor calidad. La biorefinación no es un concepto nuevo, por ejemplo British Petroleum (BP) produjo en los años 60 la proteína unicelular como una respuesta a la falta de demanda de parafinas para la industria petroquímica [4].

En la actualidad se considera que la industria moderna de la refinación enfrenta dos impulsores claves: el endurecimiento de las normas ambientales y la disminución lenta pero constante de las reservas de crudo ligero. El primero limita el contenido de compuestos azufrados en combustibles así como la emisión de óxidos de azufre y nitrógeno. El segundo impulsor obliga a mejorar los sistemas de refinación debido a una mayor alimentación de petróleo pesado, rico en asfaltenos, metales, azufre y nitrógeno que disminuyen la eficiencia de los diferentes procesos en la refinación del petróleo.

Eliminación de azufre

El azufre y el nitrógeno representan los mayores componentes del petróleo que contribuyen a la contaminación del aire, la lluvia ácida, la corrosión de infraestructura y al envenenamiento de los catalizadores. En efecto, la combustión de diesel de alto contenido en azufre no altera significativamente la emisión de hidrocarburos al ambiente pero aumenta la emisión de óxidos de azufre y duplica la de óxidos de nitrógeno. La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (USEPA) propuso en su *Tier 2 Act* un límite máximo de 15 ppm para el contenido de azufre en diesel para el año 2006 en contraste con las 500 ppm permitidas hoy en día [5]. Asimismo, el contenido de azufre en la mezcla de gasolina convencional y reformulada deberá disminuir de 300 a sólo 80 ppm. En consecuencia, los refinadores de petróleo están enfrentados al problema de la eliminación de azufre del petróleo y sus productos mediante el desarrollo o adopción de tecnologías innovadoras.

El procesamiento convencional del petróleo emplea la hidrodesulfuración (HDS) para reducir simultáneamente el contenido de azufre y nitrógeno con la producción de ácido sulfhídrico y amoníaco y satisfacer la normativa actual de 500 ppm en diesel automotriz. Una desulfuración profunda (*deep HDS*) que reduzca el nivel de azufre a menos de 200 ppm necesita el empleo de condiciones de reacción más severas: una temperatura entre 265 y 425 °C, una presión de 75-100 kg/cm² e hidrógeno (290-1260 scf/bbl); lo que incrementa la inversión y el costo de proceso [3, 6, 7]. El catalizador asimismo debe ser constantemente reemplazado debido a la disminución de su estabilidad y actividad por envenenamiento con los compuestos azufrados, nitrogenados y los metales.

Phillips Petroleum desarrolló recientemente una tecnología basada en la adsorción de azufre (S-Zorb) que le permitió reducir el contenido de azufre a 10 ppm con un costo de 0,9-1,2 centavos de dólar por galón. Sin embargo, la tecnología se aplica actualmente solamente a gasolina debido a su contenido en compuestos azufrados de menor peso molecular del tipo de mercaptanos y tiofenos que son más reactivos. Unipure Corp. y Texaco desarrollaron otra tecnología alternativa basada en la oxidación de azu-

Tabla 2. Biotecnologías relacionadas a la industria de la refinación del petróleo [1]

Plataforma petrolera	Tecnología	Organización	Financiamiento/país
Biorefinación	Biodesulfuración microbiana de petróleo	• Enchira (formerly Energy BioSystems Corp.)/Dep. of Energy (DOE)	Público & recursos propios/EUA
		• Petroleum Energy Center of Japan (PECJ)/ King Abdulaziz City for Science and Technology (KACST)	Público & privado/Japón-Arabia Saudita
		• Petro Star/Enchira Biotechnology Corp	Privado/EUA
		• Paques Bio Systems BV/Shell International Oil Products	Privado/Países Bajos
		• Mexican Petroleum Institute (IMP)	Público/México
	Biodesulfuración con la utilización de enzimas	• Institute of Biotechnology (IBT-UNAM)/IMP	Público/México
		• Idaho National Eng. & Environmental Laboratory/Texaco	Público & privado/EUA
	Desulfuración/desnitrificación por adsorbentes poliméricos selectivos	• IMP/IBT-UNAM/Institute of Food Research (Norwich)	Público/México-Reino Unido
		• SK Corp.	Privado/Corea
	Biodesnitrificación	• Institute of Gas Technology/ Petrobras R&D	Público & privado /EUA-Brasil-Univ. Federal do Rio de Janeiro
• University of Alberta-Syncrude		Público y privado/Canadá	
• IMP		Público/México	
Biodesintegración del petróleo	• Oak Ridge National Laboratory/Chevron/Phillips/Texaco	Público & privado/EUA	
	• Lawrence Berkeley National Laboratory/BP Amoco/Chevron/Natural Gas Center/ Texaco	Público & privado/EUA	
		• IMP	Público/México

fre en la interfase de una emulsión petróleo/agua con un agente oxidante como peróxido de hidrógeno. El principal inconveniente fue la necesidad de romper la emulsión para recuperar la fracción de petróleo desulfurada y la fracción acuosa rica en compuestos azufrados oxidados.

Las tecnologías convencionales y alternativas mencionadas permitieron alcanzar un contenido de azufre de 10 ppm en los combustibles, pero están dirigidas en general al tratamiento de cargas provenientes de petróleo ligero con un menor contenido de azufre, nitrógeno y metales. Sin embargo, el contenido de azufre en el petróleo se incrementará en los próximos años como resultado de una mayor producción de petróleo pesado, y será un gran problema para México cuyas principales reservas están formadas por crudo maya pesado (Figura 2). Las tecnologías de hidrotratamiento y S-Zorb requerirán en algunos casos de una mayor alimentación de hidrógeno, un catalizador más activo y estable así como de mayores temperaturas. Por otra parte, las tecnologías de oxidación no son selectivas y necesitan grandes volúmenes de agua, aproximadamente entre un 65 y 69% para formar la emulsión agua-petróleo. Además, los refinadores estarán afrontados a la adopción de una tecnología de desulfuración así como a la remodelación de las plantas existentes [6, 7].

La desulfuración biológica (BDS) de combustibles es otra tecnología alternativa a la HDS que se conoce desde 1930. La investigación desarrollada en BDS y biodesnitrógenación (BDN) en la década de los años 70 y 80 no interesó a la industria petrolera ya que se obtuvieron combustibles de bajo índice de octano debido a la degradación de los hidrocarburos por vía anaeróbica [8] o aeróbica [9]. Estos microorganismos no pueden utilizarse en el procesamiento del petróleo pero son importantes para la biorremediación de suelos y acuíferos. La vía microbiana selectiva de eliminación de azufre (vía 4S) de los compuestos del petróleo fue descubierta en 1978 y abrió nuevas oportunidades para la biotecnología en la producción de combustibles limpios debido a que no afectó significativamente el valor calórico [10]. La industria petrolera no mostró interés en su momento debido a la mayor flexibilidad de las normas ambientales, las altas reservas de crudo ligero y la buena rentabilidad de los procesos convencionales. No obstante, la década de los años 90 marcó un escenario diferente que incentivó la I y DT en BDS en universidades e industrias. Los hechos fundamentales de estos años fueron: el endurecimiento de la normativa ambiental en EE.UU. y Europa, el incremento de la demanda de combustibles, la disminución paulatina de las reservas de crudo ligero y la explotación de yacimientos de petróleo pesado y tierras bituminosas ricas en azufre y nitrógeno.

Notables avances en BDS fueron alcanzados en esta última década y extensivamente revisados en la literatura [11-14]. Se descubrieron nuevas cepas específicas de azufre, por ejemplo, *Brevibacterium* [15], *Pseudomonas* [16], *Gordona* [17], *Rhodococcus* [9, 18-20, 13] basadas en una vía desulfurizante 4S consistente en dos monoxigenasas FMN₂-dependientes, una Desulfinasas y una Flavin reductasa NADH-dependiente. Los operones que codifican para estas enzimas y para una Flavin reductasa de *Paenibacillus polymyxa* fueron aislados, caracterizados, clonados, mutados, sobre expresados y recombinados [21-26].

Las monoxigenasas DszC y DszA muestran la presencia de iones metálicos en su centro activo pero aún no se ha dado a conocer la estructura cristalina completa. Estas enzimas son activas frente a compuestos refractarios a la HDS como el dibenzotiofeno (DBT) y los derivados metilados (C₁-DBT) y en menor grado frente a las moléculas altamente alquiladas (C_x-DBT). La vía 4S es un sistema de 4 enzimas con requerimiento de cofactores que limitan la BDS al uso de células completas o extractos celulares. Sin embargo, se ha alcanzado una eliminación de hasta el 70% de azufre para soluciones modelo de DBTs y diesel [11, 20, 13, 27].

El bioprocesamiento de los combustibles se realiza regularmente en una emulsión del petrolífero en agua para mantener la viabilidad microbiana y su actividad. La reacción de oxidación se realiza en el citoplasma por lo que se requiere del transporte de los DBTs del petrolífero a la célula. Éste fenómeno no se ha elucidado completamente pero existe la convicción que *Rhodococcus* asimila a los DBTs directamente del petrolífero gracias a la hidrofobicidad de su membrana [14] o por intermedio de un agente tensioactivo biológico desde la fase acuosa [13, 18].

En efecto, resultados preliminares del Oak Ridge National Laboratory mostraron que la producción de un

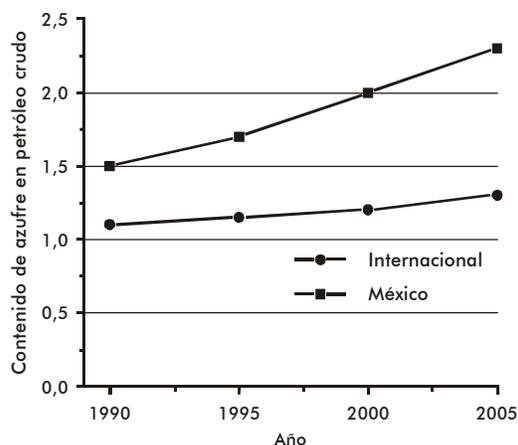


Figura 2. Contenido de azufre en petróleo de 1990 a 2005.

agente tensioactivo y la hidrofobicidad de la pared celular de *Rhodococcus sp.* formaron una emulsión agua-hexadecano con una tensión superficial de la fase acuosa de 35 dyn/cm comparada con los 58 dyn/cm logrados por *E. coli* [29]. Además, se conoce que ciertas cepas de *Pseudomonas* producen agentes tensioactivos y tienen una alta resistencia a disolventes (log P de 3,1 a 3, 4) atribuido a la rigidez de su membrana y a un flujo activo de disolvente en las células [30]. Esto permitió diseñar varias *Pseudomonas* recombinantes que incorporaron los genes de desulfuración [23, 11], por ejemplo, una *P. aeruginosa* EGSOX recombinante desulfura el 95% de una solución que contiene 6,4 ppm de azufre (37 ppm de DBT) en 24 h con la acumulación de un bactericida conocido, el hidroxibifenilo (HBP). La expresión de las enzimas Dsz (C y A) de *R. erythropolis* y una Flavin oxidoreductasa de *Vibrio harveyi* en una *E. coli* recombinante permitió incrementar la eliminación de DBT sin acumulación de HBP [25]. Un estudio financiado por el Japan Cooperation Center Petroleum (JCCP) utilizó restos celulares de una cepa termófila de *Mycobacterium phlei* WU-F1 para catalizar la oxidación completa de 149 ppm de DBT (26 ppm de azufre) en 90 min a 50 °C [31]. No obstante, la aplicación industrial de la BDS requiere tratar destilados intermedios con un contenido de azufre entre 200 a 500 ppm, es decir, hasta dos órdenes de magnitud mayor a los descritos anteriormente. Los principales retos son la baja velocidad de reacción, la cantidad de agua empleada, la amplia gama de substratos azufrados y la inhibición celular por substratos o metabolitos.

El uso de sistemas enzimáticos aislados en la BDS tiene la ventaja de requerir cantidades mínimas de agua o aún funcionar en condiciones anhidras como las que se encuentran en los disolventes orgánicos o los combustibles. La desulfuración enzimática tiene al menos tres ventajas con respecto a la utilización de microorganismo completos o resto celulares: presentan actividad catalítica a baja o nula actividad acuosa (Aw), presentan una mayor estabilidad termomecánica y tienen mínimos problemas de transferencia de masa [32]. Además, existen enzimas oxidasas, muchas de ellas sin requerimiento de cofactores, con una alta actividad y amplia especificidad. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes en el petróleo son substratos de

varias cepas de hongos a través de enzimas del tipo peroxidasa y lacasa [33-35]. La oxidación de los HPAs se realiza indirectamente a través de los radicales generados por la lacasa que actúan como mediadores de oxidación, por ejemplo, la anilina, la metionina, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y el 1-hidroxibenzotriazol (HBT). El DBT es oxidado por una lacasa fúngica en presencia de un exceso de ABTS o HBT con una velocidad de reacción muy baja para ser considerada en un proceso de desulfuración de diesel (Viniestra G, 2002. Comunicación personal). Otra manera es el empleo de la enzima Cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* como catalizador de la oxidación de los compuestos organoazufrados presentes en diesel seguido de una destilación a 325 °C. Con este procedimiento se obtuvo una eliminación del 83% de los compuestos organoazufrados [36, 37]. Recientemente, un sistema basado en la oxidación de DBT por citocromo C y la adsorción de la DBTS en tierras de diatomeas permitió reducir más del 80% del azufre inicial [38]. Si bien la actividad específica a 30 °C es aún baja (44e-6 min⁻¹), la oxidación biocatalítica de DBT a 80 °C con el empleo de un citocromo C modificado permitió aumentar la actividad a 4,7 min⁻¹ [39]. Por otro lado, los materiales biomiméticos con reconocimiento molecular específico han logrado disminuir en 18% el contenido de DBT de una solución modelo de 640 ppm de azufre a 30 °C [40]. La investigación en esta área del estampado molecular (molecular imprinting) se encuentra aún en su fase embrionaria por lo que no se prevé su aplicación industrial antes del 2005.

Un proceso industrial basado en la BDS requiere menos energía y genera una cantidad de CO₂ del orden del 20 al 27%, menor comparado con la convencional HDS como lo demostró un estudio realizado por Enchira Biotechnology Corp (EBC, antes Energy BioSystems).

Industrias como Arctic Slope Regional Corp. y Total Raffinage Distribution SA. realizaron ensayos en planta piloto de biodesulfuración de diesel desde fines de los años 90 pero no se espera la construcción de ninguna planta antes de 2005 [41, 42]. Otros centros de investigación tales como el Petroleum Energy Center of Japan (PECJ) junto con el King Abdulaziz City for Science and Technology (KACST, Arabia Saudita), varios laboratorios nacionales de EE.UU.A. y el IMP también realizaron esfuerzos en el desarrollo de un proceso de BDS. El escalamiento, la disponibilidad de equipo y la remodelación de refinerías existentes representaron problemas adicionales a la implementación de los procesos biológicos en refinería. Sin embargo, Paques Bio Systems BV and Shell International Oil Products utilizaron y comercializan actualmente un proceso de endulzamiento de gas por medio de una bacteria del género *Thiobacillus* para eliminar el ácido sulfhídrico, lo que representa un buen ejemplo de la capacidad de los procesos biológicos en la industria petrolera.

Eliminación de nitrógeno

El nitrógeno se encuentra de forma natural en el petróleo como compuestos de tipo no básico y básico y son el carbazol y la quinolina los compuestos más estudiados con respecto a su biodegradación. La eliminación parcial de los compuestos nitrogenados del

gasóleo por una hidrogenación (HDN) permite en una HDS posterior reducir el contenido de azufre de 16000 a 460 ppm a 360 °C en tanto que el gasóleo no desnitrogenado contiene 800 ppm de azufre (Murrieta F, 2002. Comunicación personal). Así es importante desde un punto de vista científico y tecnológico el desarrollo de procesos biológicos en la desnitrogenación de petrolíferos. Ciertas cepas de *Pseudomonas sp.* emplean tales compuestos como fuente de carbono, nitrógeno y energía [43, 44] y los genes que intervienen han sido identificados, caracterizados y clonados en *E. coli* [45,46]. El grupo de Benedik en 1998 [47] consideró dos aplicaciones potenciales para este tipo de cepas no específicas de nitrógeno: la desnitrogenación de petróleo y derivados y la disminución de la inhibición de los catalizadores de HDS. Sin embargo, en opinión de algunos especialistas, el hidrotatamiento convencional es más conveniente para la refinación del petróleo debido a su alta eficiencia y disponibilidad. La BDS no específica podría utilizarse sólo para la biorremediación de sitios contaminados por derrames.

En tanto la biodesulfuración específica ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, existe poca información sobre la eliminación biológica de compuestos organonitrogenados del petróleo y derivados sin afectar su valor calorífico. Recientemente, investigadores del Institute of Gas Technology (EE.UU.) y Petrobras (Brasil) aislaron y obtuvieron por mutagénesis la cepa *Pseudomonas ayucida* IGTN9m que utiliza a la quinolina como única fuente de nitrógeno sin transformar el resto del hidrocarburo. El tratamiento de un crudo pesado (*shale oil*) con los restos celulares de la cepa mencionada eliminó el 5 y el 68 % del nitrógeno total y de quinolina, respectivamente [48]. La biorefinación de combustibles fósiles requerirá la desnitrogenación específica de otro tipo de compuestos como los pirroles, indoles, carbazoles y acridinas. Por ejemplo, el producto de la oxidación de carbazol por la lacasa de *C. gallica* condensa y polimeriza en una solución acuosa de acetonitrilo al 15% [49]. Este hecho permitió vislumbrar el uso de estas enzimas en la desnitrogenación de petrolíferos.

Biodesintegración del petróleo y eliminación de metales

Las propiedades y el valor económico del petróleo dependen de fracciones tales como los hidrocarburos saturados y aromáticos, resinas y asfaltenos. El petróleo puede describirse fácilmente en términos de ligero y pesado, éste último caracterizado por un incremento del contenido de carbono y de heteroátomos como el nitrógeno, azufre y oxígeno. El petróleo contiene además metales, principalmente vanadio y níquel, en forma de sales en la fracción de asfaltenos que son fácilmente eliminados durante el proceso de desalado del petróleo y en metaloporfirinas de difícil eliminación debido a su estructura compleja [3]. Estos metales pesados son corrosivos, inhibidores de los catalizadores usados en refinación y son emitidos en forma de óxidos tóxicos durante la combustión de los combustibles.

Los asfaltenos son responsables de la formación de incrustaciones en las instalaciones petroleras que dis-

minuye el flujo y la producción de coque de menor valor agregado. Además, el procesamiento del residuo de destilación —constituido principalmente por asfaltenos y metaloporfirinas— es de gran interés para los refinadores debido a la tendencia de tratar una mayor cantidad de petróleo pesado de diferentes fuentes en el futuro inmediato, por ejemplo, de tierras bituminosas y yacimientos en costa (*off-shore*).

Los procesos biológicos pueden ser una opción económica y ambientalmente viable para la ruptura o biodesintegración de las estructuras asfálticas para obtener un petróleo de mayor valor agregado. Varios laboratorios nacionales de los EE.UU., la universidad de Alberta y el IMP están actualmente realizando investigación básica en esta área (Tabla 3). Se conocen diversas bacterias extremófilas, p. ej. *Achromobacter*, *Leptospirillum*, *Pseudomonas*, *Sulfolobus*, *Thiobacillus sp.*, las cuales transforman al petróleo pesado en ligero [50, 51]. Se sugiere que los biocatalizadores interactúan con los sitios organometálicos contenidos en el crudo pesado y redistribuyen y dividen las fracciones altamente polares. El crudo biotratado contiene una mayor cantidad de hidrocarburos saturados así como una menor cantidad de azufre, nitrógeno y metales, por lo que se le puede considerar como un crudo ligero.

Por otro lado, varios estudios han demostrado la posibilidad de emplear biotecnologías para romper la estructura envolvente y liberar los metales atrapados. En efecto, la hidrometalurgia emplea microorganismos termófilos para tratar sulfuros minerales como la pirita y la arsenopirita en la producción de minerales como oro, cobre y zinc. Sin embargo, se ha comprobado que la química de liberación de metales prevalece sobre la actividad microbiana [52, 53]. La misma aproximación podría realizarse para remover los metales de los asfaltenos por medio de enzimas oxidativas. En efecto, la CPO de *Caldariomyces fumago* desmetaliza a los asfaltenos por cloración y apertura subsecuente del anillo porfirínico y alcanza un rendimiento de eliminación del níquel y el vanadio de 93 y 53%, respectivamente [54]. Otro estudio mostró la ventaja de utilizar al Citocromo c reductasa de *Bacillus megaterium* y *Catharanthus roseuse* en la oxidación del anillo porfirínico en vez de halogenarlo. Se previene así la formación de productos halogenados que son indeseables debido a su toxicidad [55]. Finalmente, el tipo de crudo condiciona el alcance de la biodesmetalización cuando se utiliza una cepa de *Achromobacter* BNL-4-23. En efecto, el biotratamiento de un crudo pesado y de un crudo pretratado con vapor permitió reducir para el primero las concentraciones de nitrógeno y asfaltenos; mientras que para el segundo crudo, disminuyeron las concentraciones de hidrocarburos aromáticos, azufre y metales [50].

Prospectiva tecnológica

La metodología para la formulación de la perspectiva tecnológica implicó la identificación de los retos tecnológicos así como las correspondientes biotecnologías que permitirían cumplir con los hitos establecidos. Se visualizó entonces el posible impacto de la biorefinación en la producción de combustibles limpios y en el mejoramiento del petróleo crudo en los próximos años (Figura 3). Asimismo, las biotecnologías deberán resolver ciertos cuellos de botella técnicos para poder aplicarse exitosamente en la refinación del petróleo (Tabla 3).

Tabla 3. Mapa tecnológico de la biorefinación

Impulsor	Corto plazo (0-5 años)	Mediano plazo (5-10 años)
	<ul style="list-style-type: none"> Caracterización del petróleo Química del petróleo Métodos para el análisis de trazas Métodos forensicos Biocatalizador Búsqueda de nuevos microorganismos incluyendo de ambientes extremos Aislamiento y purificación de enzimas Búsqueda de enzimas sin dependencia de cofactor Cristalografía: estudios estructurales Mutagénesis para lograr una amplia especificidad y mejor actividad 	<ul style="list-style-type: none"> BDN directa de destilados intermedios antes de la HDS Acoplamiento de la BDS y la BDN en el procesamiento del petróleo Proceso integrado BDS/BDN para el tratamiento de efluentes ricos en compuestos organoazufrados oxidados Conocimiento básico del mejoramiento biológico de crudo pesado y fondo de barril Proceso integrado de mejoramiento biológico de crudo pesado y fondo de barril
1. Diesel y gasolina de ultra bajo azufre (<15-ppm)	<ul style="list-style-type: none"> Caracterización cinética Tolerancia a disolvente 	
2. Reducción de compuestos nitrogenados en destilados intermedios	<ul style="list-style-type: none"> Química de la membrana y pared celular Mutagénesis enfocada en la resistencia a disolventes 	
3. Mejoramiento de petróleo pesado, tierras bituminosas y shale oil: reducción de la fracción asfáltica y de metales (Ni, V)	<ul style="list-style-type: none"> Microorganismos recombinantes Inmovilización de biocatalizadores Ingeniería de proteínas (inmovilización, derivatización, cristales y plásticos bio catalíticos) Ingeniería Transporte de masa: fisicoquímica de la membrana celular Bioproducción de agentes tensioactivos o adición externa Nuevos soportes de inmovilización: core/shell, materiales mesoporosos Tecnología de separación Extracción líquido-líquido Tecnología de ruptura de emulsiones Extracción sólido-líquido Destilación Destilación flash Reingeniería de proceso 	

Klein y colaboradores en 1999 [12] señalaron que la actividad y estabilidad biocatalítica así como la importante cantidad de agua utilizada en los bioprocesos representan la principal limitación para la aplicación de la BDS. En efecto, la biorefinación del petróleo debe considerar las limitaciones técnicas de los biocatalizadores, el volumen de agua requerido y los problemas de transferencia de masa tanto de las cepas identificadas, por ejemplo, *Rhodococcus*, *Pseudomonas sp.*, así como de las enzimas: Dsz, CPO, Citocromo c, Lacasas. Además, el grupo de Dordick en 1998 [56] identificó tres biotecnologías claves para el desarrollo de la industria futura: nuevas cepas de ambientes extremos, ingeniería metabólica y síntesis enzimática de productos químicos.

Mapa tecnológico de la biorefinación

El avance realizado en los últimos años en BDS deberá servir como modelo en la I y DT en BDN y mejoramiento de petróleo en dos periodos de tiempo. La primera fase esta enfocada a 5 años para la resolución de problemas básicos y la generación de conocimientos

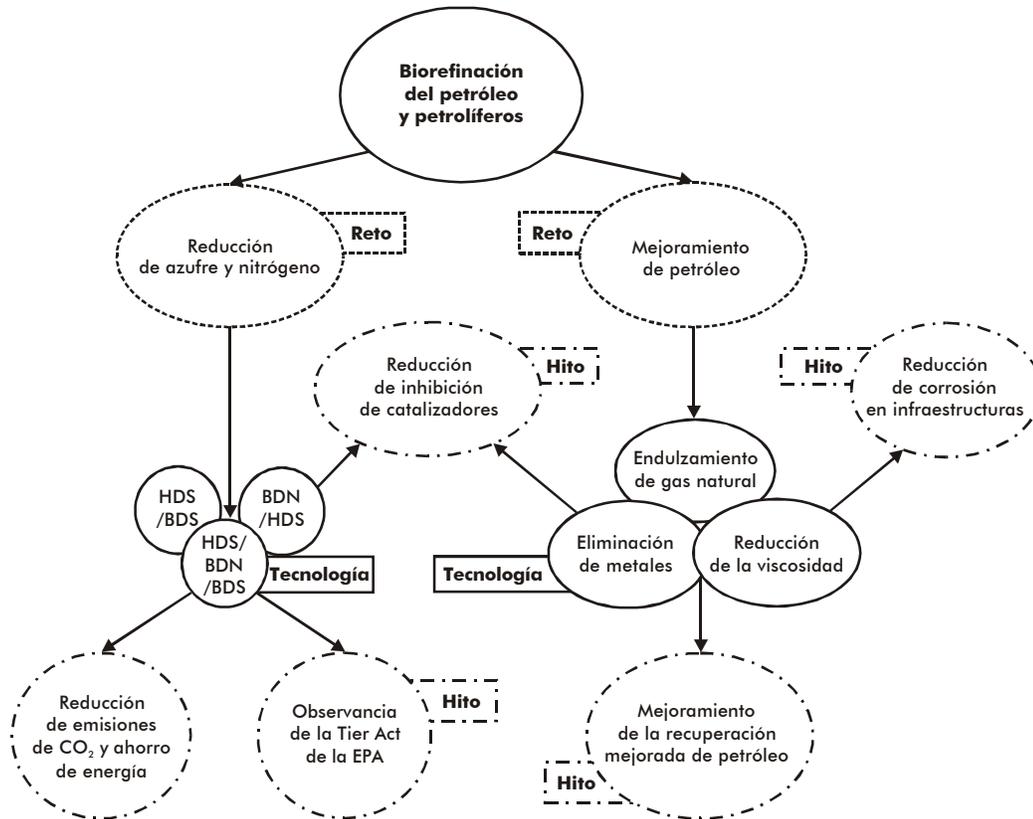


Figura 3. Visión de la biorefinación en el siglo XXI.

to. La segunda fase, considerada para 5-10 años, incluye la entrada en vigor de las normas ambientales propuestas por la EPA. Esta fase se concentrará en la ingeniería de proceso como son la transferencia de masa y energía, reingeniería de procesos, reducción de la contaminación cruzada de azufre durante el transporte y el almacenamiento (Tabla 2).

La solución a la problemática de actividad enzimática y tolerancia a disolventes debe incluir la búsqueda de nuevos microorganismos extremófilos, sistemas enzimáticos independientes de coenzimas, producción de agentes tensioactivos así como el mejoramiento de velocidades de reacción y especificidad. Los biocatalizadores entendidos como células completas o enzimas deberán resistir el contacto o inmersión en un medio líquido de alta hidrofobicidad como la gasolina, diesel o gasóleo (*log P* de 8,25 para hexano). Además, los biocatalizadores deberán ser activos y estables a una temperatura superior a los 50°C así como tener una especificidad amplia para los diversos compuestos organoazufrados y organonitrogenados presentes en los diversos derivados petroleros. El progreso acumulado en el mejoramiento de la estabilidad y actividad de otros sistemas enzimáticos en disolventes orgánicos deberá aplicarse a los biocatalizadores de importancia en la biorefinación [32].

La problemática de transferencia de masa deberá comprender el mejoramiento de la emulsión agua-aceite para aumentar la migración de los substratos desde el petróleo hacia el biocatalizador así como la

eliminación de metabolitos tóxicos como el HBP. El contenido de agua utilizado debe ser nulo o mínimo de tal manera que se mantenga la actividad y estabilidad del biocatalizador así como se facilite la separación de la emulsión agua-aceite. En el caso del mejoramiento biológico del crudo pesado, el volumen de agua empleado no es tan importante debido a que grandes cantidades de agua se usan cotidianamente en la recuperación secundaria lo que permitiría la adición directa de los biocatalizadores. La bioproducción o adición de agentes tensioactivos en cada bioproceso deberá evaluarse para incrementar la velocidad de reacción, la extensión y la facilidad de la ruptura de la emulsión. El estudio de la química de la membrana celular y de la ingeniería del bioproceso estudiarían entonces el problema de transferencia de masa a dos niveles: el transporte del petróleo a la fase acuosa y de esta al interior de las células o al centro activo de las enzimas. Asimismo, el proceso de separación de la emulsión deberá ser eficiente, económico y no afectar el medio ambiente.

La comprensión de los mecanismos biológicos que intervienen en la biodesulfuración, biodesnitrogenación y mejoramiento del petróleo permitirán diseñar y producir catalizadores específicos de alta actividad y robustez. Los avances recientes en estampado molecular permiten actualmente el diseño de matrices poliméricas con capacidad de reconocimiento molecular y catálisis, es decir, se han logrado materiales biomiméticos de las enzimas. Los nuevos materiales mesoporosos

de escala nanométrica pueden ser ideales catalizadores biomiméticos o ser utilizados como soportes de las mismas. De esta manera, los próximos años podrán ver la aparición de una nueva ciencia basada en la biotecnología y la nanotecnología.

Enchira Biotechnology Corp. visualizó la biodesulfuración de diesel desde dos perspectivas diferentes: 1) la HDS es substituida por la BDS en la desulfuración de una corriente de destilado intermedio de 2000 a 500 ppm; 2) la desulfuración se efectúa por un proceso acoplado HDS-BDS en un diesel de 500 a 50 ppm [41]. Si se considera una velocidad de biodesulfuración de 37 ppm DBTs*min⁻¹*g catalizador⁻¹ propuesta por Monticello [14] la BDS de diesel se llevaría a cabo en menos de 1 hr para ambas opciones y que corresponde a los tiempos de resistencia habituales de la HDS. Sin embargo, el proceso acoplado HDS-BDS es más factible en el corto plazo debido a que sólo se necesitaría una mínima remodelación de las refinerías para lograr una velocidad de desulfuración de hasta un orden de magnitud menor. Asimismo, la eliminación de los compuestos organonitrogenados antes de la HDS permitiría una mejor eficiencia y extensión de la eliminación de los compuestos organoazufrados. Este enfoque no ha sido investigado debido al bajo contenido de nitrógeno en el petróleo (<2%) y a que la HDS lo elimina como amoníaco, sin embargo, podría desarrollarse una tecnología biodesnitrificante en el corto plazo para disminuir la inhibición de los catalizadores de HDS.

La investigación futura se enfocará igualmente en la mutagénesis sitio específica o al azar para la selección de mutantes de actividad mejorada, por ejemplo, la combinación de varios fenotipos de desulfuración, re-

sistencia a los disolventes y a las altas temperaturas así como la producción de agentes tensioactivos. Las enzimas desulfurantes deberán ser purificadas, cristalizadas, determinada su estructura y cinética. La modificación física y/o química de las enzimas por medio de interacciones enzima-emulsionante o encapsulamiento en matrices poliméricas son ejemplos de investigación futura en el ramo.

La explotación de petróleo crudo a partir de fuentes pesadas como las tierras bituminosas (*tar sands*) requiere de la inyección de crudo ligero o gasóleo para disminuir la viscosidad y facilitar su bombeo y distribución. Las tierras bituminosas son consideradas una fuente no convencional de petróleo, no obstante, son de gran interés económico debido a que sólo las reservas de Canadá representan 300,000 millones de barriles [57] cifra superior a los 261,000 millones de la reserva de Arabia Saudita en 2001. La explotación industrial de las tierras bituminosas es una oportunidad para las biotecnologías que transformen directamente en los yacimientos o durante el almacenamiento al petróleo pesado en ligero. Existen microorganismos como los hongos que tiene la capacidad de oxidar a los asfaltenos, responsables de la viscosidad en el crudo y por ende, del mejoramiento del flujo y el bombeo (Pickard MA, 2002. Comunicación personal). Este mismo enfoque puede aplicarse en la utilización de enzimas como las peroxidasas y las lacasas. La investigación futura deberá también incluir la determinación de las propiedades fisicoquímicas del petróleo crudo y biotratado de gran interés en ingeniería de procesos así como en la determinación de la factibilidad tecnico-económica de los bioprocesos propuestos.

- Aburto J, Rojas-Avelizapa N, Quintero-Ramirez R. Biotecnología. En: Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), editor. *Prospectiva de la investigación y el desarrollo tecnológico del sector petrolero al año 2025*. México: IMP; 2001. p. 135-47.
- Instituto Mexicano del Petróleo. *Prospectiva de la investigación y el desarrollo tecnológico del sector petrolero al año 2025*. México: El Instituto; 2001.
- Speight JG. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1998.
- Hamer G, Al-Awadhi N. *Biotechnological applications in the oil industry*. *Acta Biotechnol* 2000;20:335-50.
- US Environmental Protection Agency (USEPA), Tier 2 Act. (Julio 1998).
- Gonzalez RG. Can you make low-sulphur fuel and remain competitive?. *Hart's Fuel Technol Manag* 1996; Nov-Dec:56-61.
- Energy Information Agency (EIA). *The transition of ultra-low-sulfur diesel fuel: Effects on prices and supply*. Available from: URL: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/service/rpt/ulsd>
- Kim H, Kim Y, Kim BH. Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide. *Biotechnol Lett* 1990;12:761-4.
- Kodama K, Umehara K, Shimizu K, Nakatani S, Minoda Y, Yamada K. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric Biol Chem* 1973;37:45-50.
- Malik KA. Microbial removal of organic sulphur from crude oil and the environment: some new perspectives. *Process Biochem* 1978;13:10-3.
- McFarland BL, Boron DJ, Deever W, Meyer JA, Johnson AR, Atlas RM. Biocatalytic sulphur removal from fuels: applicability for producing low sulphur gasoline. *Crit Rev Microbiol* 1998;24:99-147.
- Klein J, Catcheside DEA, Fakoussa R, Gazso L, Fritsche W, Hoefler M, et al. Biological processing of fuels. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52: 2-15.
- Ohshiro T, Izumi Y. Microbial desulfurization of organic sulphur compounds in petroleum. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:1-9.
- Monticello DJ. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Op Biotechnol* 2000;11:540-6.
- Afferten van M, Schacht S, Klein J, Truuper H G. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO. *Arch Microbiol* 1990;153:324-8.
- Monticello DJ, Baker DT, Finnerty WR. Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:756-60.
- Rhee SK, Chang JH, Chang HG. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel by a newly isolated *Gordonia* strain, CYKS1. *App Environ Microbiol* 1998;64:2327-31.
- Gallagher JR., Olson ES, Stanley DC. Microbial desulfurization of dibenzothiophene. A sulphur specific pathway. *FEMS Microbiol Lett* 1993;107:31-6.
- Kilbane II, JJ, inventors; Institute of Gas Technology, assignee. Microbial cleavage of organic C-S bonds. US patent 5,358,869. 1994 Oct 25.
- Folsom BR, Schieche DR, DiGrazia PM, Werner J, Palmer S. Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4967-72.
- Piddington CS, Kovacevich BR, Rambossek R. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGT58. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:468-75.
- Gray KA, Pogrebinsk OS, Mrachko GT, Xi L, Monticello DJ, Squires CH. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat Biotechnol* 1996;14:1705.
- Gallardo ME, Fernández A, De Lorenzo V, García JL, Diaz E. Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J Bacteriol* 1997;179:7156-60.
- Ohshiro T, Izumi Y. Purification, characterization and crystallization of enzymes for dibenzothiophene desulfurization. *Bioseparation* 2000;9:185-8.
- Reichmuth DS, Hittle JL, Blanch HW, Keasling JD. Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* oxidoreductase

- gene. *Biotechnol Bioeng* 2000;67:72-9.
26. Izumi Y, Ohshiro T. Purification and characterization of enzymes involved in desulfurization of dibenzothiophene in fossil fuels. *J Mol Cat B-Enzym* 2001;11:1061-4.
27. Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheirloomom A, Tanaka E, Katoh S. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem Eng J* 2001;8:151-6.
28. Han JW, Park HS, Kim BH, Shin PG, Park SK, Lim JC. Potential use of nonionic surfactants in the biodesulfurization of bunker-C oil. *Energy Fuel* 2001;15:189-96.
29. Borole AP, Kaufman EN, Grossman MJ, Minak-Bernero V, Lee MK. Comparison of the emulsion characteristics of *Rhodococcus erythropolis* and *Escherichia coli* SOXC-5 cells expressing biodesulfurization genes. *Biotechnol Progr* 2002;18:88-93.
30. Isken S, Derk A, Wolfes PFG, de Bont JAM. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2631-5.
31. Furuya T, Kirimura K, Kino K, Usami S. Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives by *Mycobacterium phlei* WU-F1⁺. *FEMS Microbiol Lett* 2001;204:129-33.
32. Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001;409:241-6.
33. Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. Polycyclic aromatic hydrocarbons metabolism by White Rot Fungi and Oxidation by *Corioliopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:380509.
34. Johannes C, Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:524-8.
35. Majcherczyk A, Johannes C. Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *BBA* 2000;1474:157-62.
36. Ayala M, Tinoco R, Hernández V, Bremuntz P, Vazquez-Duhalt R. Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Process Technol* 1998;57:101-11.
37. Ayala M, Robledo NR, Lopez-Munguia A, Vazquez-Duhalt R. Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ Sci Technol* 2000;34:2804-9.
38. Ryu K, Heo J, Yoo IK. Removal of dibenzothiophene and its oxidized product in anhydrous water-immiscible organic solvent by immobilized cytochrome c. *Biotechnol Lett* 2002;24:143-6.
39. Vazquez-Duhalt R. Cytochrome c as a biocatalyst. *J Mol Cat B-Enzym* 1999;7:241-9.
40. Castro B, Whitcombe MJ, Vulfson EN, Vazquez-Duhalt R, Barzana E. Molecular imprinting for the selective adsorption of organo sulphur compounds present in fuels. *Anal Chim Acta* 2001;435:83-90.
41. Linguist L, Pacheco M. Enzyme-based diesel desulfurization process offers energy, CO₂ advantages. *Oil Gas J* [serial online] 1999 Feb. Available from: URL: <http://ogj.pennnet.com/home.cfm>
42. Plotkin J, Swanson A. Petroleum in the 21st Century. New technologies key to revamping petrochemicals. *Oil Gas J* [serial online] Dec 1999. Available from: URL: <http://ogj.pennnet.com/home.cfm>
43. Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev* 1996;60:483-98.
44. Fetzer S. Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;49:237-50.
45. Sato SI, Nam JW, Kasuga K, Nojiri H, Yamane H, Omori T. Identification and characterization of genes encoding Carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J Bacteriol* 1997;179:4850-8.
46. Sato SI, Ouchiyama N, Kimura T, Nojiri H, Yamane H, Omori T. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequence of genes and characterization of meta-cleavage enzymes and hydrolase. *J Bacteriol* 1997b;179:4841-9.
47. Benedik MJ, Gibbs PR, Riddle RR, Wilson RC. Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends Biotechnol* 1998;16:390-5.
48. Kilbane II, JJ, Ranganathan R, Cleveland L, Kayser KJ, Ribiero C, Linhares MM. Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m. *App Environ Microbiol* 2000;66:688-93.
49. Bressler DC, Fedorak PM, Pickard MA. Oxidation of carbazole, p-ethylcarbazole, fluorene and dibenzothiophene by the laccase of *Corioliopsis gallica*. *Biotechnol Lett* 2000;22:1119-25.
50. Premuzic ET, Lin MS, Bohenek M, Zhou WM. Bioconversion reactions in asphaltenes and heavy crude oils. *Energy Fuel* 1999;13:297-304.
51. Premuzic ET, Lin MS, inventors; Brookhaven Science Associates, assignee. Biochemical upgrading of oils. US Patent 5,858,766. 1999b Jan 12.
52. Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 1997;29:591-604.
53. Huber H, Stetter KO. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *J Biotechnol* 1998;64:39-52.
54. Fedorak PM, Semple KM, Vazquez-Duhalt R, Westlake DWS. Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb Tech* 1993;15:429-37.
55. Xu GW, Mitchell KW, Monticello DJ, inventors; Energy Biosystems Corporation, assignee. Process for demetalizing a fossil fuel. US patent 5,624,844. 1997 Apr 29.
56. Dordick JS, Khmelinsky YL, Sergeeva MV. The evolution of biotransformation technologies. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:311-8.
57. DeBaie B. Resource base, pipeline networks position canadian producers for greater share of US oil and gas demand. *Oil Gas J* [serial online] Jun 1999. Available from: URL: <http://ogj.pennnet.com/home.cfm>

Recibido en Noviembre de 2001. Aprobado en Febrero de 2002.