

ARTÍCULO CIENTÍFICO

María Cristina García¹

ABSTRACT

Biodiesel production via solid state fermentation of lignocellulitic compounds derived from beet husk

Lignocellulitic compounds have a high content of fermentable material, are renewable and have a net CO₂ emission close to 0 and as such a good alternative towards energy security, unstable prices and contamination from fossil fuels. Access to fermentable components, by fungi or enzymes is the main limitation to fermentation technology and only then biofuels like ethanol or biodiesel could achieve competitive conditions against oil derivatives. To increase the availability of fermentable compounds, the efficiency of three methods of lipid extraction was studied from beet bagasse, either fresh or dehydrated: lime, ammonia, and saccharification with simultaneous fermentation. Substrates were enriched with ultrapectinase and cellulase for polysaccharides hydrolyses, after which were fermented in solid state with the fungi *Umbelopsis isabellina* for lipid accumulation.

Best treatment was saccharification with simultaneous fermentation yielding a 6% lipid per gram of initial dry matter. More research on fermentation control, separation and microbial biomass is needed and taking into account variables such as temperature, pH, water activity, redox potential, particle size and C/N ratio.

Key words: Biofuels, lignocellulosics compounds, lipids, solid state fermentation.

Radicado: febrero 14 de 2008
Aceptado: junio 6 de 2008

1. Investigadora Master Asociada. Centro de Investigación Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca). CORPOICA. e-mail: mcgarcia@corpoica.org.co

Producción de biodiesel mediante fermentación en estado sólido de compuestos lignocelulósicos derivados del bagazo de remolacha

RESUMEN

Los compuestos lignocelulósicos tienen alto contenido de material fermentable, son renovables, abundantes y su combustión presenta una emisión neta de CO₂ cercana a cero, por lo que se consideran una buena alternativa ante los problemas de seguridad energética, inestabilidad de precios y contaminación asociados con los combustibles derivados del petróleo. El acceso a los componentes fermentables (pectina, hemicelulosa y celulosa) por hongos y/o enzimas constituye la principal limitante de la tecnología de fermentación; de superarse, la producción de bioetanol y biodiesel, podría alcanzar condiciones de competitividad frente a los hidrocarburos. A fin de incrementar disponibilidad de compuestos fermentables se evaluaron tres métodos de pre-tratamiento del bagazo de remolacha, tanto fresco como deshidratado: cal apagada, amoníaco y sacarificación con fermentación simultánea; estos sustratos fueron enriquecidos con ultrapectinasa y celulasa para hidrolizar los polisacáridos, luego de lo cual se sometieron a fermentación en estado sólido con el hongo *Umbelopsis isabellina* con el fin de obtener lípidos. El tratamiento que reportó los mejores resultados fue el de sacarificación con fermentación simultánea que obtuvo 6% de lípidos por gramo de materia seca inicial.

Palabras clave: Biocombustibles, compuestos lignocelulósicos, lípidos, fermentación en estado sólido.

INTRODUCCIÓN

Biocombustibles

COMO RESPUESTA A LA CRISIS del petróleo de los años 70's, la investigación en conversión de biomasa surgió como una alternativa para garantizar la seguridad energética y la estabilidad de los precios de los combustibles. En este sentido, se estudiaron fuentes energéticas alternativas como el hidrógeno, el biogás, las energías solar y eólica, el proceso Fisher-Tropsch, el butanol, el etanol y el biodiesel. Entre éstas, las que han mostrado mayor potencial han sido el etanol y el biodiesel, razón por la cual la investigación se ha centrado en buscar las condiciones que les permitan competir con los combustibles de origen fósil. Se ha encontrado que los materiales lignocelulósicos —como los residuos agrícolas y agroindustriales, los pastos, etc.—, son de bajo costo, tienen alto contenido de material fermentable, un ciclo de combustión con cero emisión de gases y alta disponibilidad, lo que permite su uso en la producción de etanol, lípidos (biodiesel) y butanol. La principal limitante radica en el acceso a los compuestos fermentables (pectina, hemicelulosa y

celulosa) por parte de enzimas y microorganismos; si ésta es superada, se abriría la posibilidad de usar el compuesto más abundante y renovable de la tierra, la lignocelulosa. Ello reduciría la emisión de gases de invernadero y aseguraría la disponibilidad de energía limpia (García, 2007; Hamelinck *et al.*, 2007).

Este estudio evaluó tres métodos para incrementar la accesibilidad a los materiales fermentables por enzimas y microorganismos a partir de bagazo de remolacha fresco y deshidratado: cal apagada, amoníaco y sacarificación con fermentación simultánea. Entre los aspectos básicos a considerar en los procesos de obtención de energía a partir de compuestos lignocelulósicos se cuentan las características y pre-tratamiento de la materia prima, el tipo de fermentación que se debe implementar y los microorganismos a utilizar.

Materias primas

La caña de azúcar, el trigo y las semillas oleaginosas son actualmente las fuentes más usadas para la producción de etanol y biodiesel. Sin embargo, sólo se utilizan los azúcares, el almidón y los aceites, mientras que los demás componentes

se consideran residuos los cuales están conformados básicamente por proteínas, minerales y compuestos lignocelulósicos. Estos últimos representan usualmente más del 90% en base seca del residuo y están constituidos principalmente por lignina, celulosa, hemicelulosa y pectina en diferentes proporciones, de acuerdo al cultivo del cual provengan. Entre estos compuestos, la hemicelulosa y la lignina (que no es fermentable), conforman una barrera que dificulta la degradación biológica de estos residuos (Mosier *et al.*, 2005; Wyman *et al.*, 2005; Lynd *et al.*, 2005).

Acondicionamiento del sustrato

Dada la complejidad de los compuestos lignocelulósicos es imprescindible un pretratamiento de estos sustratos para incrementar el acceso a los compuestos fermentables, esto es la pectina, la hemicelulosa y la celulosa. A ese fin, existen disponibles diversas clases de tratamiento: de tipo físico, tales como la reducción de tamaño, la explosión con vapor y la hidrotérmólisis; de tipo químico, como la hidrólisis ácida o básica, la ozonólisis y la oxidación, entre otros (Carrillo *et al.*, 2005); de tipo biológico o enzimático (Adsula *et al.*, 2005); o la combinación de algunos de los anteriores (Taniguchi, 2005; Sun y Cheng, 2005). La mayoría de estos tratamientos se llevan a cabo bajo condiciones de operación extrema que conducen generalmente a la solubilización del sustrato y a la liberación de compuestos inhibitorios de crecimiento microbiológico. El tratamiento seleccionado determina también las operaciones posteriores de adecuación del sustrato para la fermentación (Taniguchi, 2005; Lynd, 1996; Eggeman y Elander, 2005).

Fermentación en estado sólido

Es la fermentación que ocurre en ausencia de agua libre; a tal fin, se selecciona un sustrato natural o inerte con una alta porosidad, capacidad de absorber agua, proveer nutrientes y promover la sobrevivencia de los microorganismos. Una de las ventajas más importantes radica en el hecho de que permite el uso de sustratos de muy bajo costo, tales como residuos agroindustriales (Pérez-Guerra *et al.*, 2003). Esta tecnología presenta una escasa probabilidad de contaminación por bacterias o levaduras dada su reducida actividad de agua y ofrece condiciones

similares al hábitat natural de los hongos. El diseño de los reactores es fácil y económico, aunque no es fácil de controlar.

Microorganismos

Los hongos filamentosos son los mejor adaptados para crecer en sustratos sólidos con bajo contenido de agua libre; además, tienen la capacidad de usar polisacáridos como fuentes de carbono para fraccionarlos en monosacáridos. Como condición, estos hongos deben tener la capacidad de acumular lípidos, bajo la forma de ácidos grasos, hasta valores superiores al 20% de su masa; algunos estudios señalan que la acumulación de lípidos se inicia tan pronto como la fuente de nitrógeno se agota (Ratledge, 2002; 2004; Ratledge y Wynn, sin año).

Producción de biodiesel

La industria de biocombustibles está buscando procesos más eficientes que conduzcan a altas producciones, mínimos residuos y bajo costo. El proceso propuesto para la producción de biodiesel desde compuestos lignocelulósicos es un proceso flexible ya que permite la producción tanto de biodiesel como de bioetanol. La biomasa debe ser tratada para facilitar su degradación biológica, acondicionándola para que se ajuste a las condiciones para la fermentación al inocularla con microorganismos con la habilidad de degradar polisacáridos y de acumular lípidos. Estos lípidos posteriormente son extraídos y transesterificados para obtener biodiesel. La flexibilidad de este proceso radica en la posibilidad de adicionar levaduras a la biomasa una vez que ha sido hidrolizada para obtener bioetanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Umbelopsis isabellina fue el hongo seleccionado según su capacidad para crecer en sustratos sólidos de baja actividad de agua y su habilidad de acumular lípidos. Este hongo fue provisto por el grupo de Genómica de la Universidad de Wageningen (Holanda).

Sustrato

Se empleó bagazo de remolacha deshidratado (BRD) y fresco (BRF) provisto por CMC (Centrale Suiker Maatschappij, Vierverlaten, Groningen, The Nether-

lands). El BDR se molió hasta diámetros entre 1 y 4 mm y luego se almacenó a temperatura ambiente. El BRF se almacenó a -20°C y posteriormente se descongeló, molió y clasificó en tres grupos de acuerdo con el tamaño de partícula justo antes de su uso: el primer grupo se denominó 'finos' y se caracterizaron por tener un diámetro menor a 1 mm; el segundo, llamado 'gruesos', tenía un tamaño de partícula entre 2 y 4 mm; el último grupo, denominado 'entero', tenía un tamaño de partícula ≥ 1 cm. Para evitar la aglomeración del sustrato se adicionó aserrín (provisto por Hempflax, Groningen) cuando fue necesario.

Enriquecimiento del sustrato

Se adicionó 1 mL de solución mineral por gramo inicial de materia seca (MS) con la siguiente composición: 2,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 7,5 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 2,5 g KCl; 0,25 g EDTA; 0,11 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,0221 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,008 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,008 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,0055 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; 0,0277 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0,025 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Enzimas

El grupo de Química de Alimentos de la Universidad de Wageningen (Holanda) facilitó amablemente las enzimas ultrapeptinasa (Novozymes®) y celulasa (G.C. Genencor®). Éstas fueron mantenidas a 7°C y mezcladas en proporciones de 1:3 en volumen de peptinasa a celulasa justo antes de la adición al sustrato.

Tratamientos del sustrato

Los siguientes tratamientos se aplicaron al sustrato con el fin de incrementar el acceso a los compuestos fermentables y mantener el estado sólido: 1) tratamiento con cal apagada, 2) tratamiento con amoníaco y, 3) sacarificación y fermentación simultáneas.

Tratamiento con cal apagada. Tanto el BRD como el BRF se molieron previamente y se asperjaron con una suspensión de hidróxido de calcio al 5% (p:v) a 80°C por tres días. El bagazo de remolacha deshidratado y molido (BRDM) se asperjó con la solución de hidróxido de calcio manteniendo proporciones en base seca de 2:1 a 10:1 líquido/sólido (L/S), mientras que con el bagazo de remolacha fresco y molido (BRFM) sólo se utilizó una proporción L/S de 3:1.

Tratamiento con amoníaco. En este caso BRD y BRF se asperjaron con una solución de amoníaco al 25% usando las mismas proporciones L/S utilizadas en el tratamiento anterior pero mantenidas a 22°C por tres días.

Tratamiento de sacarificación y fermentación simultáneas. Sobre BRFM se llevaron a cabo diferentes ensayos variando el tamaño de partícula (entero, gruesos y finos) del BRF y la dosis de enzimas (8, 16, 24 y 40 $\mu\text{L/g}$ MS inicial de sustrato). El pH fue ajustado a 5,0 con una solución de 0,1 M de ácido clorhídrico.

El blanco o testigo consistió en esparcir el bagazo de remolacha tanto deshidratado como fresco con agua en proporciones L/S, de 2:1 hasta 7:1 manteniéndola a 80°C por tres días.

Neutralización del sustrato

Para reducir el pH del sustrato a valores alrededor de 6.0 luego del tratamiento con la cal apagada y con amoníaco se utilizaron tres métodos: 1) Lavado con agua, la cual era posteriormente retirada mediante centrifugación (Beckman® J2-MC Rotor JA-14, 12.000 rpm/13.870 g-fuerza) y la consecutiva adición de una solución 0,1 M de ácido clorhídrico HCl (Merck®) o 0,1M de hidróxido de sodio (Merck®); 2) Bombeo de dióxido de carbono a través del sustrato y posterior adición de HCl bajo las mismas condiciones usadas en el caso anterior; y 3) Lavado del sustrato con ácido diluido, una solución de 0,01M de HCl.

Fermentación

Los sustratos fueron esterilizados a 120°C por 20 min e inoculados con 10 μL de una solución de esporas (7×10^7 esporas/mL) de *Umbelopsis isabellina* por cada gramo de materia seca de sustrato (g MS). Se adicionó 1 mL de solución mineral cuando fue requerido.

La fermentación se llevó a cabo en un conjunto de vidrio de tres tubos de 35 mL los cuales estaban conectados con una bomba que proporcionó aire a razón de 50 mL/min; el aire se humidificó al pasar a través de dos tubos con agua antes de pasar hacia los tubos de fermentación. Los gases de fermentación se condujeron a un analizador Servomex® que detectaron las concentraciones de CO_2 y O_2 en línea. La

temperatura se mantuvo a 25°C y el proceso se detuvo al cabo de 160 horas.

Muestreo y análisis

El desarrollo de la fermentación se siguió en línea a través de los resultados reportados por el analizador de gases, mientras que las propiedades fisicoquímicas, el pH (pH323 WTW®), la actividad de agua, Aw (Aqualab® Serie 3 Quick-Stara) y el contenido de agua (balanza infrarroja Sartorius® MA-30) del sustrato fueron medidos al comienzo y al final de la fermentación. Adicionalmente, se determinó la composición de ácidos grasos a diferentes intervalos de tiempo mediante cromatografía de gases (Hewlett Packard® HP 6890 con columna Cromapack® CP-Wax58 FFAP-CB, A25m*0,25 i.d., $df = 0,20$ nm). La temperatura de inyección fue de 250°C y la detección fue hecha con detector de ionización de llama a 270°C por inyección de 1 μL de muestra. En la preparación de la muestra se adicionaron 5 mL de cloroformo, conteniendo 0,5 mg/mL de ácido nonadecanoico (Fluka Chemika®) a aproximadamente 40 mg de una muestra seca proveniente del fermentador. Esta mezcla fue mantenida toda la noche a temperatura ambiente y en un mezclador Ika-Werk RW-20 (Janke & Kunel®). Posteriormente fue filtrada a través de papel filtro S&S 596. Se tomaron 50 μL del líquido claro y se adicionaron 25 μL de solución 0,25M en metanol de hidróxido de trimetil sulfonio (Sigma Aldrich®). Esta solución fue puesta en viales para cromatografía de 100 μL . Los picos fueron identificados por comparación del tiempo de retención con los ácidos grasos del aceite de girasol. La cuantificación se realizó asumiendo que el total del área de los picos representa el 100% de los ácidos grasos, excluyendo el solvente y el ácido nonadecanoico.

RESULTADOS

Desempeño de la fermentación

Dado que los lípidos son acumulados por el hongo, es importante alcanzar una alta multiplicación del microorganismo para que, a su vez, logre acumular grandes cantidades de lípidos. Como variable respuesta para evaluar el crecimiento del hongo o el progreso de la fermentación se analizó la composición de los gases de fermentación.

La remolacha contiene 30 mmol de carbono/g MS (ver website <http://www.ecn.nl/phyllis/search.asp> ID 1361); por lo tanto, de acuerdo con el balance de materiales, deberían ser liberados 10 mmol de CO_2 y el carbono restante debería ser convertido en biomasa. Esta misma cantidad de CO_2 también es liberada cuando se inicia la acumulación de lípidos. Así, entre más se aproxime la cantidad de CO_2 liberada a estas 10 mmol, más eficiente es la fermentación. Entre las relaciones L/S utilizadas con el bagazo de remolacha deshidratado (BRD), 1:3 fue la que presentó mejores resultados. Cuando se utilizan proporciones menores no se puede garantizar una humedad uniforme en el sustrato, mientras que si se utilizan relaciones mayores, el sustrato se torna pastoso, con exceso de agua libre.

En la Figura 1 se presentan los resultados de la fermentación de BRDM como sustrato, tratado con cal apagada o amoníaco y neutralizado mediante lavado con agua. Dado que los tratamientos no fueron efectivos, pues reportaron valores menores a los alcanzados por el testigo, se pensó que la causa podría ser la pérdida de nutrientes o de proteína del sustrato durante el lavado. Por lo tanto, se desarrollaron nuevos experimentos cambiando el método de neutralización por bombeo de CO_2 y suplementando el sustrato con nutrientes y fuentes de nitrógeno. Una vez más la cantidad de CO_2 liberada fue menor para el sustrato tratado que para el testigo. Se decidió trabajar entonces con BRFM como sustrato con las mismas condiciones utilizadas con BRDM. Además, se incluyó un experimento con BRFM sometido a lavado con sólo agua para comprobar si, en efecto, ésta podría arrastrar alguno de los nutrientes del sustrato. Los resultados mostraron que

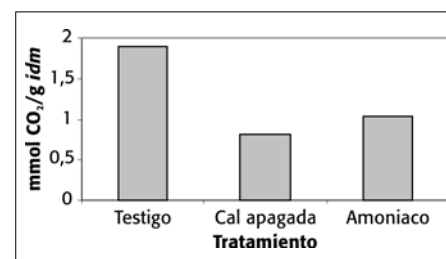


Figura 1. Producción de CO_2 después de 160 horas de fermentación del sustrato BRD inoculado con *Umbelopsis isabellina* y tratado con cal apagada y amoníaco.

el pobre desarrollo de la fermentación no era causado por la calidad nutricional del sustrato, como se observa en la Figura 2. La actividad de agua en todas las pruebas realizadas con BRD y BRF, a altas y bajas relaciones de L/S, siempre estuvo alrededor de 0,99, por lo cual no se consideró como la causa de la baja eficiencia de la fermentación cuando se utilizó BRD.

El siguiente paso consistió en evaluar el efecto de los tratamientos con cal apagada y amoníaco sobre la fermentación de BRF. La Figura 3 muestra como estos tratamientos no fueron efectivos. El tratamiento con cal no permitió ningún desarrollo microbiano, mientras que el tratamiento con amoníaco presentó niveles de producción de CO₂ inferiores al testigo. Por tanto, se analizaron las posibles causas. En el caso del tratamiento con cal apagada, el pobre desarrollo de la fermentación se explicó por la composición de la cal apagada y del sustrato: por una parte la remolacha presenta un alto contenido de pectina (25-30%) (Grajek y Gervais, 1987; Forest *et al.*, 2001), mientras que la cal apagada es una suspensión de hidróxido de

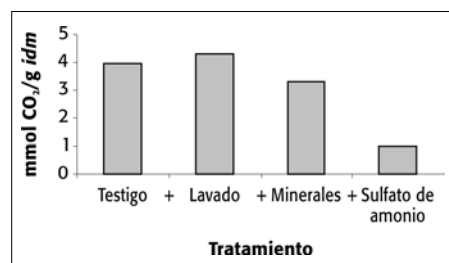


Figura 2. Producción de CO₂ después de 160 horas de fermentación del sustrato BRF inoculado con *Umbelopsis isabelina*, sin tratar y tratado bajo tres condiciones: lavado, suplementado con minerales y con sulfato de amonio.

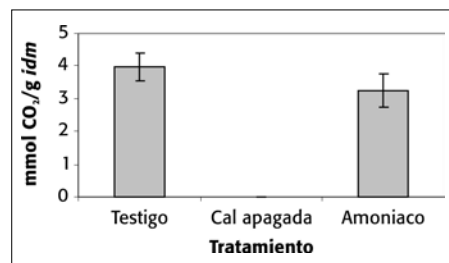


Figura 3. Producción de CO₂ después de 160 horas de fermentación del sustrato BRF inoculado con *Umbelopsis isabelina*: testigo sin tratamiento, tratado con cal apagada y neutralizado con ácido diluido; y tratado con amoníaco y neutralizado mediante lavado.

calcio. Este último reacciona o enlaza con la pectina favoreciendo sus propiedades gelificantes. Así, en lugar de expandir el sustrato dejando más expuestos los compuestos fermentables al ataque de los hongos, este tratamiento causó la contracción del mismo reduciendo el área superficial, efecto totalmente contrario al buscado.

En el caso del tratamiento con amoníaco, el bajo contenido de lignina del sustrato (2%) (Grajek y Gervais, 1987; Forest *et al.*, 2001) hizo que este tratamiento no fuera significativo. El principal efecto del amoníaco es actuar sobre la lignina para removerla y liberar los compuestos fermentables; sin embargo, si no hay lignina o su contenido es muy bajo este pre-tratamiento con amoníaco pierde efectividad. Parecería que la causa del bajo desarrollo de la fermentación no fue la accesibilidad a las fuentes de carbono por parte de los hongos sino la baja capacidad de estos hongos para hidrolizar polisacáridos. Por lo tanto, en los experimentos posteriores se decidió adicionar enzimas (celulasas y pectinasas) con el fin de facilitar la hidrólisis de los polisacáridos. Este tratamiento fue denominado 'sacarificación y fermentación simultánea', dado que las enzimas y el hongo son inoculados al mismo tiempo. La Figura 4 muestra los resultados alcanzados usando tres dosis de enzimas y BRF como sustrato. Dado que los resultados encontrados con los tratamientos fueron mejores que los mostrados por el testigo, se adoptó éste como el tratamiento más adecuado para mejorar el desarrollo de la fermentación. Los experimentos posteriores apuntaron a incrementar los rendimientos alcanzados en términos de CO₂ acumulado.

En consecuencia, se utilizaron BRFM fino y grueso como sustratos. El BRFM fino e inoculado con las enzimas (8, 16 y 40 µL/g de materia seca inicial, *idm*: initial dry matter) se hidrolizó para formar dos fases: una líquida ubicada en el fondo de los tubos de fermentación y una sólida y compacta que bloqueó el paso del aire, limitando el crecimiento de los hongos por falta de oxígeno. Cuando se utilizó el sustrato BRFM grueso (diámetro de partícula entre 2 y 4 mm) adicionado con 8 y 16 µL/g *idm*, el desarrollo de la fermentación fue similar al alcanzado con el sustrato sin moler adicionado con la misma dosis de enzimas (8 y 16 µL/g *idm*) (Figura 4). En la Figura 5 se presentan los

resultados encontrados con el sustrato BRFM grueso, ya que con el BRFM fino la fermentación se detuvo al presentarse la limitación de oxígeno citada.

Para evitar tal limitación de oxígeno se incluyó aserrín como material de soporte con el fin de mantener el sustrato suelto y facilitar su aireación. Se utilizaron proporciones aserrín:sustrato de 1:1 a 1:13 con dosis de enzimas de 8 y 16 µL/g *idm*. Los resultados (Figura 6) muestran que la relación aserrín:BRFM de 1:5, con tamaños de partícula entre 2 y 4 mm, y mezclado con 8 µL/g *idm*,

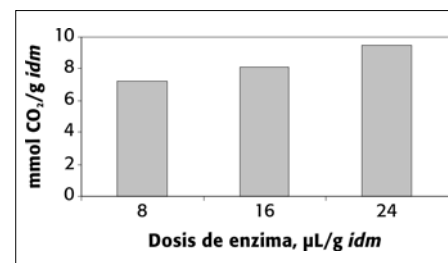


Figura 4. Producción de CO₂ después de 160 horas de fermentación del sustrato BRF inoculado con enzimas a las dosis de 8, 16 y 24 µL/g *idm*.

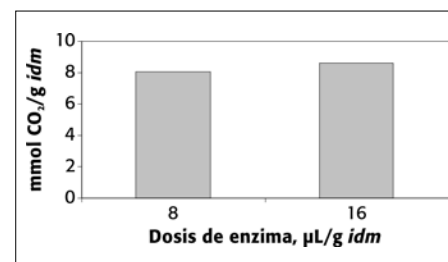


Figura 5. Producción de CO₂ después de 160 horas de fermentación del sustrato BRFM grueso (partículas de 2 a 4 mm), inoculado con enzimas a las dosis de 8 y 16 µL/g *idm*.

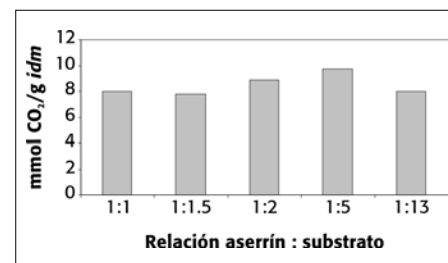


Figura 6. Producción de CO₂ después de 160 horas de fermentación del sustrato BRFM grueso (partículas de 2 a 4 mm), mezclado con aserrín en diferentes proporciones e inoculado con enzimas a la dosis de 8 µL/g *idm*.

exhibió las mayores producciones de CO_2 . Comparando los resultados de fermentación obtenidos con BRF sin moler y adicionado con $8 \mu\text{L/g idm}$ (Figura 4) se observa que la mezcla con este material de soporte logró incrementar la producción de CO_2 .

Acumulación de lípidos

En los experimentos que mostraron las mejores condiciones de fermentación se determinó el contenido de lípidos (Tabla 1). De acuerdo con estos resultados parece que en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea hay otras variables, además de la concentración de enzimas, de mayor peso que gobiernan la acumulación de lípidos. La dosis de enzimas a las concentraciones utilizadas no ejercieron mayor efecto sobre la acumulación de lípidos, pues no hubo una clara diferencia en cuanto a la cantidad de lípidos acumulados. El camino hacia la optimización del proceso, que permita determinar su viabilidad frente a otras alternativas, requiere de mayor investigación, tanto de las variables aquí consideradas, como de otras como el pH, la temperatura y la relación carbono/nitrógeno, la composición de las enzimas utilizadas y su actividad. Además, se deben incluir otro tipo de hongos y sustratos y determinar el tiempo de operación óptimo. Este último podría obtenerse de un análisis de gráficas de acumulación de lípidos en función del tiempo (Figura 7), sumado a un análisis económico sobre los costos de mantenimiento del proceso por el período de fermentación, después de que el proceso se optimice.

Finalmente, con el fin de comparar la calidad del aceite obtenido para su uso en la producción de biodiesel, en la Tabla 2 se presenta la composición de ácidos grasos de los lípidos extraídos, al igual que de los aceites comúnmente usados en la producción de biodiesel, y la del biodiesel comercial. Como se puede observar la composición es similar; tan solo el ácido esteárico muestra una proporción significativamente más alta a la encontrada en el biodiesel.

CONCLUSIONES

Los tratamientos con cal apagada no son adecuados para sustratos con alto

Tabla 1. Producción de CO_2 , acumulación y producción de lípidos a partir de BRF bajo diferentes condiciones de pH, dosis de enzimas, tamaño de partícula y mezcla con aserrín.

Condiciones de fermentación	CO_2 acumulado, mmol/g idm	Producción (%) % lípidos acumulados/g idm
BRF Entero + pH 5 + F1	4,3	1,07%
FSBP Molido + pH 5 + 24 $\mu\text{L/g dm}$ + Hongo F3	5,2	0,7%
FSBP Molido + pH 5 + 16 $\mu\text{L/g dm}$ + Hongo F3	4,4	0,9%
BRF Entero + pH 5 + Molido + 16 $\mu\text{L/g idm}$ + F1	8,6	4,6%
BRF Entero + pH 5 + 24 $\mu\text{L/g}$, $\mu\text{L/g dm}$ + F1	9,5	4,6%
FSBP Molido + pH 5 + 8 $\mu\text{L/g dm}$, c/s 1:5 + F1	9,8	5,2%
FSBP Molido + pH 5 + 16 $\mu\text{L/g dm}$ c/s 1:5 + F1	10,6	5,3%
FSBP Molido + pH 5 + 8 $\mu\text{L/g dm}$ c/s: 1:1 + F1	9,7	6,0%
FSBP Molido + pH 5 + 8 $\mu\text{L/g dm}$ c/s 1:5 + F1	9,7	5,4%
FSBP Molido + pH 5 + 16 $\mu\text{L/g dm}$ c/s 1:13 + F1	8,2	5,2%

idm : Initial dry matter, material seca inicial; dm : dry matter, materia seca.

(*) La producción se estimó asumiendo que la cantidad de CO_2 liberada es proporcional a la disminución del sustrato remanente, lo cual se calculó así: producción de lípidos (%/g idm) = (lípidos acumulados [%/g dm]) * (30 mmol C / g idm — mmol CO_2 acumulado/g idm) / 30 mmol C/g idm.

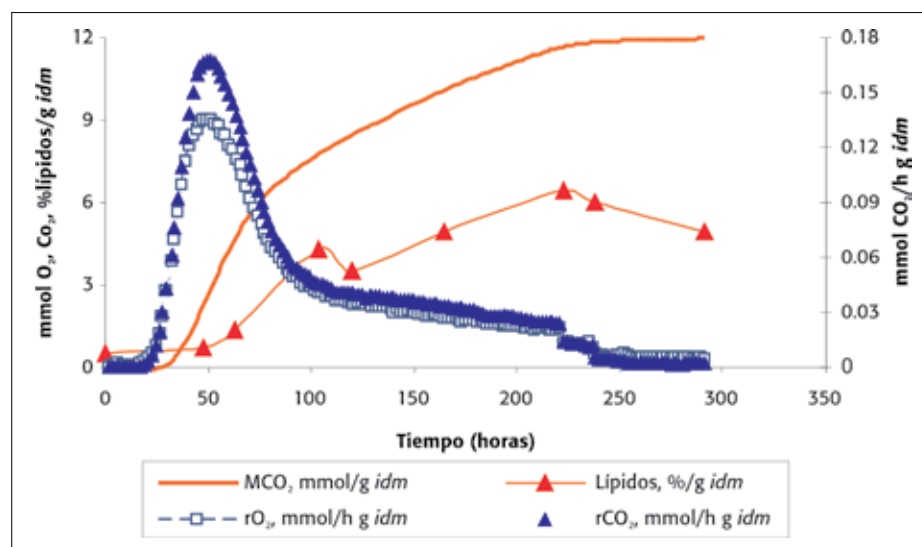


Figura 7. Producción de lípidos, velocidad de producción de CO_2 y O_2 a partir del sustrato BRF mezclado con aserrín en una proporción de 1:3, a pH 5,0 e inoculado con $8 \mu\text{L/g idm}$ de enzimas.

Tabla 2. Composición de diferentes fuentes de aceites usados en la producción de biodiesel.

Fuente de aceite	C16	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2
Lípidos obtenidos por fermentación y sacarificación simultánea con el hongo <i>Umbelopsis isabellina</i> F1	20,8	6	52	20,7
Soya	11,75	3,15	23	55
Maíz	11,67	1,85	25,16	60,6
Biodiesel	4,4	2,3	69,4	18

Fuente: Fangrui y Millford (1999).

contenido de pectinas, pues las pruebas realizadas con cal apagada ocasionaron el plegado del sustrato. Esto puede explicarse por la formación de puentes entre la pectina contenida en el bagazo de remolacha y los iones calcio de la cal apagada. Al plegarse el sustrato, el área superficial se reduce, lo que dificulta el acceso del hongo a los compuestos fermentables.

Con respecto a las pruebas desarrolladas con amoníaco se encontró que no es recomendable como tratamiento para el residuo de remolacha. El principal efecto del amoníaco sobre la lignina es la liberación de los compuestos fermentables, pero el bajo contenido de lignina de los residuos de la remolacha hace que su efecto no sea significativo.

En la producción de lípidos a través de fermentación en estado sólido es necesario que el microorganismo utilizado cuente con la capacidad de acceder y utilizar fuentes de carbono complejas y además que pueda acumular lípidos en más del 20% de su masa. Esta suma de condiciones es difícil de encontrar en la naturaleza, por lo que es necesario buscar alternativas para superar esta limitante. Entre ellas se tienen la modificación genética de microorganismos buscando potenciar alguna de estas características, así como alternativas más sencillas como la adición de enzimas que faciliten la hidrólisis de los polisacáridos en los casos en que el microorganismo no logre esta hidrólisis a la velocidad deseada. En estos casos la sacarificación con fermentación simultánea constituyen una buena alternativa para superar esta deficiencia del microorganismo. Esta alternativa requiere del logro de condiciones óptimas, tanto para las enzimas utilizadas como para el microorganismo empleado, por lo cual aspectos como la temperatura, el pH, la actividad de agua, el potencial redox, pueden jugar un papel importante.

La combinación de tamaño de partícula inferior a 2 mm con altas dosis de enzimas resulta perjudicial para el desarrollo de la fermentación a causa de la solubilización del sustrato, lo cual puede detener el crecimiento del hongo por alta concentración de azúcares o por limitación del oxígeno. Esto se

puede superar incluyendo un material de soporte que mantenga suelto el sustrato y evite la solubilización del mismo. Sin embargo, también es importante considerar el tamaño de partícula del material de soporte no solamente del sustrato.

Para la fermentación de bagazo de remolacha con *Umbelopsis isabelina* a fin de concentrar lípidos, el mejor tratamiento fue el de la sacarificación y fermentación simultáneas, proceso que permitió alcanzar producciones hasta de 6% de lípidos por gramo inicial de masa seca (%/g *idm*).

El proceso de obtención de lípidos a partir de compuestos lignocelulósicos a través de la fermentación en estado sólido es una alternativa que requiere de mayores estudios. Es preciso ahondar en el estudio de las variables que inciden en el proceso, en los procedimientos de control y seguimiento de la fermentación, en los métodos de separación y cuantificación de la biomasa microbiana, entre otros aspectos, con el fin de tener resultados más precisos y que conduzcan a la optimización del proceso en términos de biomasa y lípidos producidos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue dirigido por los investigadores Dr. Ir. Arjen Rinzema, Dra. Ir. Petra Meeuwse y Dr. Sebastiaan Haemmers, del *Food Bioprocess Engineering Group* de la Universidad de Wageningen (Holanda) a quienes expresamos nuestros agradecimientos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adsula, G. *et al.* 2005. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 62: 6-10.
- Carrillo, F. *et al.* 2005. Effect of alkali pretreatment on cellulose hydrolysis of wheat straw: a kinetic study. *Process Biochemistry* 40: 3360-3364.
- Eggeman, T. y R. Elander. 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 96: 2019-2025.
- Fangrui M. y A. Milford. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology* 70: 1-15.

- Fares, K *et al.* 2004. Characterization of hemicelluloses of sugar beet roots grown in Morocco. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 303-309.
- Forest, B.; E. Dale y J. Doran. 2001. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93: 269-282.
- García, C. 2007. Exploration of lipid production in solid state fermentation from lignocellulosic biomass. M.Sc. Thesis in Food Technology. Wageningen University (The Netherlands). 180 p.
- Grajek, W. y P. Gervais. 1987. Effect of the sugar beet pulp water activity on the solid state culture of *Trichoderma viride* TS. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 537-541.
- Hamelinck, N. *et al.* 2003. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses. Copernicus Institute. Science Technology Society, University of Utrecht (The Netherlands). 220 p.
- Lynd, L. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 21: 403-65.
- Lynd, L. *et al.* 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 506-577.
- Lynd, L. *et al.* 2005. Consolidated bioprocess of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 577-583.
- Mosier, N. *et al.* 2005. Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96: 673-686.
- Pérez-Guerra, L. *et al.* 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *electronic. Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry* 2(3): 343-350.
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transactions* (30): part 6.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.
- Ratledge, C. y J. Wynn. (sin año). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. University of Hull. United Kingdom. 204 p.
- Sun, Y. y J. Cheng. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production. *Bioresource Technology* 96: 1599-1606.

Taniguchi M. *et al.* 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(6): 637-643.

Wyman, C. *et al.* 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 9: 1959-1966.

Website ECN. 2006. En: <http://www.ecn.nl/phyllis/search.asp> ID 1361; consulta: diciembre 2007.