

IDEA

Fundación Instituto de Estudios Avanzados



MINISTERIO
DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA



BIOMEJORAMIENTO DEL CRUDO EXTRAPESADO CAMPO CARABOBO MEDIANTE ENZIMAS EXTRACELULARES DE HONGOS FILAMENTOSOS

Tutor Académico:

Prof. Cotte, Edgar

Presentado por:

Br. Maluenga, Manuel

Tutores Industriales:

Dr. Naranjo, Leopoldo

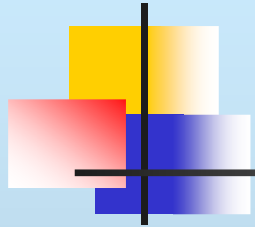
Dr. León, Vladimir

Caracas, Julio de 2007



Puntos a tratar

- Planteamiento del problema
- Objetivos
- Propuesta biotecnológica
- Revisión Bibliográfica
- Marco metodológico, resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones



Planteamiento del Problema

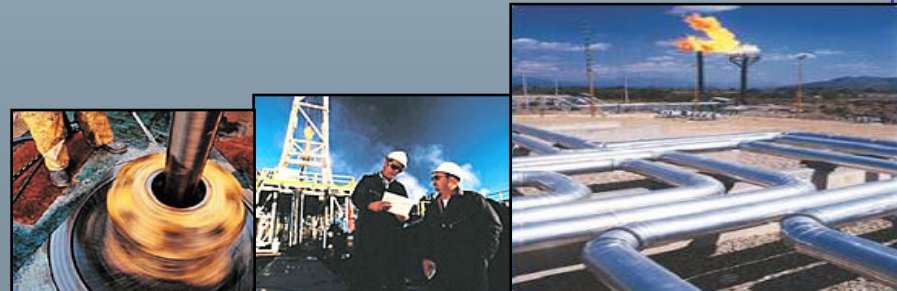
Demanda y reservas de crudo

- La creciente demanda mundial de combustibles (estimada en 520 millones de barriles de petróleo para el año 2007).
- El detrimento de los crudos livianos y la necesidad de explotar los crudos extrapesados.
- Alrededor del 90% del crudo extrapesado (CXP) en el mundo esta localizado en la faja petrolífera del Orinoco.



Propiedades del crudo extrapesado (CXP)

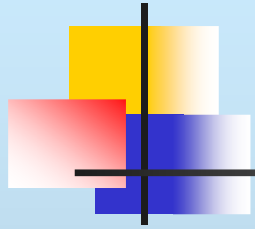
- ✓ El CXP de la FPO posee un bajo valor comercial.
 - ✓ Contiene altas concentraciones de asfaltenos y resinas.
 - ✓ Posee heteroátomos, tales como: S, N y O.
 - ✓ Posee metales pesados como Ni y V.
- Estas propiedades adversas originan serios problemas operacionales durante la extracción, transportación y refinación.
- ✓ Mayores requerimientos energéticos en los procesos de refinación
 - ✓ Disminución en la eficiencia de estos procesos
 - ✓ Menor beneficio económico



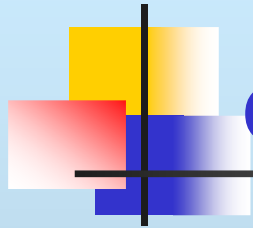
Tecnologías de mejoramiento del CXP

- Los métodos convencionales de mejoramiento del CXP implican grandes costos, son poco selectivos y altamente contaminantes (generan altas cantidades de subproductos tóxicos y contaminantes como el coque y el azufre).
- El uso de la biotecnología como herramienta complementaria para fortalecer las tecnologías productivas en la industria petrolera, permitiría mejorar los crudos de la FPO y asegurar su desarrollo sustentable





Objetivos



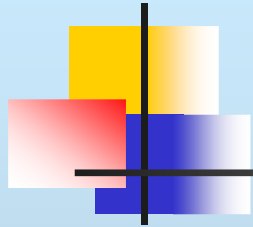
Objetivo General

Estudiar la bioquímica de las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39, en caldos de cultivo; y su efecto sobre las propiedades físico-químicas del crudo extrapesado campo Carabobo de la faja petrolífera del Orinoco.



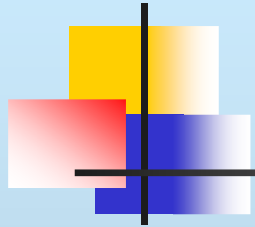
Objetivos Específicos:

- Estudiar la actividad enzimática extracelular de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39, en caldos de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía (afrecho y crudo extrapesado) a diferentes tiempos de incubación.
- Determinar las mejores condiciones de incubación (fuente de carbono y energía y tiempo de incubación), donde los hongos producen una mayor actividad enzimática extracelular.
- Seleccionar, aislar y preservar las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 producidas en caldos de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía.



Objetivos Específicos:

- Determinar las propiedades físico-químicas del crudo extrapesado (densidad, composición mediante el análisis SARA) antes y después de aplicar el tratamiento biológico con las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos.
- Realizar el análisis de destilación simulada al crudo extrapesado campo Carabobo luego de aplicar el tratamiento con las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos.



Propuesta Biotecnológica

¿Qué es la biotecnología?

La biotecnología es el uso racional de la naturaleza, donde se estudia y aprovecha la biodiversidad y sus recursos genéticos para lograr un bien o servicio para el hombre y el ambiente (Naranjo y col., 2007).

BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL PETRÓLEO



“Biomejoramiento de crudos extrapesados”

- ✓ Reduciendo la aromaticidad total
- ✓ Transformación biológica/ enzimática de asfaltenos
- ✓ Remoción de heteroátomos y metales pesados
- ✓ Valor agregado a los CXP
- ✓ Un mayor valor comercializable

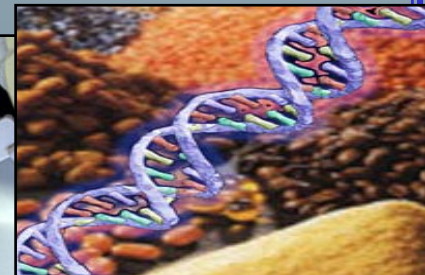
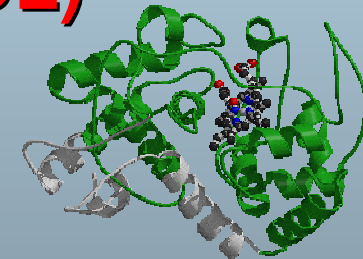


Estrategia biotecnológica ¿cómo lograrlo?

Conversión enzimática Parcial de Asfaltenos

Utilizando el Sistema Enzimático Oxidativo de Degradación de Lignina (SEDL)

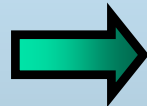
presente en hongos



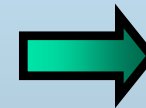
¿Por qué?



Hongos degradadores de lignina



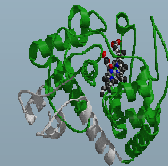
Poseen un único y poderoso SEDL no específico y extracelular



Enzimas que oxidan una gran diversidad de sustratos orgánicos (Ej. Lignina y HPAs, etc.)

El SEDL incluye un amplio rango de oxidoreductasas tales como:

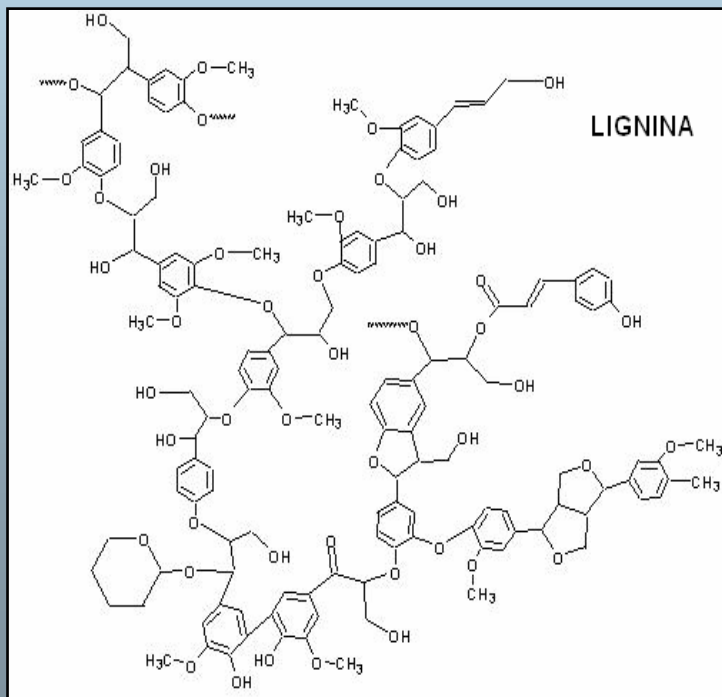
- ✓ **Lacasas**
- ✓ **Peroxidasas ligninolíticas** (lignina peroxidasa, Manganeso peroxidasa, peroxidasa versátil, etc)



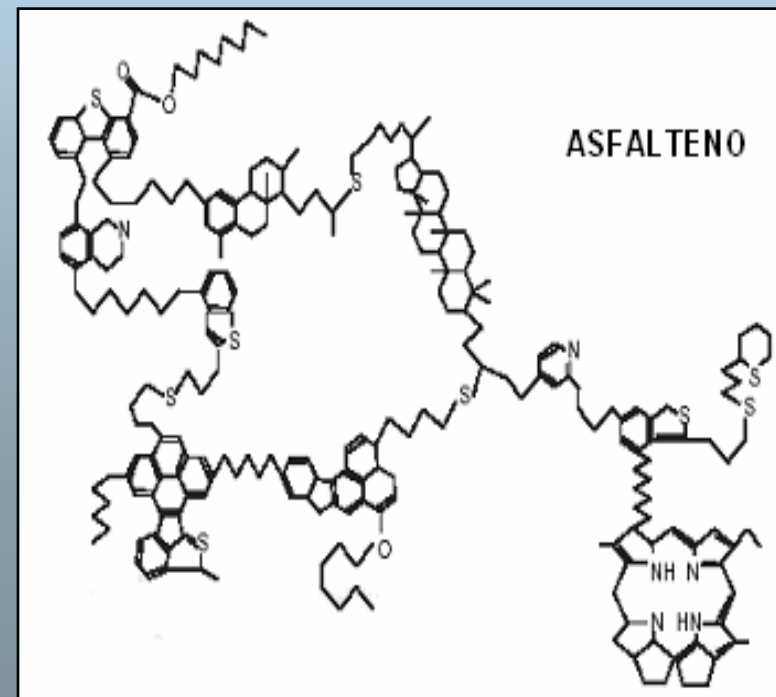
Oxidoreductasas: catalizan reacciones en las que tiene lugar una oxidación del sustrato y la reducción de un aceptor (Ej. O_2 ; H_2O_2). Estas enzimas actúan sobre enlaces $CH-OH$, $C=O$, $C=CH$, $CH-NH_2$ y $CH-NH-$

¿Por qué?

La **lignina** es un polímero heterogéneo, amorfo y altamente ramificado muy similar a las moléculas de resinas y asfaltenos. Posee un peso molecular entre 600-1000 kDa.



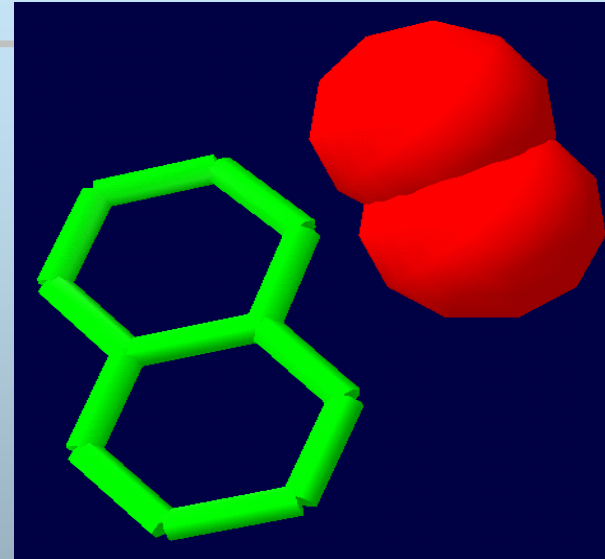
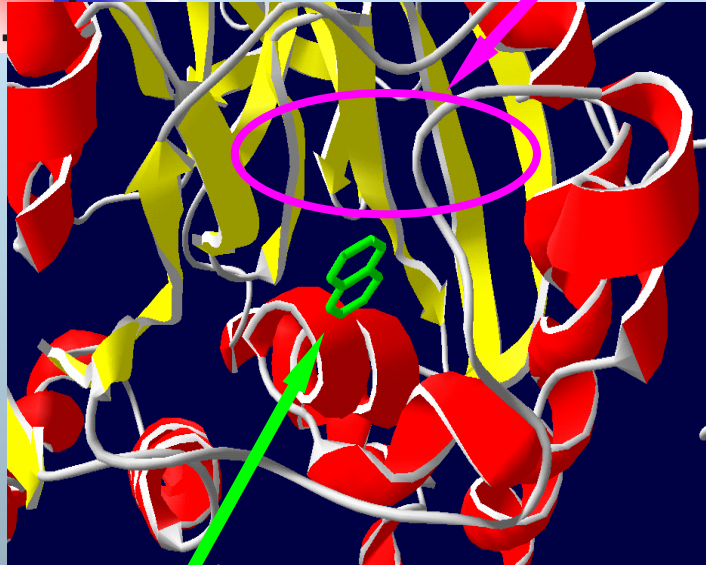
(Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006)



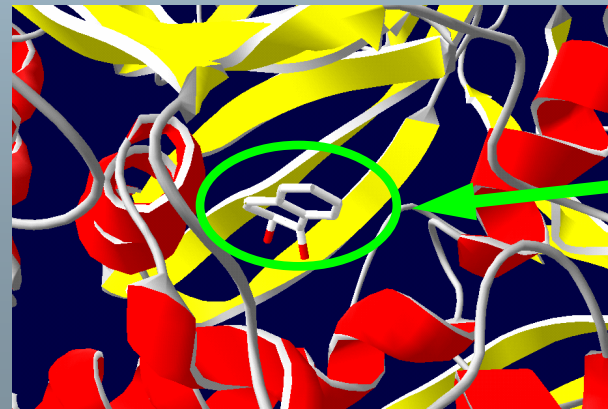
(Murgich, Abanero y Strausz, 1999)

Posible esquema de oxidación del naftaleno

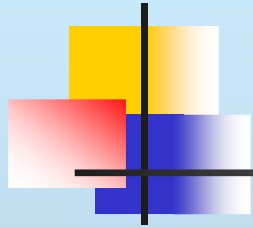
Sitio activo de la enzima



Molécula de naftaleno



Molécula de
naftaleno oxidada



Revisión Bibliográfica

Aspectos importantes relacionados al CXP

■ Breve descripción de la faja petrolífera del Orinoco (FPO)

- ✓ La FPO está considerada como la mayor acumulación de petróleo pesado y extrapesado en el mundo
- ✓ Sus reservas en el sitio se estiman en 1,5 millones de millones de barriles de crudo
- ✓ Posee una superficie de 55.314 Km²
- ✓ El campo tiene cuatro áreas principales de producción: Carabobo, Ayacucho, Junín y Boyacá

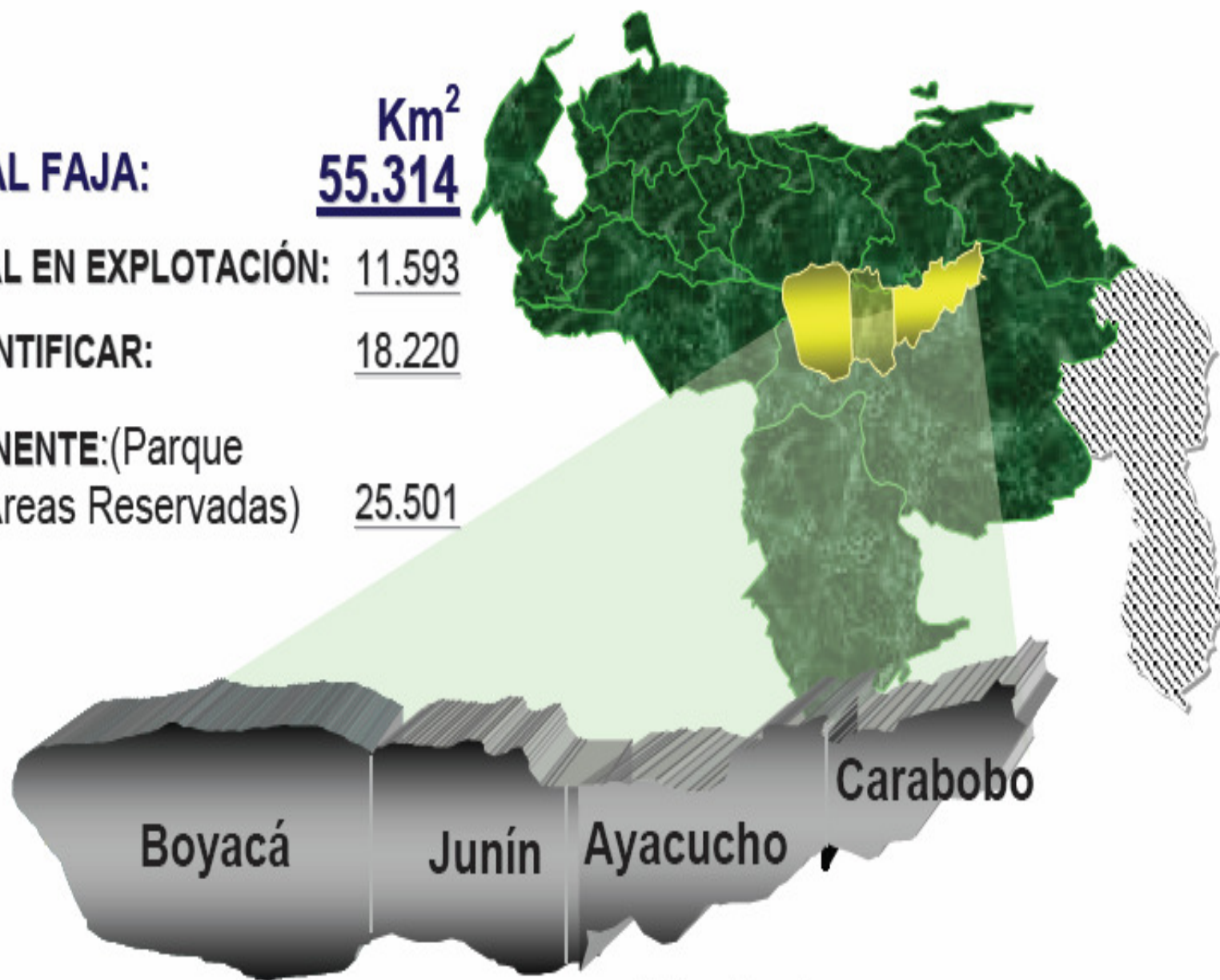


ÁREA TOTAL FAJA: **55.314** Km²

ÁREA ACTUAL EN EXPLOTACIÓN: 11.593

ÁREA A CUANTIFICAR: 18.220

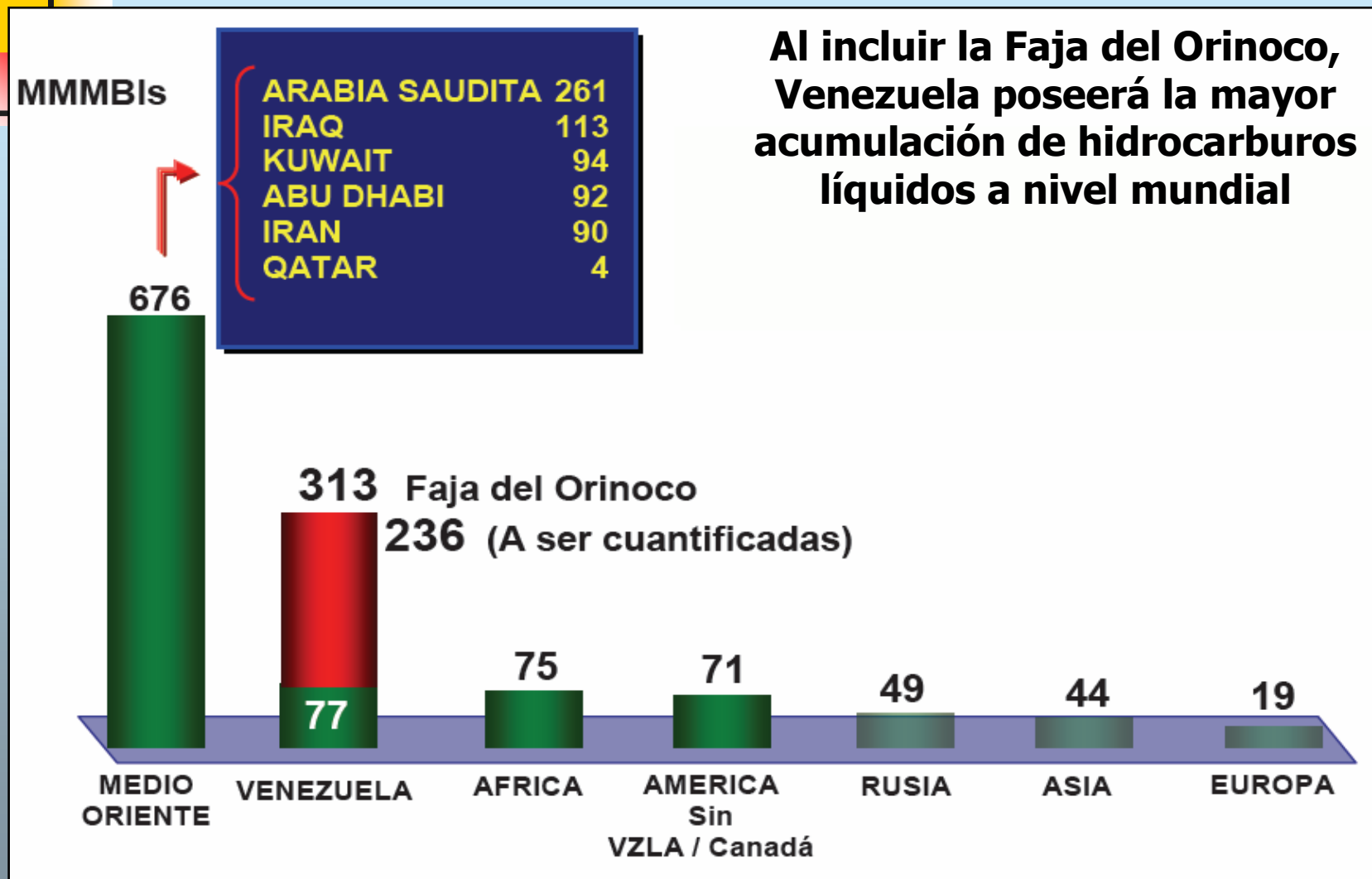
ÁREA REMANENTE:(Parque Nacional y Áreas Reservadas) 25.501



(Potellá y Quiroz, 2006)

Río Orinoco

Reservas de crudo a nivel mundial y en Venezuela



MMMB: Miles de Millones de Barriles

(Potellá y Quiroz, 2006)



Evaluación de las propiedades de un crudo

Propiedades Físicas

- ✓ **La densidad** (mejor indicador para evaluar el valor del recurso)
- ✓ **La viscosidad** (propiedad que mas afecta la producción)

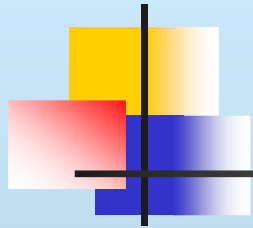
Composición química :

Análisis SARA

Saturados, **Aromáticos**, **Resinas** y **Asfaltenos**

Orden creciente de Peso Molecular

SATURADOS < **AROMATICOS** < **RESINAS** < **ASFALTENOS**



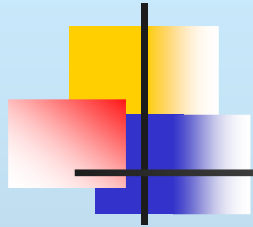
Asfaltenos

Los asfaltenos se definen de acuerdo a su solubilidad y no por su estructura. Son la fracción del petróleo de mayor polaridad y mayor peso molecular (600-1500 Da).



- ✓ Poseen heteroátomos tales como (S, N y O)
- ✓ Poseen metales (V y Ni)

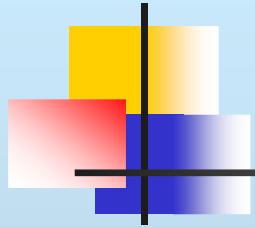




Asfaltenos: Problemas en la industria

Los asfaltenos generan diversos problemas en el manejo del CXP:

- ✓ Taponamiento en equipos
- ✓ Precipitación en oleoductos
- ✓ Iniciadores de la formación de coque en los procesos catalíticos
- ✓ Envenenamiento de catalizadores (presencia de metales pesados)



Antecedentes



Aislamiento de hongos autóctonos con potencial enzimático en el mejoramiento de los CXP de la FPO

Naranjo y León colaboradores



2007

“Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil ”(Biocatalysis and Biotransformation)

Proponen el uso de enzimas oxidativas extracelulares (EOE) a partir del sistema enzimático de hongos que degradan la lignina (SEDL), como catalizadores biológicos, para el mejoramiento enzimático del CXP de la FPO en Venezuela.



Aislamiento de hongos autóctonos con potencial enzimático en el biomejoramiento de CXP de la FPO

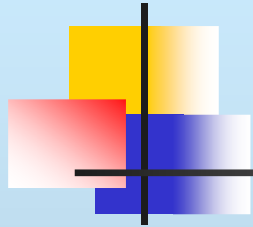
Naranjo y León colaboradores



2007

Conclusiones:

- Ensayos fenotípicos revelaron la capacidad de estos hongos filamentosos para sintetizar EOE sugiriendo así una relación entre el SEDL y la bioconversión del CXP.
- Se demostró que el hongo *F. solani* posee una alta capacidad para catabolizar HPA`s y CXP.
- Las actividades de estas enzimas fueron inducidas poderosamente por el CXP, por lo que queda establecida una relación hipotética entre el SEDL y la bioconversión del CXP.



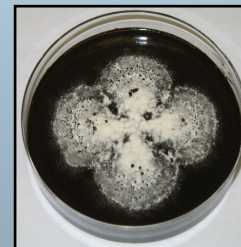
Metodología, Resultados y Discusión

Hongos seleccionados

Se seleccionaron los hongos: BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39

- Mantenimiento y crecimiento de los hongos provenientes del Banco de Microorganismos de la Unidad de Biotecnología del Petróleo (IDEA)

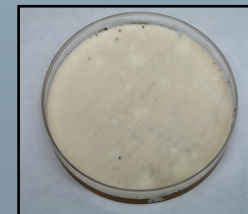
Medio de cultivo
Cz^P; ¼ sacarosa y
1% CXP (Se incuba
a 30°C por 5 días)



Crecimiento del
hongo

Placas Madre

Medio de cultivo
Power (Se incuba a 30°C
por 5 días mínimo)



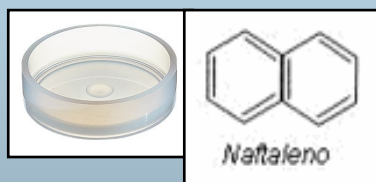
Crecimiento del
hongo

Placas de Masa

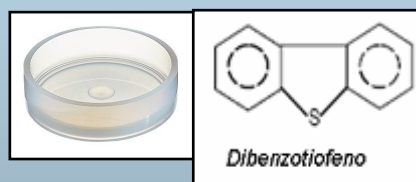
Caracterización fenotípica

- ✓ Capacidad de crecimiento de los hongos empleando diversos HPAs como única fuente de carbono y energía

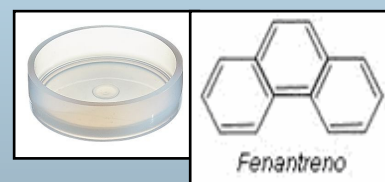
Naftaleno



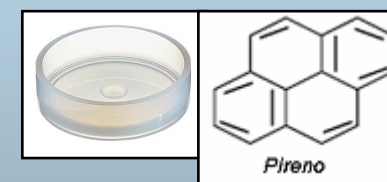
DBT



Fenantreno

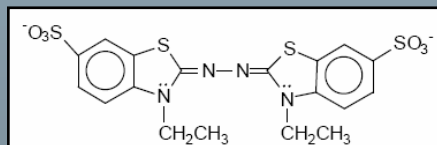


Pireno

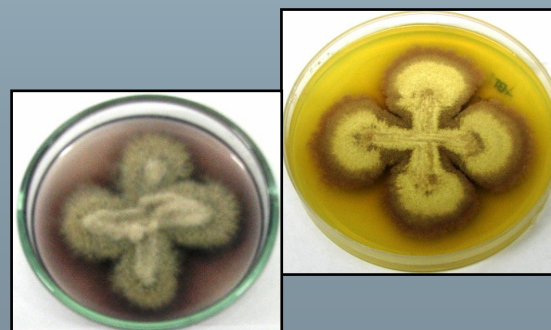


- ✓ Capacidad de producción de enzimas oxidativas extracelulares (EOE) en placas de cultivo mediante un ensayo colorimétrico empleando ABTS como sustrato

ABTS



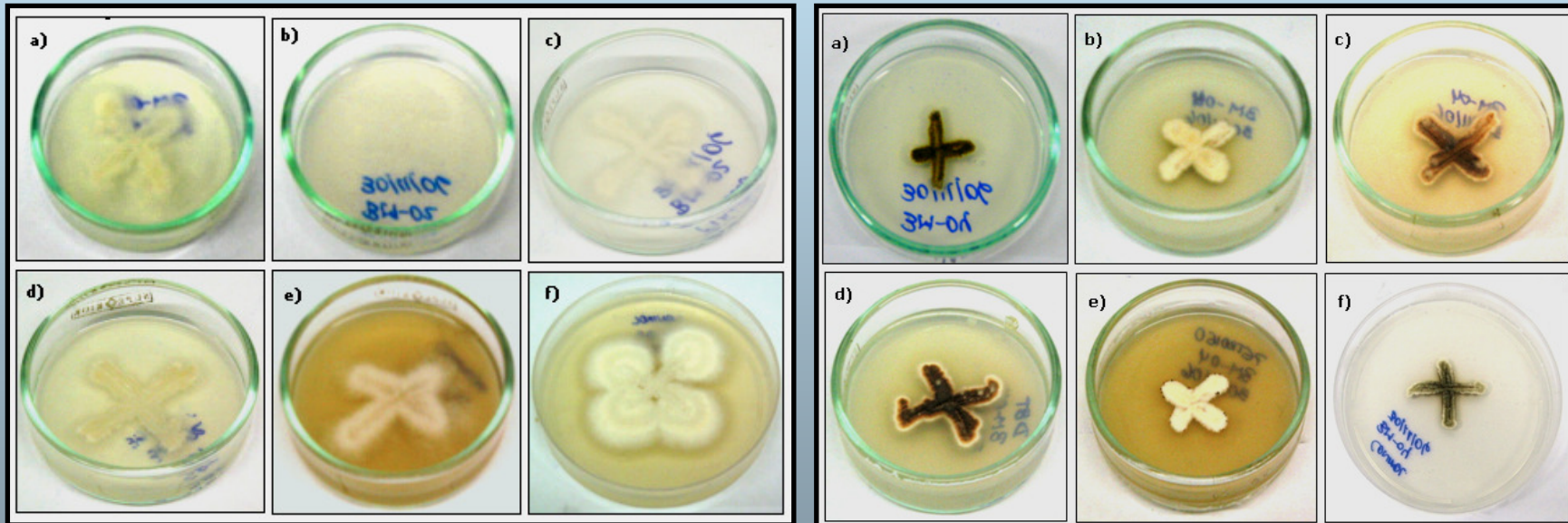
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)



Crecimientos de los hongos usando HPAs y CXP como únicas fuentes de carbono y energía.

Hongo BM-02

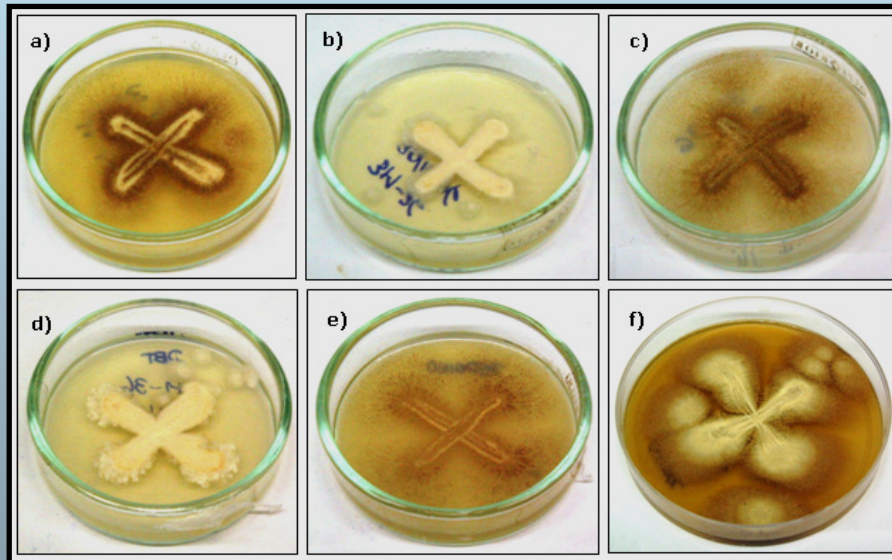
Hongo BM-04



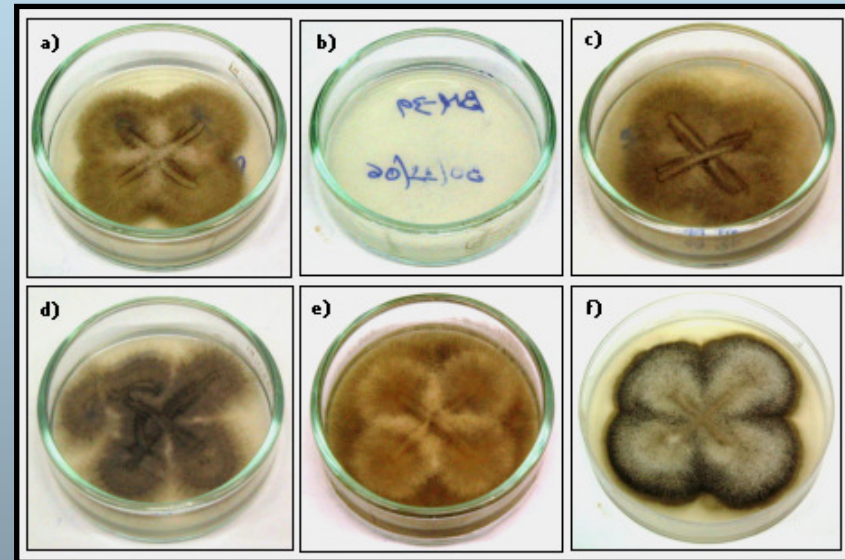
Crecimiento de los hongos BM-02 y BM-04 a los 14 d en medio mínimo Cz suplementado con: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno, d) DBT, e) CXP, y e) sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

Crecimientos de los hongos usando HPAs y CXP como únicas fuentes de carbono y energías

Hongo BM-36



Hongo BM-39



Crecimiento de los hongos BM-36 y BM-39 a los 14 d en medio mínimo Cz suplementado con: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno, d) DBT, e) CXP, y e) sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

Crecimientos de los hongos usando HPAs y CXP como únicas fuentes de carbono y energía.

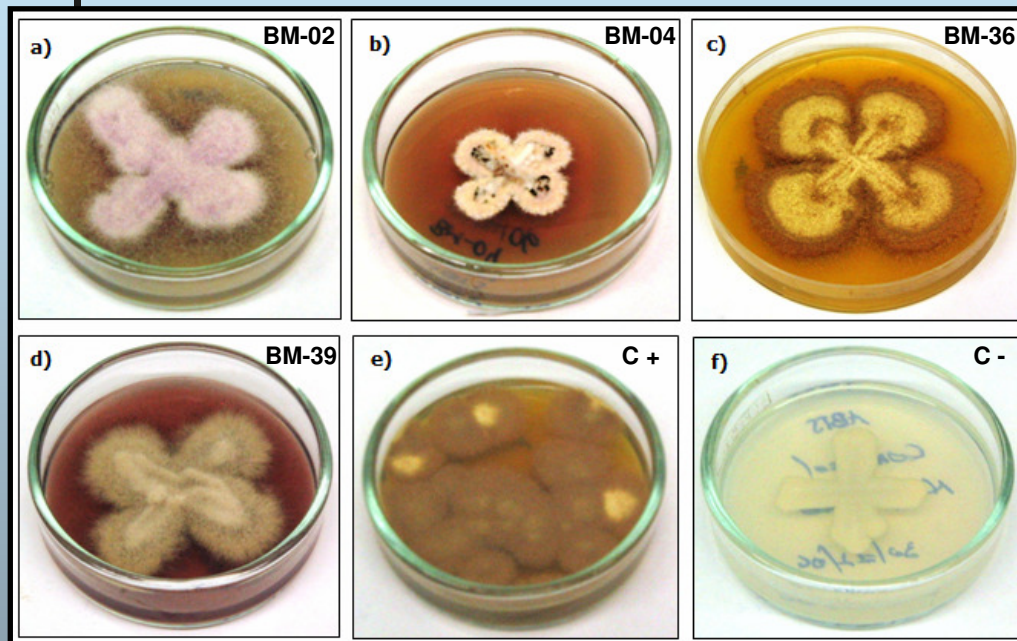
Cepa	Medio de cultivo Cz suplementado					
	NAF	FEN	PIR	DBT	CXP	SAC
BM-02	++	-	++	++	++	++
BM-04	+	+	+	+	+	+
BM-36	++	++	++	++	++	+++
BM-39	++	-	+++	+++	+++	+++

NAF: Naftaleno, **FEN:** Fenantreno, **PIR:** Pireno y **SAC:** Sacarosa (control +)

(-): sin crecimiento, (+) crecimiento bajo, (++) crecimiento moderado y (+++) buen crecimiento

Las cepas fúngicas tienen potencial para utilizar HPAs y CXP como únicas fuentes de carbono y energía

Producción de EOE por cada hongo mediante el ensayo colorimétrico con ABTS



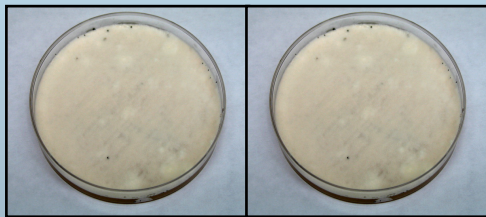
- Sin coloración (-): **Control (-)**
- Coloración baja (+): **BM-02**
- Coloración elevada (+++): **BM-04, BM-36, BM-39 y control(+)**

Ensayo colorimétrico con ABTS: a) BM-02, b) BM-04, c) BM-36, d) BM-39, e) *Pleurotus ostreatus* (control +) y; f) *Saccharomyces cerevisiae* (control -).

Potencial ligninolítico de hongos autóctonos aislados sugiere la existencia de EOE del sistema de degradación de lignina

Producción de Enzimas Oxidativas Extracelulares (EOE)

Placas de masa

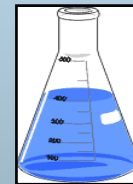


Crecimiento de los hongos en placas de masa con medio Power

Se incubaron en agitación orbital (250 rpm) a 30°C por 5 días. Se toma 1 mL de muestra de cultivo cada 24 h



Cx + 1% Afrecho



Cx + 1% CXP

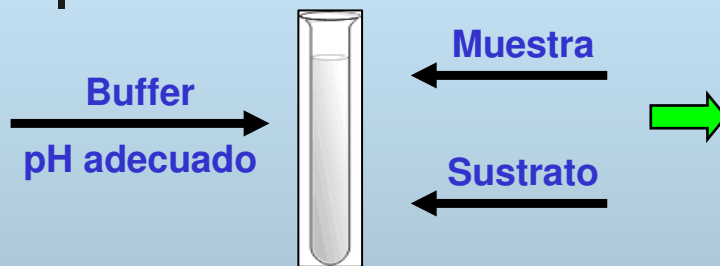


Cx + Sacarosa (control)

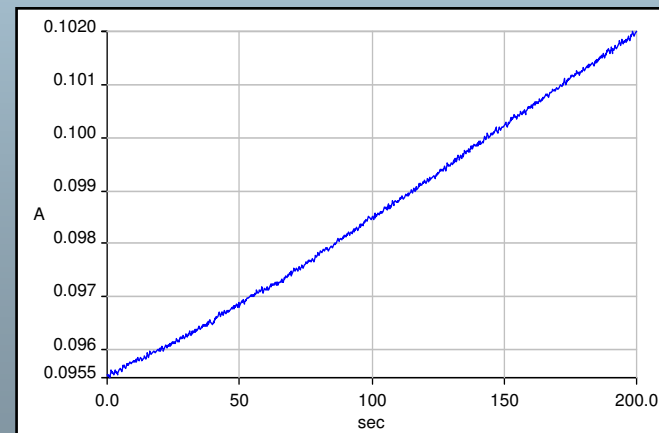


Muestra con glicerol, para almacenaje -70 °C

Estudios Enzimáticos



Espectrofotómetro Lambda 35 UV/VIS



$$A.E = \frac{\Delta abs}{\Delta t * V.s * \epsilon * b}$$

Donde:

AE: Actividad enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}.\text{mL}$)

Δabs : Variación de absorbancia (Adim)

t: tiempo de reacción (min)

Vs: Volumen de sobrenadante (mL)

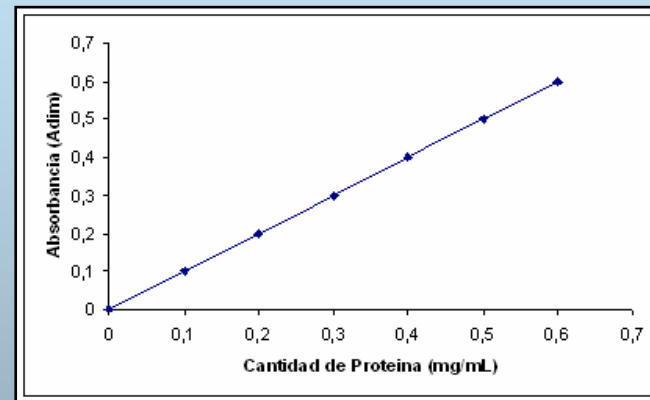
ϵ : Coeficiente de extinción molar ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

b: Grosor de la cubeta (cm)



Estudios Enzimáticos

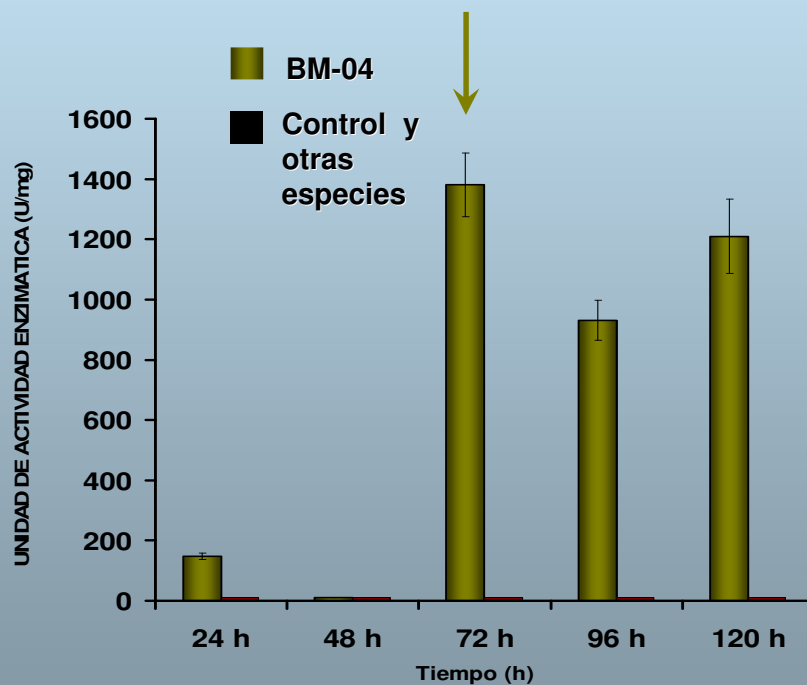
Se construyó
la curva de
calibración del
Bradford



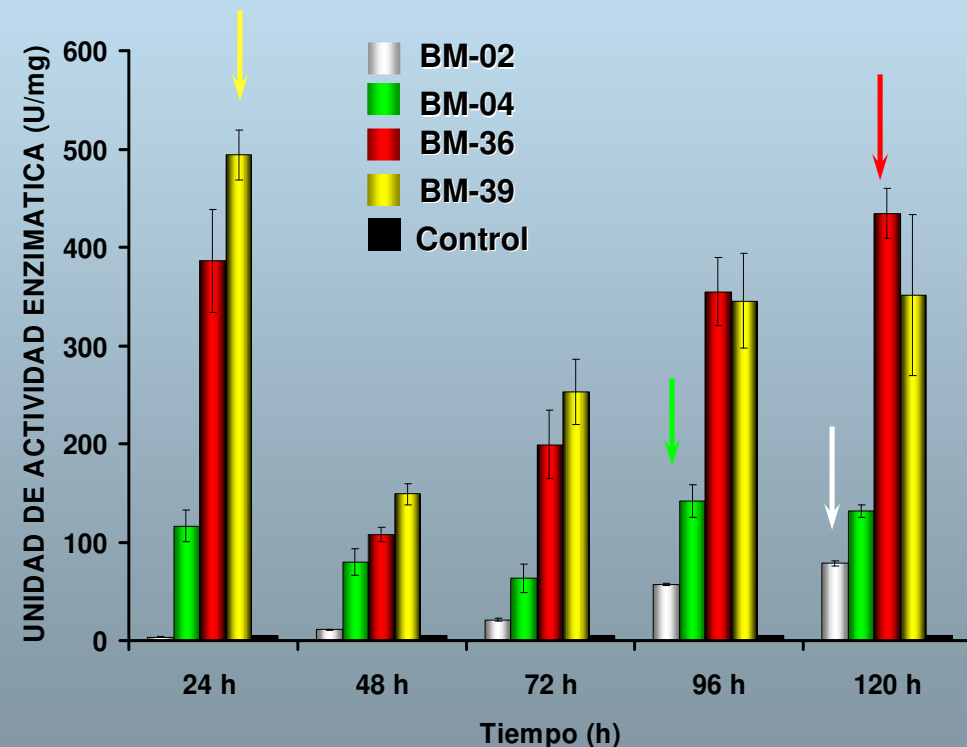
- ✓ Se determina la unidad de actividad enzimática (U/mg de proteína)
- ✓ Se construye la grafica U/mg vs. t

Actividad LACp inducida en afrecho y CXP como únicas fuentes de carbono y energía.

AFRECHO



CRUDO EXTRA-PESADO

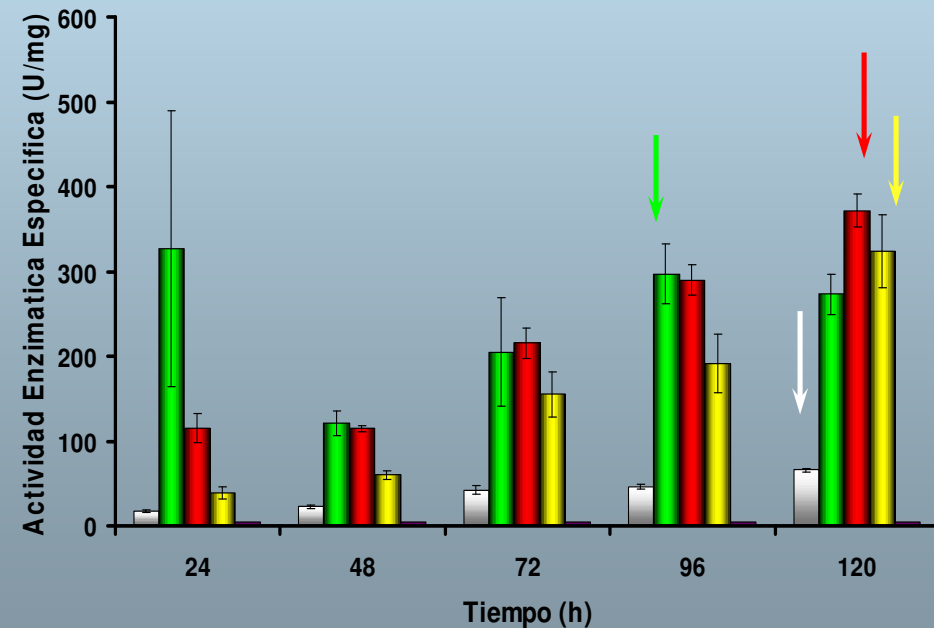
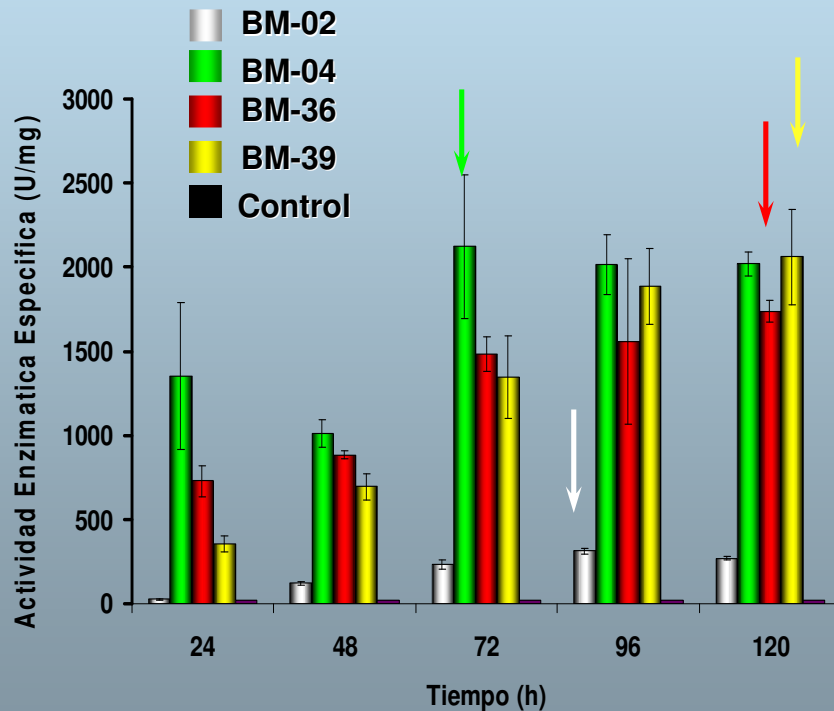


La actividad LACp de la cepa BM-04 fue inducida fuertemente por afrecho.

Actividad de LiPp y MnPp inducidas en CXP como única fuente de carbono y energía

Actividades LiPp

Actividades MnPp



La actividad de LiPp para todas las especies fue inducida fuertemente empleando CXP como sustrato.

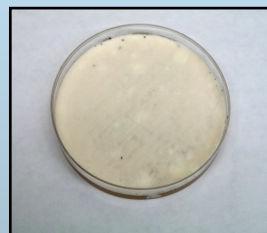


Determinación de las mejores condiciones de incubación, hongos y enzimas.

Hongo	Fuente de carbono y energía LACp	Fuente de carbono y energía LiPp	Tiempo de incubación LACp (h)	Tiempo de incubación LiPp (h)
BM-04	Afrecho	CXP	72	120
BM-36	CXP	CXP	120	120
BM-39	CXP	CXP	120	120

Se seleccionaron las cepas BM-04, BM-36 y BM-39, así como las actividades LACp y LiPp como biocatalizadores enzimáticos.

Liofilización, tratamiento enzimático del CXP y ruptura de la emulsión



Crecimiento de los hongos en placas de masa



Preparación de la emulsión



Inóculo de las cepas en 1% CXP, Afrecho



Fermentación



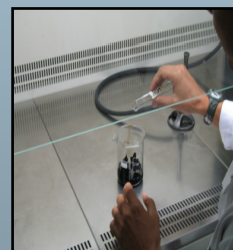
Condiciones de crecimiento (250 rpm a 30 °C)



Centrifugación del sobrenadante



Liofilización de las enzimas



Tratamiento enzimático del CXP



Condiciones del tratamiento (250 rpm, 30 °C)



Rompimiento de la emulsión (150-200 °C)

Determinación de las propiedades físico-químicas del CXP

Medición de la Gravedad API

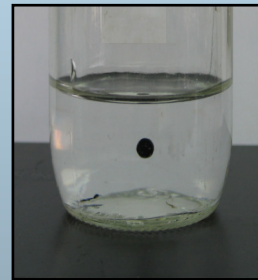
■ Flotabilidad del Crudo (Método IDEA, 2007)



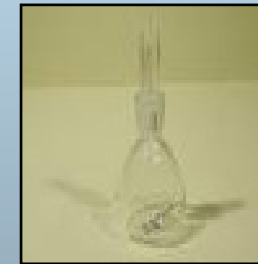
Se preparó una solución de NaCl



Se calentó una muestra de CXP



Densidad solución es igual a la densidad CXP



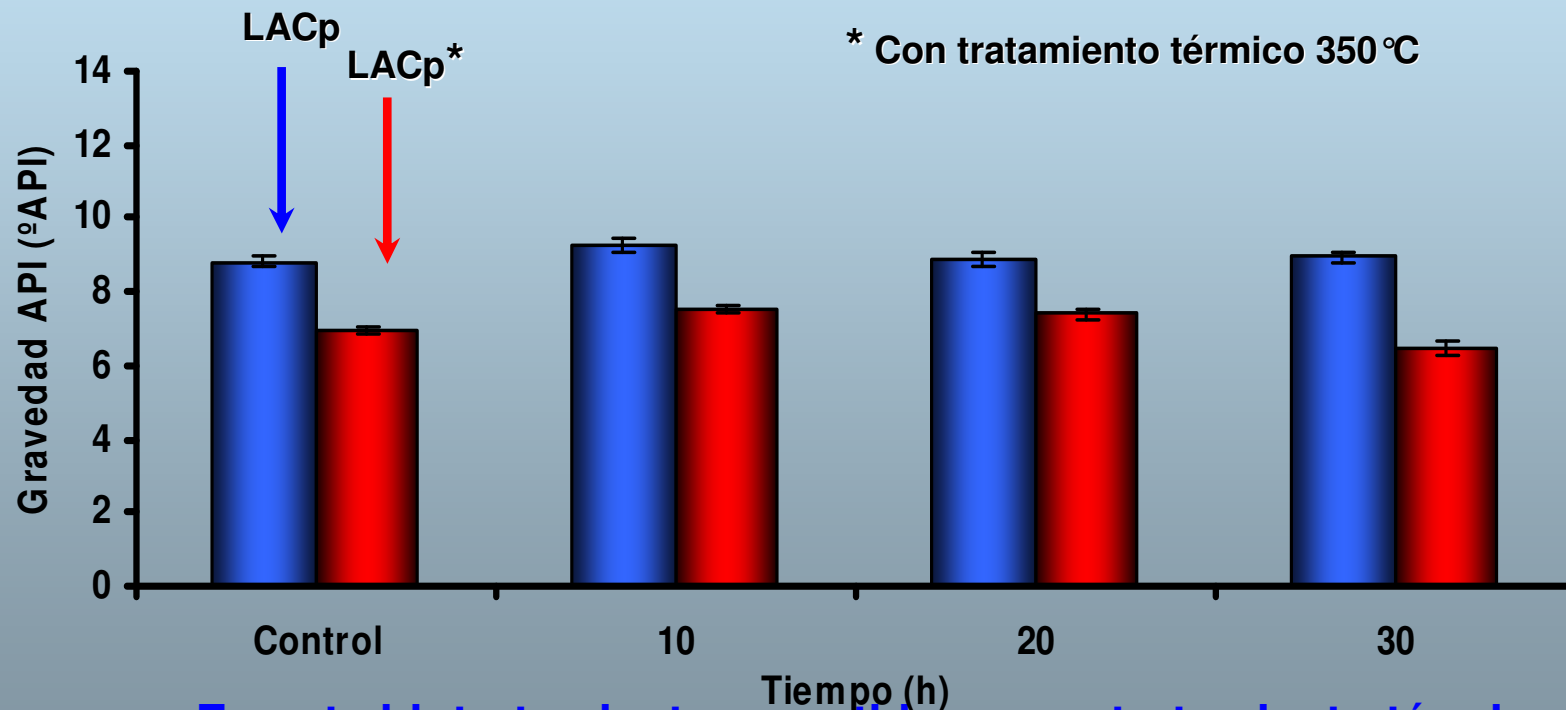
Método de picnometría



$$^{\circ}API = \frac{141.5}{S.G. \frac{60^{\circ}F}{60^{\circ}F}} - 131.5$$

Determinación de las propiedades físico-químicas del CXP

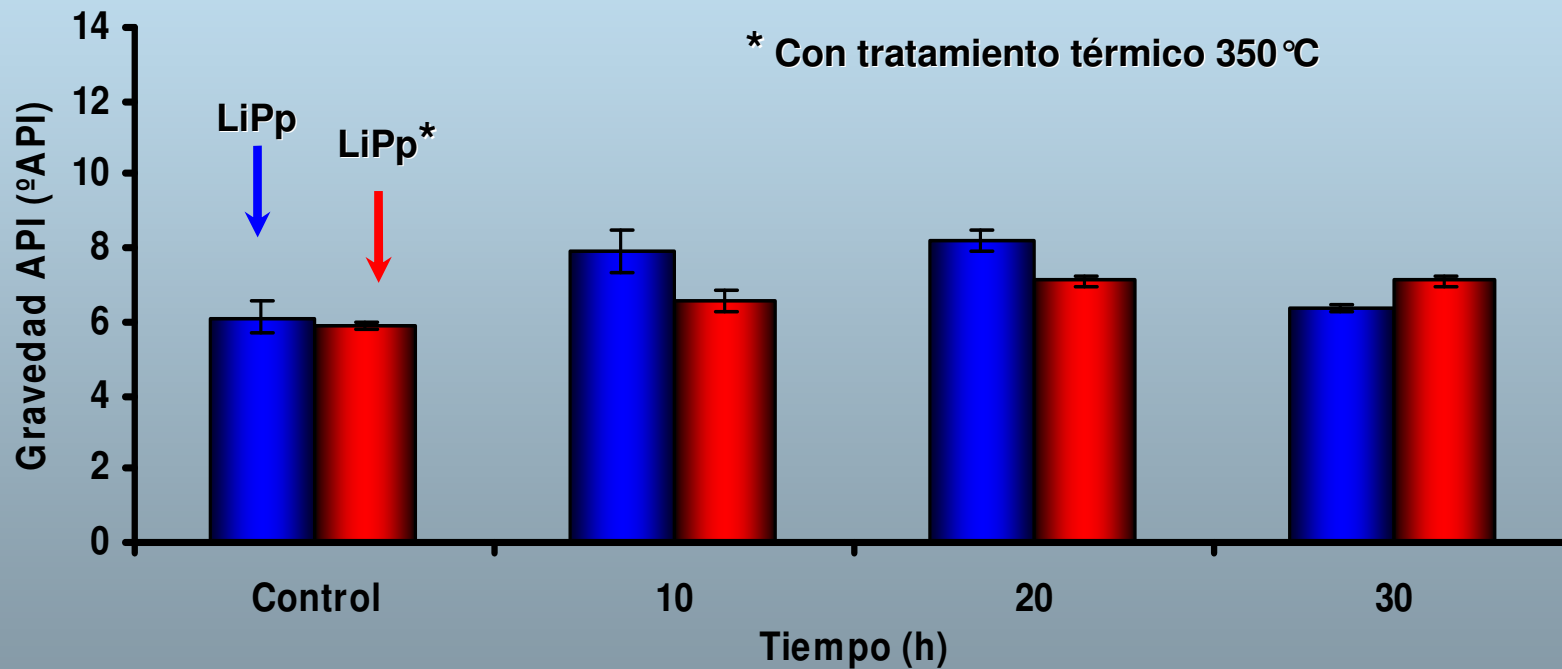
Gravedad API LACp



En este biotratamiento sometido o no a tratamiento térmico no se pudo obtener un crudo con una gravedad mayor 10 °API

Determinación de las propiedades físico-químicas del CXP

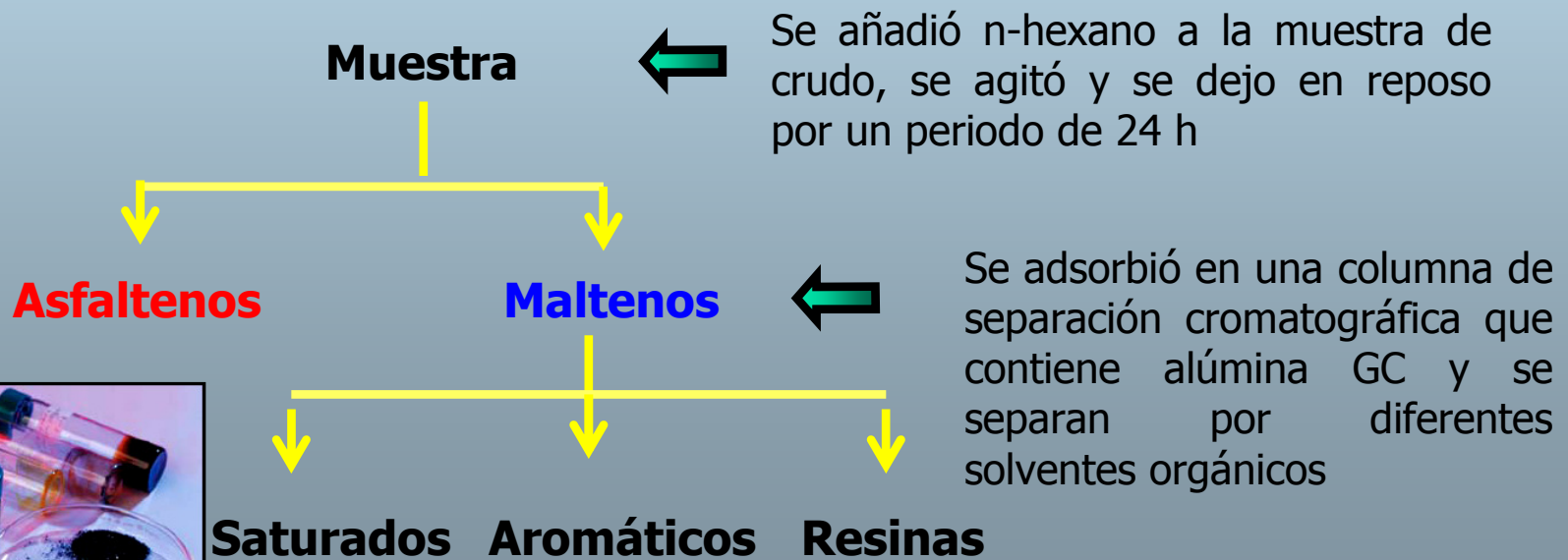
Gravedad API LiPp



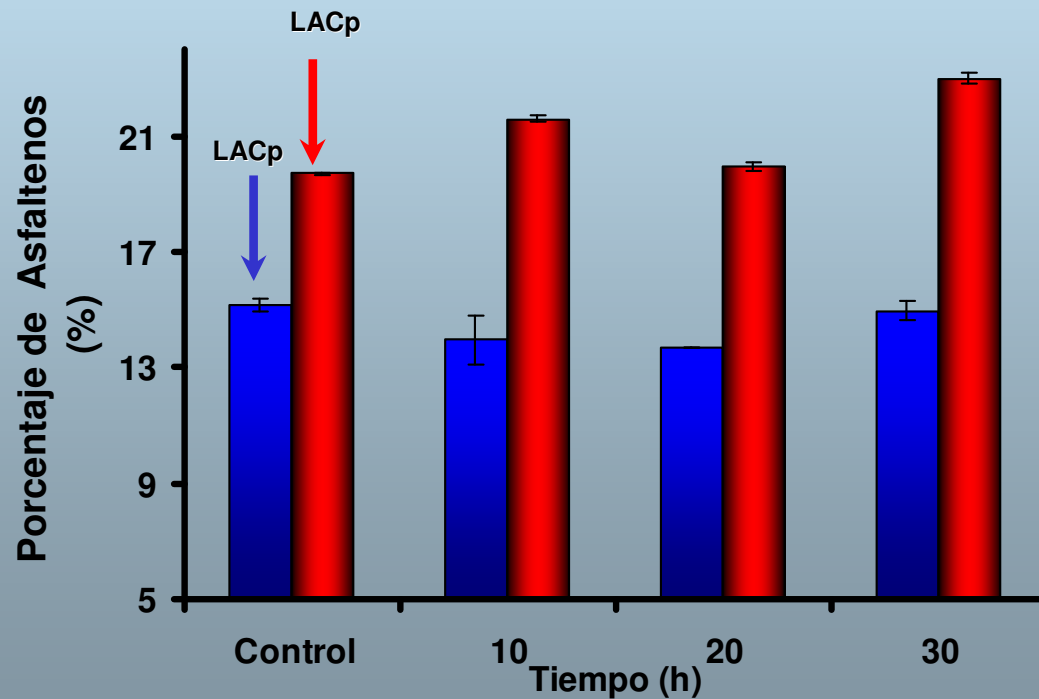
En este biotratamiento sometido o no a tratamiento térmico no se pudo obtener un crudo con una gravedad mayor 10 °API

Composición: Análisis SARA (ASTM- D-4124-01)

- El análisis **SARA** es la forma más común de lograr fracciones representativas del petróleo



Precipitación de asfaltenos



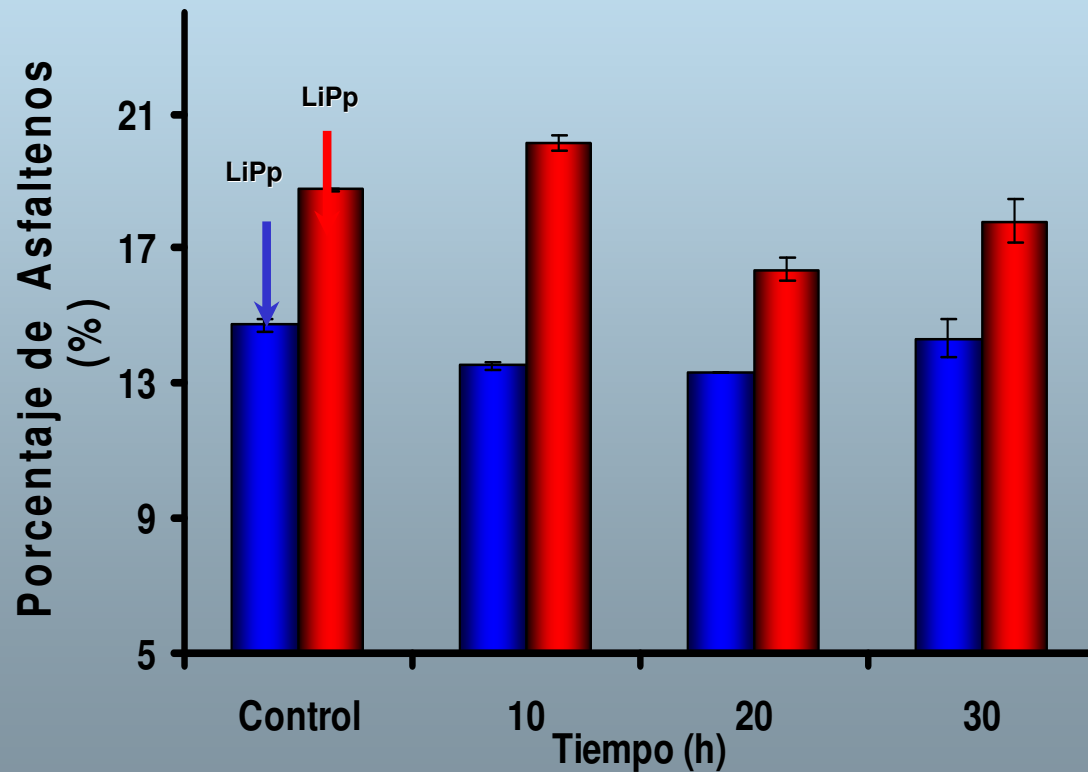
Sin tratamiento térmico:

➤ Conversión de asfaltenos mayor 1 % hasta las 20 h de tratamiento con LACp.

Con tratamiento térmico:

➤ Producción de asfaltenos alrededor del 2 % en las muestras biotratadas con LACp

Precipitación de asfaltenos



Sin tratamiento térmico:

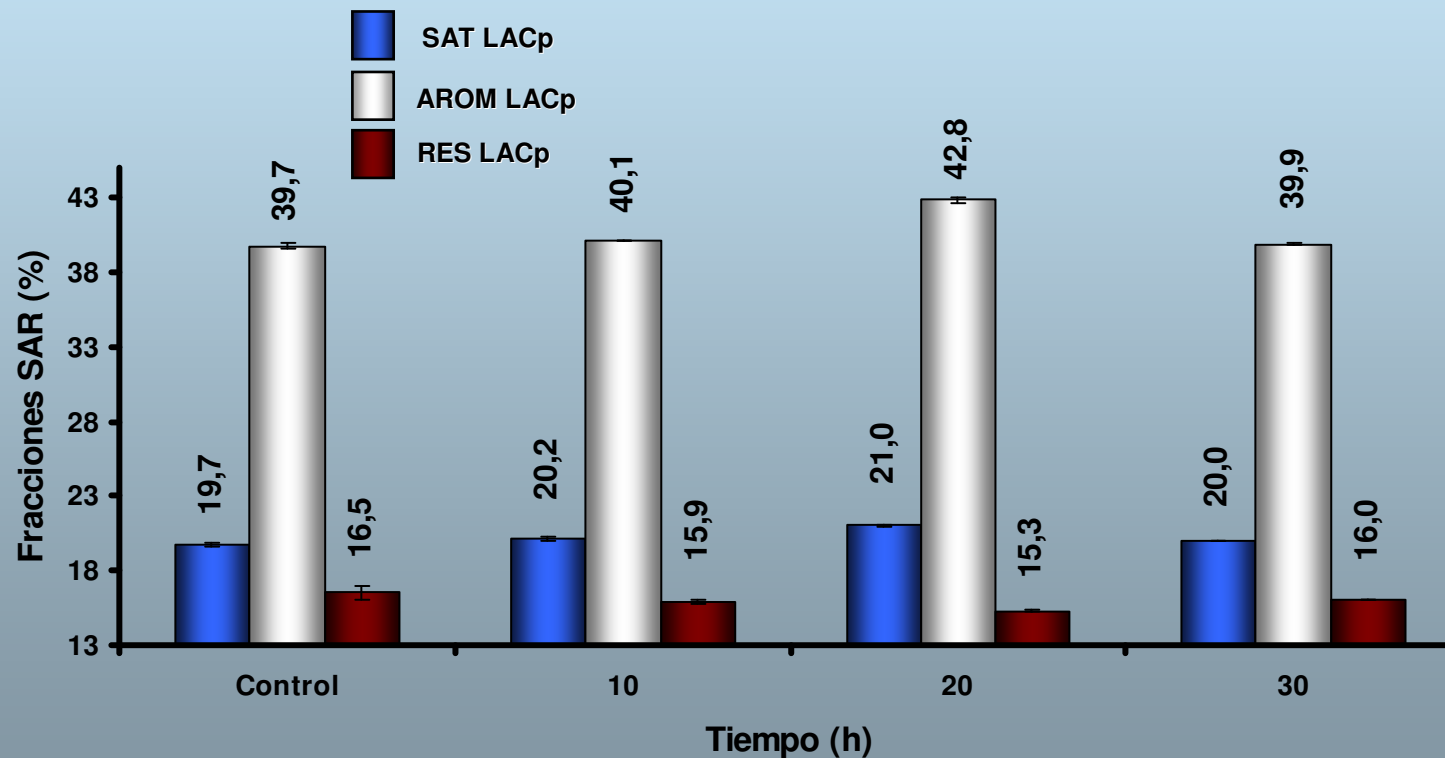
➤ Conversión de asfaltenos mayor 1 % hasta las 20 h de tratamiento con LiPp

Con tratamiento térmico:

➤ Conversión de asfaltenos mayor 2 % a las 20 h de tratamiento con LiPp.

Cromatografía de Adsorción

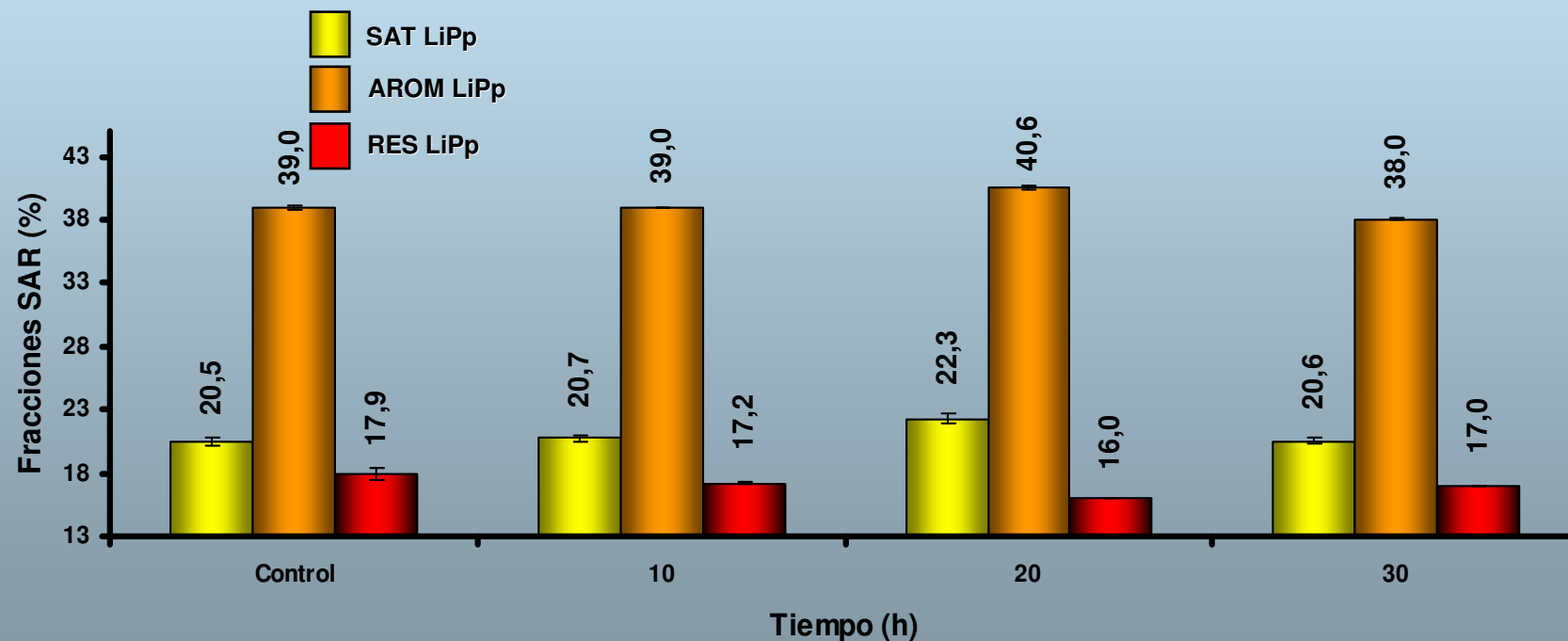
Muestras de CXP biotratadas con LACp sin tratamiento térmico



➤ Las muestras de CXP biotratadas con LACp mostraron un ligero aumento en las fracciones más livianas a las 20 h de tratamiento.

Cromatografía de Adsorción

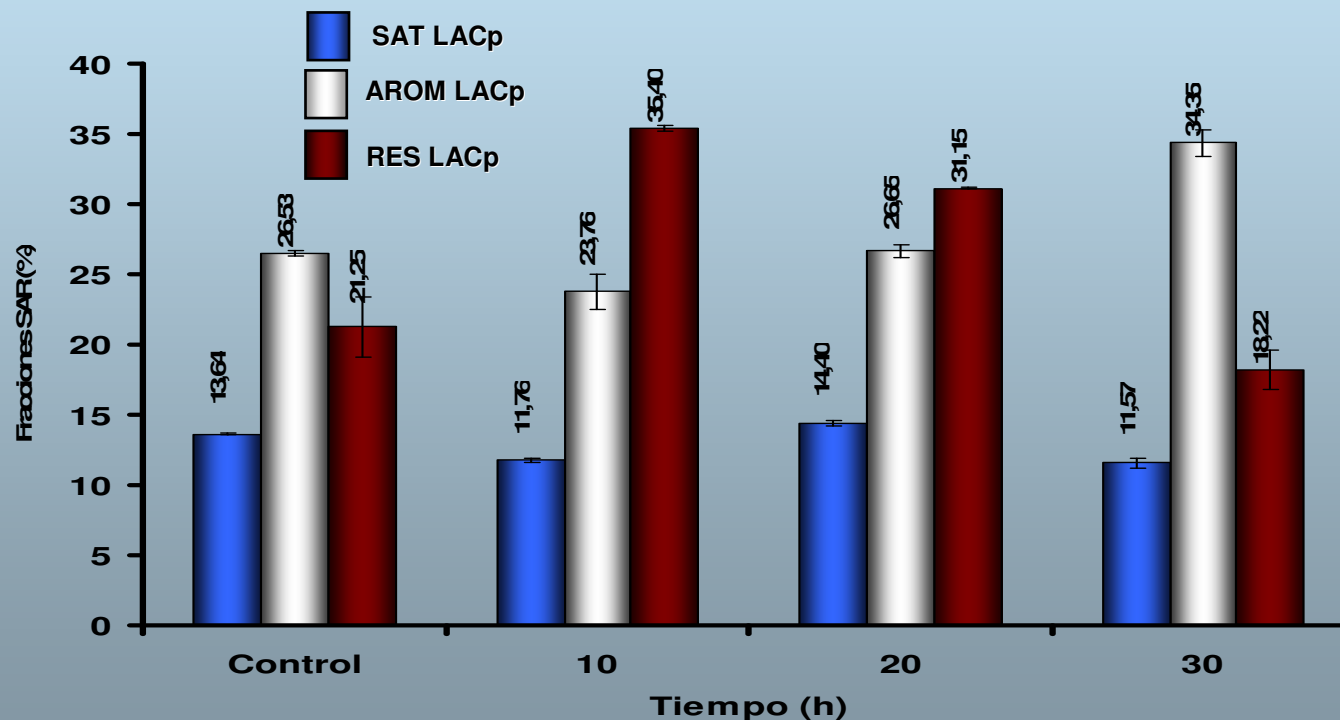
Muestras de CXP biotratadas con **LiPp** sin tratamiento térmico



➤ Las muestras de CXP biotratada con LiPp mostraron un ligero aumento en las fracciones mas livianas a las 20 h de tratamiento.

Cromatografía de Adsorción

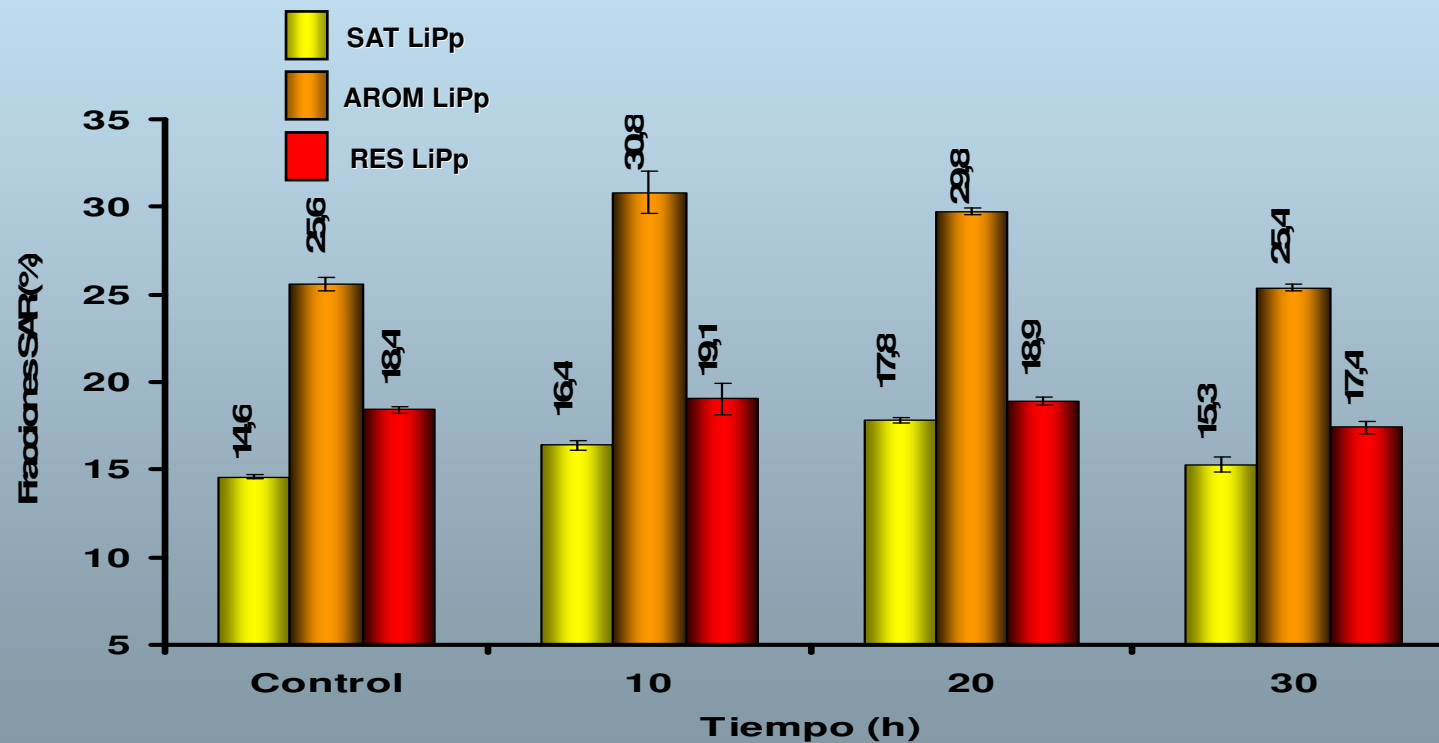
Muestras de CXP biotratadas con **LACp** y tratamiento térmico



➤ Las muestras de CXP biotratadas con LACp mostraron una producción de saturados a las 20 h de tratamiento

Cromatografía de Adsorción

Muestras de CXP biotratadas con **LiPp** tratamiento térmico



➤ Las muestras de CXP biotratadas con LiPp mostraron una producción de saturados y aromáticos a las 10 y 20 h de tratamiento.



Destilación Simulada

El análisis de destilación simulada (Norma ASTM D 7169-05) fue aplicado a las muestras de crudo biotratadas durante 20 h y sometidas a tratamiento térmico

Tratamiento con la mezcla de LACp y LiPp		
Corte	Conversión (%)	
	LACp	LiPp
Residuo 500 °C+	2 - 10	(-2) – (-10)

- La muestra de CXP tratada con LACp mostró una conversión del residuo 500 °C+
- La muestra de CXP tratada con LiPp no logro convertir el residuo 500 °C+



Destilación Simulada

Tratamiento con la mezcla de LACp		
Corte	Temperatura de ebullición (°C)	Producción de combustibles (%)
Nafta	IBP*-200	-
Jet fuel	200-250	-
Diesel	250-350	-
Gasóleo de vacío	350-500	5 - 15

*IBP: Initial Boiling Point

➤ Se logró una ganancia total de combustible (fuel gain) (2 -10 %) con la muestra de CXP tratada con la mezcla de LACp



Destilación Simulada

Tratamiento con la mezcla de LiPp		
Corte	Temperatura de ebullición (°C)	Producción de combustibles (%)
Nafta	IBP*-200	-
Jet fuel	200-250	1 - 5
Diesel	250-350	5 - 15

*IBP: Initial Boiling Point

➤ La muestra de CXP tratada con LiPp produjo diesel (5-15 %) y jet fuel (1-5 %)



CONCLUSIONES

- **Quedó demostrado el potencial de bioconversión de la mezcla de enzimas LACp sobre el CXP.**
- **Se logró la conversión del residuo 500 °C+ (2-10 %) en la muestra de CXP tratada con la mezcla enzimática de LACp.**
- **Se obtuvo una ganancia total de combustibles (fuel gain) del 2–10 % en la muestra de crudo tratada con la mezcla enzimática de LACp.**
- **En este trabajo de investigación se observaron cambios leves de gravedad API, conversión de asfaltenos y contenido de saturados, aromáticos y resinas de los crudos biotratados con la mezcla de enzimas LACp y LiPp**



CONCLUSIONES

- **Las muestras biotratadas con la mezcla enzimática de LACp presentaron un incremento de la gravedad API con respecto al control.**
- **La mezcla de enzimas de LiPp no logró convertir el residuo 500 °C+ de la muestra de CXP.**
- **A partir del tratamiento con la mezcla de enzimas de LiPp se logró la conversión del gasóleo de vacío en destilados más ligeros y a su vez se originó la formación de moléculas más pesadas.**



CONCLUSIONES

- **La caracterización fenotípica es un método sencillo que permitió identificar a los hongos con capacidad de producir EOE y utilizar HPAs y CXP como únicas fuentes de carbono y energía.**
- **Las actividades de las EOE (LiPp y LACp) de las especies BM-04, BM-36 y BM-39 fueron inducidas fuertemente por el CXP.**



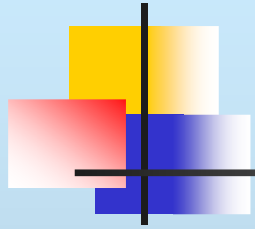
RECOMENDACIONES

- **Se recomienda aumentar la escala del proceso de bioconversión del CXP a 500 g o más. De esta forma se podrían obtener más y mejores resultados analíticos.**
- **Debido a los cambios leves de gravedad API, conversión de asfaltenos y contenido de saturados, aromáticos y resinas de los crudos biotratados observados con la mezcla de enzimas LACp y LiPp, se recomienda trabajar en condiciones más severas de temperatura y presión.**

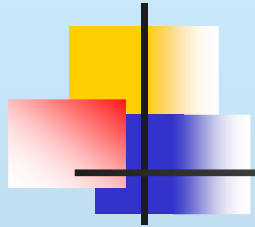


RECOMENDACIONES

- **Se recomienda disminuir el contenido de sales presentes en el buffer empleado para resuspender las enzimas e iniciar el tratamiento del crudo, con el fin de optimizar los procesos de bioconversión.**
- **Se recomienda la purificación de las enzimas ligninolíticas LACp y LiPp para estudiar su efecto en la bioconversión del CXP**



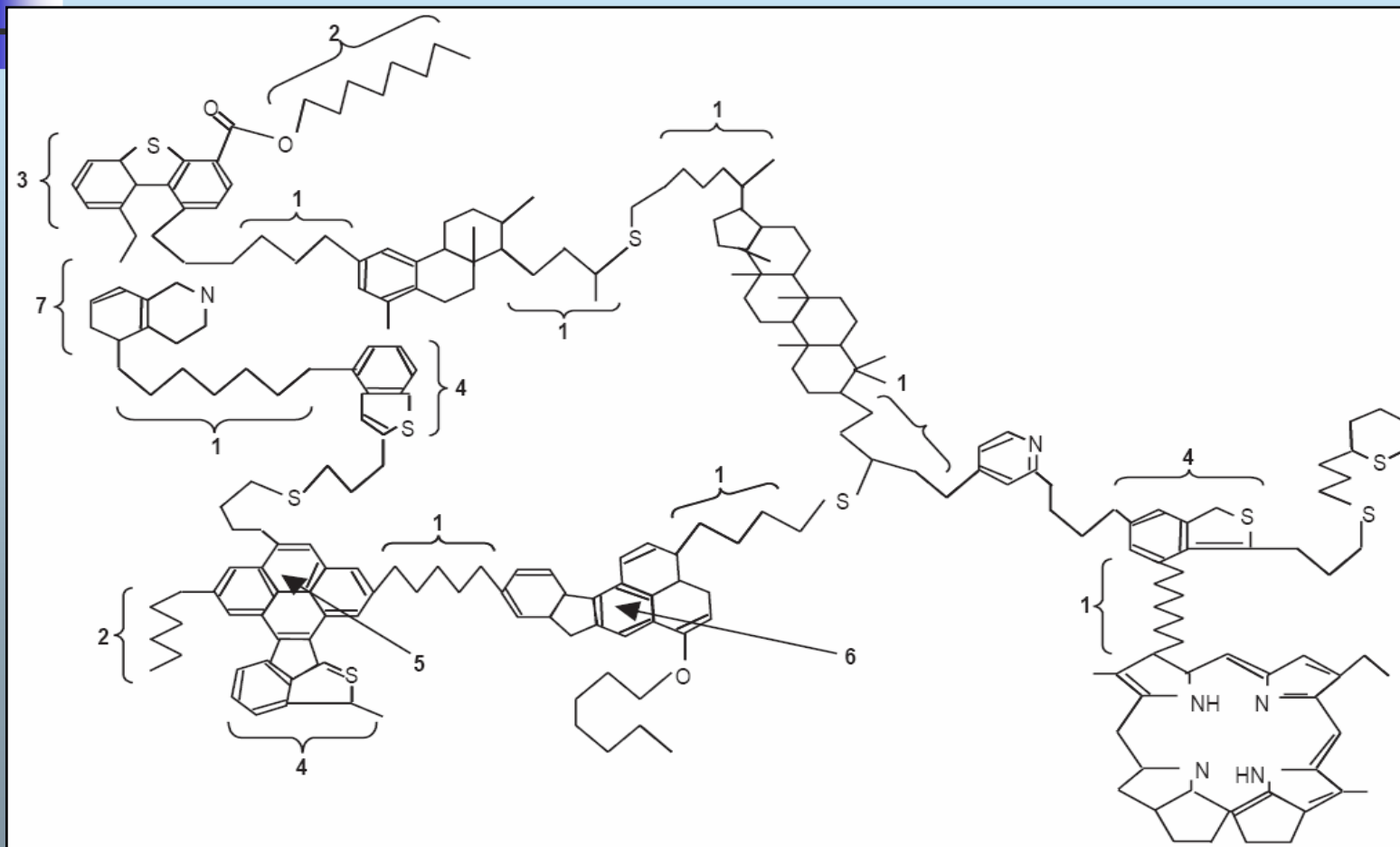
GRACIAS POR SU ATENCIÓN



CICLO DE PREGUNTAS

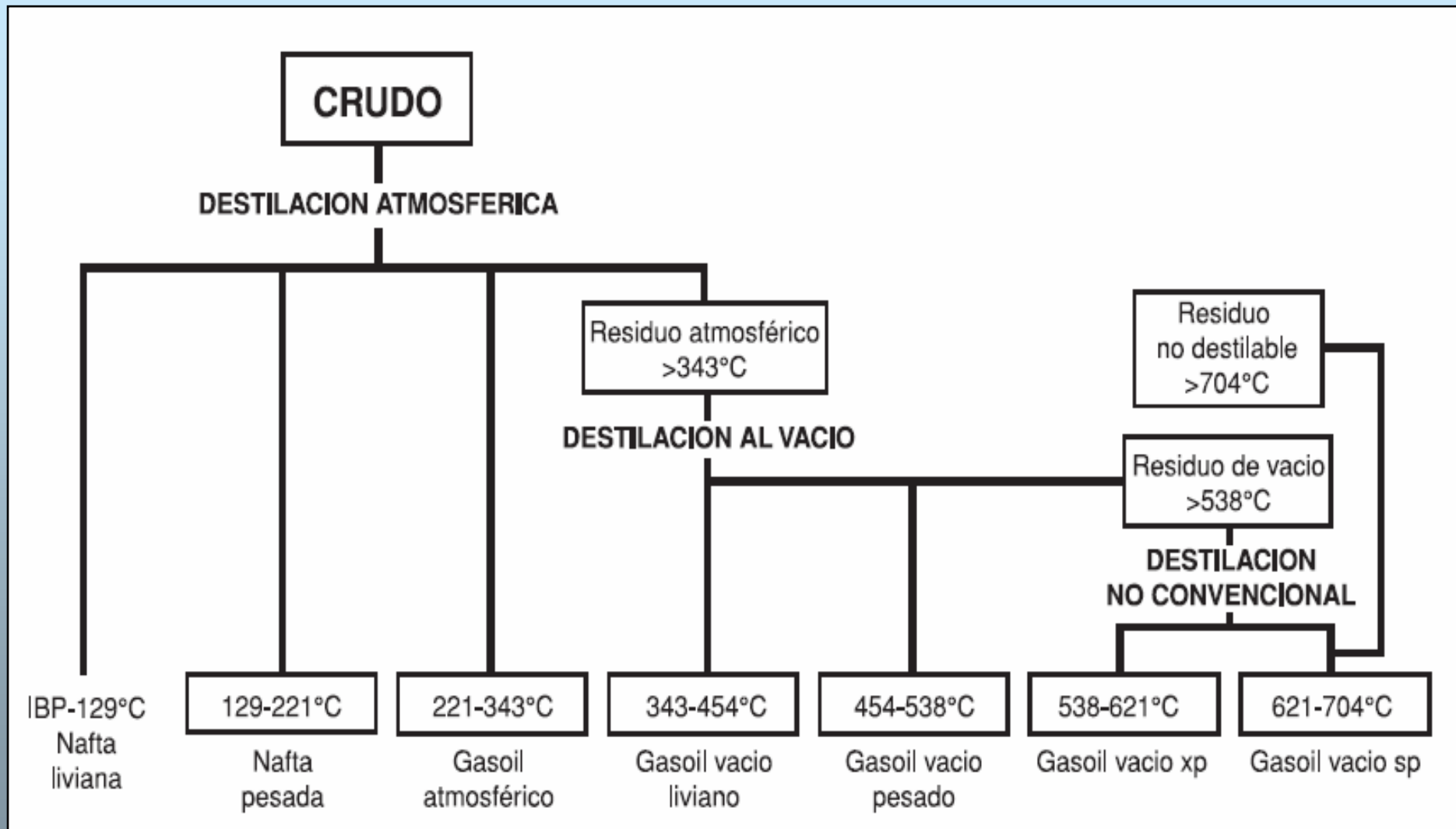


Regiones susceptibles a la ruptura y bioconversión en la molécula hipotética de asfalteno



(Pineda y Mesta, 2001)

Esquema típico de destilación

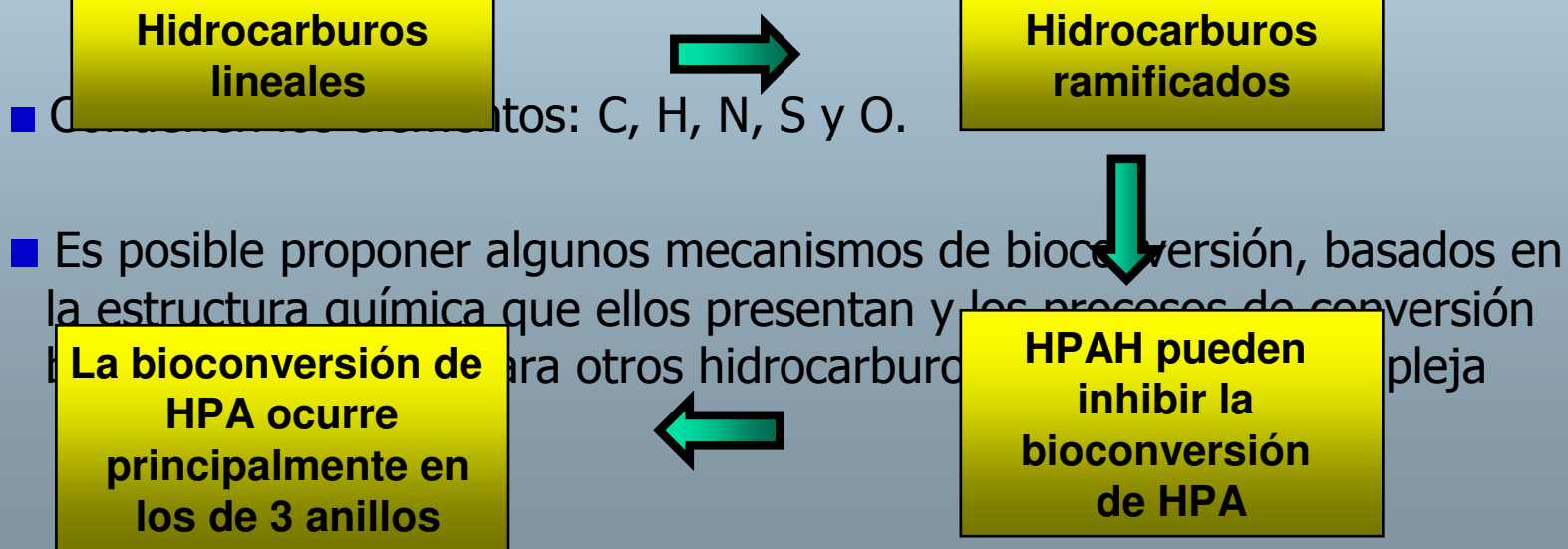


(Carbognani y col., 1999)

Revisión bibliográfica

Posibles mecanismos de bioconversión de asfaltenos

- Mecanismo y posible orden de bioconversión:
- Los asfaltenos son considerados compuestos resistentes a la conversión microbiana.





Revisión bibliográfica

Tecnologías actuales de mejoramiento de CXP y residuos de vacío

- **Coquificación Retardada (CR)**

El proceso alcanza una conversión del 30%. Producción CS (19-25 °API)

- **Viscorreducción**

Típicamente el proceso alcanza una conversión a gas, nafta, destilados y fuel oil del 10%

Tecnologías Nacionales:

- **HDHPlus®**

Proceso de alta conversión (85/93%) de crudos pesados y residuos de refinería vía hidroconversión. Se obtienen CS livianos >40°API

- **Aquaconversion®**

Proceso catalítico que convierte crudos pesados y residuos de vacío aprox. 25%. Se obtienen CS mejorados >13°API

Biodegradación del pireno por microorganismos de suelos contaminados por hidrocarburos

