



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**Máster en Investigación en Ingeniería**

**De Procesos y Sistemas Industriales**

# **MASTER EN INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA DE PROCESOS Y SISTEMAS INDUSTRIALES**

**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Valorización de bagazo de la industria cervecera  
mediante su transformación en biocombustibles  
avanzados: biobutanol.**

Autor: D. Pedro Enrique Plaza Lázaro

Tutora: D<sup>a</sup>. Mónica Coca

Tutora: D<sup>a</sup>. María Teresa García-Cubero

Valladolid, Julio de 2017



## Resumen y palabras clave.

La producción de biocombustibles es uno de los grandes desafíos industriales de este siglo. Los problemas de contaminación y la incertidumbre que rodea a los combustibles fósiles (costes, disponibilidad, etc.) hacen necesario que se desarrollen procesos que permitan obtener combustibles a partir de residuos. Uno de los residuos más abundantes es la biomasa lignocelulósica, rica en carbohidratos, que puede ser utilizada en procesos de fermentación. El principal problema de la biomasa lignocelulósica es la dificultad para liberar los monosacáridos presentes en ella, haciendo necesarias etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática para obtener un medio rico en monosacáridos que pueda ser fermentado por un microorganismo productor de biocombustibles. En este trabajo se estudia la viabilidad de la producción de biobutanol utilizando *Clostridium beijerinckii*, partiendo de bagazo de cerveza.

Palabras clave: biomasa lignocelulósica, celulosa, pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación, butanol.

## Abstract and keywords.

Production of biofuels is one of the biggest industrial challenges of this era. The problems of pollution and the uncertainty around fossil fuels (costs, availability, etc.) make necessary the development of processes that allow to obtain fuel from residues. One of the more abundant residues is the lignocellulosic biomass, rich in carbohydrates, which can be employed on fermentation processes. The main problem of lignocellulosic biomass is the difficulty of releasing its monosaccharides, making necessary a pretreatment and enzymatic hydrolysis steps to obtain a monosaccharide enriched medium that can be fermented by a biofuels producing microorganism. On this work, the viability of producing biobutanol with *Clostridium beijerinckii*, using brewers' spent grain is studied.

Keywords: lignocellulosic biomass, cellulose, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, butanol.



## Índice.

1	Introducción.....	9
1.1	Biocombustibles.....	9
1.1.1	Biocombustibles de primera generación.....	9
1.1.2	Biocombustibles de segunda generación.....	9
1.1.3	Biocombustibles de tercera generación.....	9
1.1.4	Butanol.....	10
1.2	Materiales lignocelulósicos.....	10
1.2.1	Celulosa.....	11
1.2.2	Hemicelulosa.....	11
1.2.3	Lignina.....	11
1.2.4	Estructura.....	12
1.3	Proceso completo de producción del butanol a partir de materiales lignocelulósicos.....	13
1.4	Pretratamientos.....	13
1.4.1	Pretratamientos físicos.....	14
1.4.2	Pretratamientos térmicos.....	15
1.4.3	Pretratamientos ácidos.....	15
1.4.4	Pretratamientos alcalinos.....	16
1.4.5	Pretratamientos oxidativos.....	16
1.4.6	Pretratamientos biológicos.....	16
1.4.7	Pretratamientos combinados.....	17
1.5	Hidrólisis enzimática.....	17
1.6	Fermentación.....	18
1.6.1	Fermentación ABE.....	19
1.6.2	Clostridium beijerinckii.....	19
1.7	Bagazo de cerveza.....	23
2	Objetivos.....	25
3	Materiales y métodos.....	27
3.1	Bagazo de cerveza.....	27
3.2	Hidrólisis enzimática.....	27
3.3	Microorganismo.....	28

3.4 Fermentación ABE.....	28
3.5 Métodos analíticos.....	29
3.6 Análisis de datos.....	29
4 Resultados y discusión.....	31
4.1 Elección de pretratamiento.....	31
4.1.1 Influencia de la temperatura y del tiempo de pretratamiento.....	31
4.1.2 Influencia del pH en el pretratamiento térmico del bagazo de cerveza. .....	34
4.2 Proceso fermentación ABE.....	41
4.2.1 Sólido pretratado.....	41
4.2.2 Hidrólisis enzimática.....	43
4.2.1 Fermentación de hidrolizados enzimáticos.....	47
4.2.2 Fermentación de líquidos de pretratamiento.....	50
4.2.3 Balance de materia.....	53
5 Conclusiones.....	55
6 Agradecimientos:.....	57
7 Bibliografía.....	59





# 1 Introducción.

Uno de los mayores problemas en la actualidad es la contaminación ambiental debido a los procesos industriales y al transporte, ya sea por tierra, mar o aire (Bespalov et al., 2016). El consumo de energía y de emisión de gases de efecto invernadero crece cada año, aunque los esfuerzos de gobiernos y organismos de regulación están consiguiendo que esta tendencia disminuya (Iftikhar et al., 2016). En Europa, el transporte genera anualmente el 30% de los gases de efecto invernadero, representando el CO<sub>2</sub> más del 78% de ellos (Nocera & Cavallaro, 2016).

Otro de los grandes problemas es el aumento y la fluctuación del coste de las fuentes de energía, especialmente el petróleo y sus derivados (Aguilera, 2014). El incremento en costes y en gases contaminantes ha provocado la recuperación de métodos de producción de combustibles más ecológicos y empleados años atrás. Uno de estos métodos es la fermentación de materia vegetal para la obtención de combustibles líquidos como el etanol y el butanol (Saladini et al., 2016).

## 1.1 Biocombustibles.

Los Biocombustibles son químicos de alto contenido energético generados a través de procesos biológicos o derivados de biomasa de organismos vivos, como microalgas, plantas y bacterias (Rodionova et al, 2017). Estos biocombustibles pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos.

En la producción de biocombustibles a partir de biomasa, se pueden distinguir tres tipos:

### 1.1.1 Biocombustibles de primera generación.

Los combustibles de primera generación son producidos a partir de cultivos dedicados exclusivamente a la generación de combustibles. Estos cultivos en algunos casos son también utilizados para alimentación.

Entre 2013 y 2015, el 77% del bioetanol fue producido a partir de maíz y caña de azúcar, mientras que el 81% del biodiesel fue obtenido a partir de aceites vegetales (OECD/FAO, 2016).

### 1.1.2 Biocombustibles de segunda generación.

Los combustibles de segunda generación son producidos a partir de materias no utilizadas en alimentación, como son los residuos lignocelulósicos. En ellos se incluyen residuos provenientes de la actividad agroalimentaria, así como del procesado de alimentos (biomasa descartada).

### 1.1.3 Biocombustibles de tercera generación.

Los biocombustibles de tercera generación son producidos a partir de biomasa cultivada en agua, como las algas.

Los sistemas de producción de microalgas tienen ciertas ventajas frente a los otros tipos de biocombustibles, debido a que alcanzan unos rendimientos de biomasa por unidad de superficie mayores que los cultivos terrestres, pueden crecer en zonas no

cultivables y pueden ser producidas empleando corrientes de agua residuales, limpiando estas aguas a la vez que crecen (Correa et al., 2017).

La razón evidente para no producir biocombustibles de primera generación es evitar el uso de cultivos empleados en alimentación, lo que puede llevar a problemas como el aumento de precio de alimentos como el trigo, maíz y cebada (los tres principales cultivos a nivel mundial) y el cambio de la utilización de las tierras, lo que puede ser devastador en los países en desarrollo. Debido a estos problemas, los biocombustibles de segunda generación son una alternativa atractiva, utilizando lo que antes era considerado como simples residuos y evitando el uso de cultivos alimentarios comerciales.

#### 1.1.4 Butanol.

Dentro de los biocombustibles líquidos el etanol y el butanol son dos de los más importantes. En comparación con el etanol, el butanol tiene mayor poder energético (29 MJ/L frente a 21 MJ/L) y bastante similar a la gasolina (33 MJ/L). También tiene mejores propiedades al ser menos corrosivo, una menor presión de vapor, menor miscibilidad con el agua y puede ser transportado en las tuberías existentes (Bellido et al., 2014). El butanol puede ser producido mediante procesos biológicos, empleando residuos lignocelulósicos de bajo coste procedentes de procesos agrarios e industriales.

En el proceso de fermentación, llevado a cabo por cepas de *Clostridium* en condiciones anaeróbicas, además de butanol también se producen acetona y etanol en la que es denominada fermentación ABE. Las proporciones de los solventes varían de acuerdo a la cepa utilizada y las condiciones de fermentación, pero un ratio de ABE de 3:6:1 es lo común (Bellido et al., 2014).

## 1.2 Materiales lignocelulósicos.

Dentro de los materiales que pueden utilizarse para la producción de biocombustibles de segunda generación, en este trabajo se han seleccionado como materia prima los materiales de tipo lignocelulósico.

La biomasa lignocelulósica representa la mayor fracción de la mayoría de la materia vegetal. Algunos ejemplos de esta materia lignocelulósica incluyen los residuos agrícolas y forestales, los residuos celulósicos y gran parte de la fracción orgánica de los residuos municipales, residuos industriales, y vegetales, tanto herbáceos como leñosos, cultivados para la producción de biocombustibles (Wyman, 1994).

Los materiales lignocelulósicos contienen alrededor del 55-75% de carbohidratos, formados por polímeros de azúcares de 5 o 6 carbonos (Wyman, 1996) constituyendo las fracciones hemicelulósica y celulósica respectivamente. Estos polímeros, que se encuentran en las paredes celulares, deben ser hidrolizados hasta que se liberen los azúcares monoméricos, para que los microorganismos puedan llevar a cabo la conversión al biocombustible deseado, o a otros productos. Además de esta fracción compuesta por carbohidratos, la biomasa lignocelulósica también contiene lignina.

### 1.2.1 Celulosa.

Las paredes celulares y los tejidos estructurales de los vegetales están compuestos de celulosa, un homopolímero lineal formado por unidades de D-glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,4) (Figura 1). En estos materiales la celulosa está compuesta por zonas cristalinas y amorfas (Heldt & Piechulla, 2011). Las zonas amorfas son más fácilmente hidrolizadas por las enzimas que las zonas cristalinas. La celulosa cristalina existe en forma de microfibrillas, que son conjuntos paracristalinos de varias docenas de cadenas unidas mediante enlaces de hidrógeno a lo largo de su longitud. Estas cadenas se encuentran firmemente unidas mediante numerosos enlaces de hidrógeno, tanto a lo largo de su longitud como uniéndolos por los extremos, formando una estructura en forma de reja. Estas microfibrillas tienen una gran resistencia a la tracción y son muy resistentes a la degradación tanto biológica como química.

### 1.2.2 Hemicelulosa.

La hemicelulosa es un heteropolímero de peso molecular menor que la celulosa, con estructura ramificada con cadenas laterales cortas formadas por diferentes monosacáridos (Figura 1). Las cadenas de hemicelulosa contienen xilanos (arabinoxilanos y 4-O-metil-glucuronoxilanos), galactomananos, glucomananos y xiloglucanos ( $\beta$ -D-glucanos con cadenas laterales) (Farhat et al., 2017) que a su vez están formados por diversos monosacáridos como D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-fucosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido glucurónico y otros.

Las cadenas de hemicelulosa cubren las microfibrillas de celulosa, pero son suficientemente largas para cubrir la distancia entre microfibrillas y unir las para formar una red. La hemicelulosa une la lignina y la celulosa, aportando rigidez a la red tridimensional formada por la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. (Hendriks & Zeeman, 2009)

### 1.2.3 Lignina.

Después de la celulosa y la hemicelulosa, la lignina es el compuesto orgánico natural más abundante, llegando a suponer entre el 20 y el 30% de los tejidos vegetales. Los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico son los principales componentes de la lignina (Figura 1). Los monolignoles están unidos mediante enlaces éster, éter o carbono-carbono. La lignina se encuentra unida covalentemente a la celulosa y los xilanos. La principal finalidad de la lignina es aportar soporte estructural, impermeabilidad y resistencia frente a ataques microbiales y el estrés oxidativo (Fengel & Wegener, 1984).

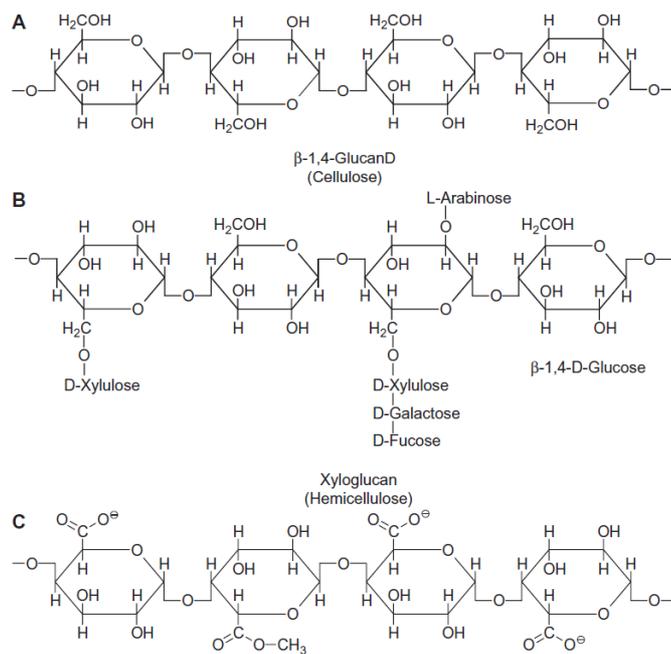


Figura 1: Componentes de la pared celular. A- Celulosa; B- Hemicelulosa; C-Lignina (Heldt & Piechulla, 2011).

#### 1.2.4 Estructura.

Actualmente no existe un modelo definitivo de la pared celular, particularmente en la relación entre la composición y sus propiedades mecánicas. En las plantas, la pared celular primaria (se forma después del crecimiento de la célula) está compuesta de celulosa (20-30%), hemicelulosa (25%), pectina (30%), y glicoproteína (5-10%). Es permeable al agua. La pectina aporta elasticidad a la pared celular, y junto con las glicoproteínas y la hemicelulosa forma la matriz en la que se encuentran insertadas las microfibrillas de celulosa (Heldt & Piechulla, 2011). Cuando la célula alcanza su tamaño y forma definitivos, se forma la pared secundaria, que está compuesta principalmente de celulosa. Las microfibrillas de celulosa se disponen en capas. La incorporación de lignina en esta pared secundaria causa la lignificación de la planta, provocando la muerte de células, que pasaran a tener únicamente una función estructural (Figura 2).

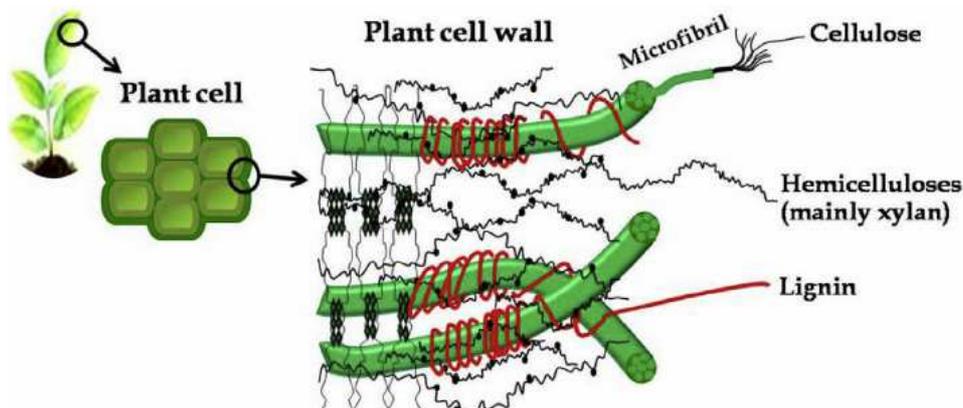


Figura 2: Estructura material lignocelulósico (Yan et al, 2015).

### 1.3 Proceso completo de producción del butanol a partir de materiales lignocelulósicos.

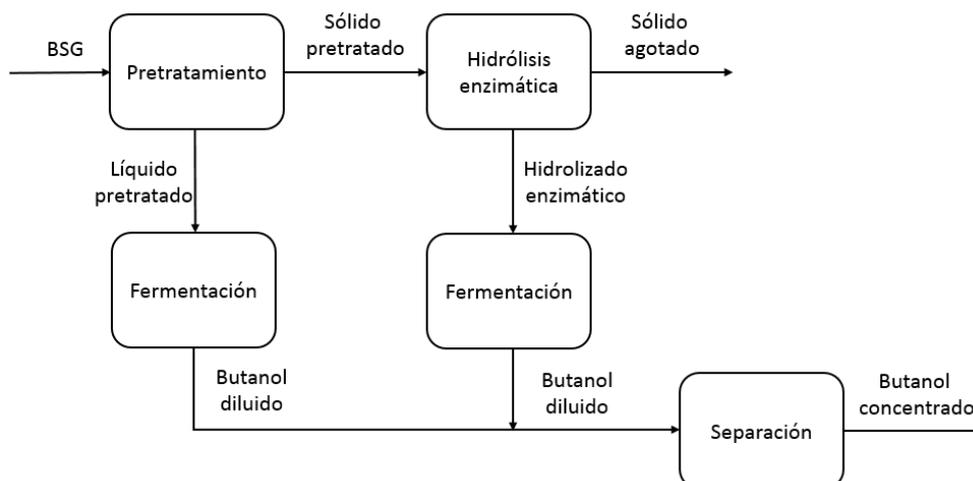


Figura 3: Diagrama de bloques de proceso de producción de butanol.

En la figura 3 se puede observar un simple diagrama de bloques en el que se muestra el proceso por el cual se producen biocombustibles, en este caso butanol, a partir de un residuo lignocelulósico. Como primer paso se somete al material a un pretratamiento, dando lugar a un sólido y un líquido pretratados. Dependiendo del pretratamiento, el líquido resultante puede que sea lo suficientemente rico en azúcares como para poder llevar a cabo una fermentación ABE. El sólido pretratado es utilizado en el proceso de hidrólisis enzimática, en el que se producen monosacáridos a partir de la celulosa y hemicelulosa, obteniendo un medio rico en monosacáridos. Con el hidrolizado enzimático rico en monosacáridos se lleva a cabo la fermentación, en la cual el microorganismo produce el butanol. La concentración de butanol obtenida en la fermentación ABE es baja, algo común a todos los procesos de tipo biológico, por lo tanto hace falta una etapa de separación en la que se separe el butanol del medio, obteniendo butanol de gran pureza para su utilización como combustible.

### 1.4 Pretratamientos.

Debido a la complejidad de los materiales lignocelulósicos, es necesario realizar un pretratamiento que altere la estructura interna para que las enzimas puedan actuar. La hidrólisis enzimática se ve afectada por diversos factores. Uno de estos factores es la cristalinidad de la celulosa. Otros factores son el grado de polimerización, el contenido en lignina (Chang & Holtzaple, 2000). Otros factores que podrían afectar en mayor medida que la cristalinidad de la celulosa son la disminución del tamaño de partícula y el aumento de la superficie disponible (Mussatto et al., 2008). Otros autores apuntan a la relación entre el tamaño de la enzima y el tamaño de los poros del material (Grous et al., 1986) como el factor limitante en la hidrólisis enzimática. La extracción de la hemicelulosa consigue aumentar el tamaño de poro, mejorando las condiciones para la hidrólisis enzimática. Por último, la lignina limita la velocidad y el alcance de la acción de las enzimas al evitar la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (Chang & Holtzaple, 2000).

Para solucionar estos problemas se recurre a pretratamientos que alteren la estructura interna del material lignocelulósico para facilitar la acción de las enzimas (Figura 4).

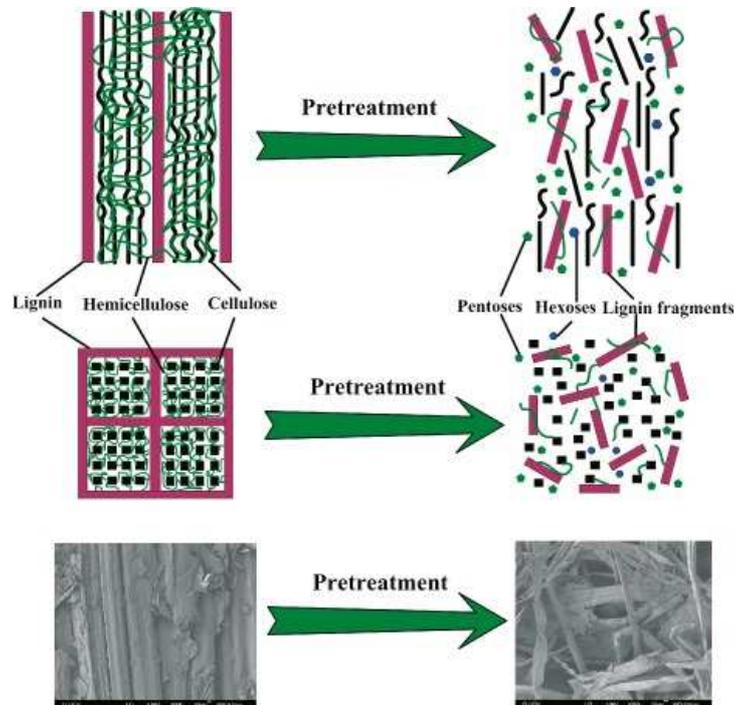


Figura 4: Consecuencias del pretratamiento (Zhao et al., 2012).

Los pretratamientos pueden ser de diversos tipos, englobándose dentro de pretratamientos físicos, químicos o biológicos.

#### 1.4.1 Pretratamientos físicos.

##### 1.4.1.1 Pretratamiento mecánico.

El pretratamiento mecánico consiste en la reducción del tamaño de partícula del material lignocelulósico mediante molienda. El objetivo de este molido aparte de la reducción de tamaño de partícula es la reducción de la cristalinidad de la celulosa. La reducción del tamaño de partícula lleva a un incremento de la superficie específica disponible y a la reducción del grado de polimerización (Palmowski et al., 1999). Los efectos que tiene el pretratamiento mecánico sobre la posterior hidrólisis enzimática se traducen en aumentos de rendimiento de hidrólisis de entre el 5 y el 25%, dependiendo de la biomasa, el tipo de molienda y la duración de la molienda, pero también reduce el tiempo de la hidrólisis entre un 23 y un 59% (Delgenés et al., 2002). Sin embargo, un molido por debajo de un tamiz 40 (0,425 mm) tiene poco efecto sobre el rendimiento y el tiempo de hidrólisis (Chang & Holtzapple, 2000).

##### 1.4.1.2 Pretratamiento por pirólisis.

Se opera a alta temperatura (por encima de los 300°C) degradando la celulosa en H<sub>2</sub>, CO y carbón residual. Una vez terminado el proceso, se separa el carbón y queda una solución compuesta principalmente por glucosa, que puede ser fermentada para obtener

biocombustibles. Este proceso se ve afectado por diversos parámetros como la temperatura, tiempo de residencia, reactor empleado y catalizador, así como por las propiedades físicas del material (Canilha et al., 2012).

#### *1.4.1.3 Pretratamiento por microondas.*

Este pretratamiento opera por la interacción directa entre el material y un campo electromagnético (Canilha et al., 2012). Este pretratamiento se puede combinar con otros para mejorar la liberación de azúcares. Como inconveniente se encuentra la elevada energía necesaria para llevar a cabo el pretratamiento, provocando que los costes aumenten.

Este método tiene la posibilidad de trabajar a presión atmosférica o a alta presión entre 3 y 30 minutos, y a temperaturas entre los 150 y los 250°C. En ambos casos el factor determinante de la temperatura es el medio donde se encuentre la biomasa sumergida, ya que puede ser desde agua, pasando por mezclas glicol-agua, hasta ácido sulfúrico (Li et al., 2016)

#### **1.4.2 Pretratamientos térmicos.**

En estos pretratamientos el material es sometido a temperaturas y presiones altas en presencia de agua. Al incrementar la temperatura del material, primero la hemicelulosa y después la lignina, comienzan a solubilizarse. Las temperaturas de operación se encuentran entre los 150 y los 250°C a presiones que eviten la evaporación del líquido. La composición de la hemicelulosa y sus ramificaciones determina la estabilidad térmica y química. De los componentes mayoritarios de la hemicelulosa, los xilanos son los menos estables térmicamente. Por encima de los 180°C, comienza la reacción exotérmica de la hemicelulosa (Hendriks & Zeeman, 2009). Durante el proceso térmico parte de la hemicelulosa se hidroliza y forma ácidos. Estos ácidos se cree que catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa (Gregg & Saddler, 1996). Otros autores opinan que hay otros factores responsables de esta solubilización de la hemicelulosa. Los tratamientos con temperaturas superiores a 160°C son capaces de solubilizar también la lignina, dando lugar a compuestos fenólicos, que tienen efectos adversos en la posterior fermentación, debido a su toxicidad para los microorganismos (Nguyen et al., 2015). Los compuestos solubles de la lignina son muy reactivos y si no se eliminan rápido, recondensan y precipitan en la biomasa (Liu & Wyman, 2003). Cuando las condiciones son muy severas se pueden llegar a formar compuestos como el furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Las temperaturas en este pretratamiento no deben superar los 250°C para evitar que haya reacciones de pirólisis no deseadas.

#### **1.4.3 Pretratamientos ácidos.**

La finalidad de los pretratamientos ácidos es solubilizar la hemicelulosa (Carvalho et al., 2008). Este pretratamiento puede ser realizado con ácidos diluidos (presiones moderadas y temperaturas entre 120 y 160°C) o en concentración alta (presiones bajas y temperaturas entre 40 y 100°C). La reacción principal que ocurre es la hidrólisis de la hemicelulosa, especialmente del xilano. Los oligómeros solubilizados pueden sufrir reacciones, liberándose monómeros, Furfural, HMF y otros productos. En los pretratamientos ácidos, la lignina solubilizada rápidamente condensa y precipita,

siendo este efecto más pronunciado al aumentar la concentración de ácido utilizado. Este aumento de inhibidores es perjudicial para los microorganismos, por lo tanto los pretratamientos ácidos diluidos son los más empleados, debido a la menor formación de inhibidores.

#### 1.4.4 Pretratamientos alcalinos.

En los pretratamientos alcalinos (presiones bajas y moderadas, temperaturas entre 30 y 130°C) las primeras reacciones que ocurren son la solvatación y saponificación (Wilkinson et al., 2014). Esto causa que el material se hinche, haciéndolo más accesible para las enzimas y los microorganismos. Cuando las concentraciones de compuestos alcalinos son altas puede darse lugar al desprendimiento de grupos terminales y degradación y descomposición de polisacáridos. La pérdida de polisacáridos es causada principalmente por el desprendimiento de grupos terminales y las reacciones hidrolíticas. Este desprendimiento es una ventaja para posteriores procesos, pero también conlleva una pérdida de azúcares asociada.

Los pretratamientos alcalinos también pueden provocar la solubilización, redistribución y condensación de la lignina y modificaciones en la celulosa cristalina. Estas consecuencias pueden afectar negativamente e incluso revertir los efectos de la eliminación de la lignina y el hinchado de la celulosa (Gregg & Saddler, 1996).

#### 1.4.5 Pretratamientos oxidativos.

Estos pretratamientos consisten en la utilización de un compuesto oxidante, como el peróxido de hidrógeno (temperaturas entre 30 y 80°C, pH 11,5). El objetivo es eliminar la lignina para facilitar el acceso a la celulosa (Jönsson & Martin, 2016). Generalmente el oxidante no es selectivo y se producen pérdidas tanto de celulosa como de hemicelulosa. El riesgo de la formación de inhibidores es alto, debido a que la lignina es oxidada y se forman compuestos aromáticos solubles.

Durante los pretratamientos oxidativos se suelen perder gran cantidad de azúcares debido a la oxidación no selectiva. También se forma compuestos solubles de la lignina, que pueden tener efectos inhibitorios en los posteriores procesos.

#### 1.4.6 Pretratamientos biológicos.

En estos pretratamientos la degradación de la hemicelulosa y la lignina es llevada a cabo por microorganismos. Los microorganismos empleados son hongos pardos y blancos, que degradan los dos compuestos mencionados anteriormente, además de la celulosa, ligeramente. Los pardos degradan principalmente la celulosa, mientras que los blancos degradan tanto la celulosa como la lignina. La degradación de los hongos blancos es llevada a cabo mediante enzimas que degradan la lignina como las peroxidasas y lactasas (Kumar & Wyman, 2009).

Diversos hongos blancos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* han sido utilizados con diversos materiales lignocelulósicos, mostrando una gran eficiencia en la delignificación (Kumar & Wyman, 2009).

Las ventajas de estos pretratamientos es que son sencillos, el aporte de energía es bajo (temperaturas entre 25 y 40°C, pH entre 4,0 y 5,0) (Sindhu et al., 2016), no hacen falta aditivos químicos y por lo tanto no se generan inhibidores que puedan afectar a la fermentación. Como desventaja se tienen altos tiempos de residencia para que la eficacia del proceso sea alta, además de grandes pérdidas de carbohidratos.

#### 1.4.7 Pretratamientos combinados.

Algunos pretratamientos se pueden combinar de manera que aumente la efectividad y disminuyan los efectos negativos.

##### *1.4.7.1 Pretratamiento ácido en combinación con pretratamiento térmico.*

Una manera de mejorar el efecto de los pretratamientos térmicos es la adición de ácidos. Esta adición de ácidos cataliza la solubilización de la hemicelulosa, rebaja la temperatura óptima del pretratamiento (temperaturas entre 120 y 160°C) y mejora el acceso al sustrato de las enzimas. Otro punto importante es que la eliminación gradual de la hemicelulosa y la lignina provocan la reorientación de la celulosa a un estado más cristalino (Gregg & Saddler, 1996). Otros autores observaron que al aumentar la concentración de ácido se producen inhibidores que afectan negativamente en la fermentación (Tengborg et al., 1998).

##### *1.4.7.2 Pretratamiento alcalino en combinación con pretratamiento térmico.*

Otra manera de mejorar el pretratamiento térmico es añadir un compuesto alcalino en vez de ácido al proceso. Mejora el acceso de las enzimas eliminando la lignina presente en el material. Sin embargo se hace necesario una etapa de lavado del material para eliminar la lignina solubilizada, que provoca inhibición a los microorganismos.

##### *Pretratamiento oxidativo en combinación con pretratamiento térmico.*

Este tratamiento se utiliza con materiales con un alto contenido en lignina, debido a que el pretratamiento alcalino no es capaz de eliminarla en cantidad suficiente. Debido a que la temperatura empleada es baja (entre 30 y 80°C), se observa una baja degradación de azúcares. Al igual que en el pretratamiento térmico alcalino, se hace necesario un lavado del material para eliminar los posibles inhibidores formados durante el proceso (Chang et al., 2001).

### 1.5 Hidrólisis enzimática.

Una vez llevado a cabo el pretratamiento para modificar la estructura interna del material, se lleva a cabo una hidrólisis enzimática para transformar las cadenas de celulosa en monosacáridos que puedan ser metabolizados por el microorganismo.

La celulosa es hidrolizada por un tipo de enzimas conocidas como celulasas. Las celulasas son una mezcla de enzimas, dentro de las cuales hay tres grupos principales (Cao & Tan, 2002).

- $\beta$ -1,4-endoglucanasas (EC 3.2.1.4.): ataca regiones de baja cristalinidad de la celulosa al azar, hidrolizando enlaces  $\beta$ -(1,4) y generando nuevos finales de cadena no reductores. Da lugar a cadenas más cortas.

- $\beta$ -1,4-exoglucanasas (EC 3.2.1.91.): también conocidas como celobiohidrolasas. Degrada los extremos no reductores de las cadenas de celulosa, liberando dímeros de celobiosa. Esta enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa, y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa.
- $\beta$ -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.21.): hidrolizan la celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, liberando monómeros de glucosa. Es de gran importancia debido a que evita la inhibición de la actividad de las anteriores enzimas por la acumulación de celobiosa en el medio.

Las celulasas son producidas por plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente por microorganismos como hongos y bacterias. Las celulasas producidas por hongos y en concreto de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, son las más utilizadas y estudiadas debido a la capacidad que tienen estos microorganismos de producirlas en gran cantidad y extracelularmente, facilitando su separación en los medios de cultivo, lo que ayuda a la reducción de costes (Oliva et al. 2003).

La hidrólisis enzimática es una reacción heterogénea que requiere contacto físico entre las enzimas y el material. Las enzimas deben difundir hasta la superficie de las partículas, difundir a través de las barreras físicas como la lignina, adsorberse en la superficie del sustrato y por último, catalizar la hidrólisis (Chang & Holtzapfle, 2000). Estas complejas reacciones se ven afectadas por las características físicas y químicas del sustrato, como son la cristalinidad, el grado de polimerización, la porosidad y los contenidos en lignina y hemicelulosa (Gregg & Saddler, 1996b).

En los materiales lignocelulósicos la celulosa está físicamente unida con la hemicelulosa, y física y químicamente unida con la lignina. La presencia de ambas dificulta el acceso de las enzimas a la celulosa, reduciendo la efectividad de la hidrólisis. El efecto de la hemicelulosa y la lignina en el material lignocelulósico ha sido investigado para diversos materiales como el bagazo de caña, rastrojos de maíz, cáscaras de arroz, etc. Siendo los resultados diferentes para cada uno de ellos.

En general, cuanto más baja sea la proporción de hemicelulosa y lignina en el material, mejores resultados se van a obtener en la hidrólisis enzimática. Sin embargo, no es necesario llegar a eliminar completamente la hemicelulosa y la lignina para alcanzar unos buenos resultados en la hidrólisis enzimática (Mussatto et al., 2008).

## 1.6 Fermentación.

La fermentación es la etapa en la que los monosacáridos producidos en la hidrólisis enzimática son metabolizados por el microorganismo para producir el biocombustible.

La fermentación se puede llevar a cabo de forma convencional, empleando dos reactores, uno para realizar la hidrólisis enzimática, y otro para llevar a cabo la fermentación utilizando el medio obtenido en la hidrólisis enzimática (Separated hydrolysis and fermentation, SHF), o empleando un único reactor en el que se lleva a cabo de forma simultánea la hidrólisis enzimática y la fermentación (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) (Dahnum et al., 2015). En la SSF, las enzimas

hidrolizan la celulosa a monosacáridos y el microorganismo los emplea según se van produciendo para la producción del biocombustible. Ambos métodos tienen sus ventajas e inconvenientes. En el proceso SHF, al realizarse en dos reactores independientes, cada proceso puede ser llevado a cabo en sus condiciones óptimas de pH, temperatura, agitación, aporte de gases, etc. Mientras, en el proceso SSF, las condiciones deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas y limitantes de ambos procesos. Por otra parte, el proceso SSF consigue reducir costes y tiempo de operación, al reducir el número de pasos y también minimiza posibles problemas de inhibición por sustrato.

### 1.6.1 Fermentación ABE.

La producción de acetona y butanol mediante diferentes especies de *Clostridium* fue uno de los primeros procesos de fermentación a nivel industrial desarrollados, y durante la primera parte del siglo XX, solo estuvo por detrás de la obtención de etanol. La aparición, durante el principio de la segunda mitad del siglo XX, de la obtención de butanol a partir de la industria petroquímica provocó que se dejara de emplear el proceso de fermentación, debido a la incapacidad de este de competir económicamente con la síntesis química del butanol.

En los últimos años, el interés en el uso de fuentes renovables para la producción de compuestos químicos y los recientes avances en el campo de la biotecnología han dado lugar a un renovado interés en el uso de la fermentación para la obtención de butanol y acetona (Patrascu et al., 2017).

En la actualidad ha habido un aumento de la investigación enfocada a obtener un mejor conocimiento de esta compleja fermentación, con el objetivo de desarrollar un proceso más eficiente y competitivo.

La producción de solventes a escala industrial (primera mitad del siglo XX) era llevada a cabo en reactores discontinuos, utilizando fermentadores sin agitación mecánica, con una capacidad de 227 a 909 m<sup>3</sup>. El proceso industrial inicialmente utilizaba entre un 8 y un 10% de puré de maíz, que era primeramente pretratado entre 60 y 90 minutos a 130°C. Los fermentadores se llenaban al 90-95% de su capacidad y se burbujeaba CO<sub>2</sub> antes y después de la inoculación para mantener las condiciones anaerobias y facilitar el mezclado. Los microorganismos (del género *Clostridium*, siendo los más comunes *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii*) se mantenían normalmente en forma de esporas en arena esterilizada. Los inóculos eran preparados mediante un choque térmico de las esporas, y después de entre 2 y 4 etapas de escalado, las células eran inoculadas en el fermentador a una concentración de entre el 2 y el 4%. Las fermentaciones se llevaban a cabo entre 34 y 39°C durante 40 a 60 horas, produciendo rendimientos de alrededor del 25%. La concentración final de solventes (ABE) producida estaba en torno a 12-20 g/L (Jones & Woods, 1986).

### 1.6.2 *Clostridium beijerinckii*.

El microorganismo empleado en esta reacción de fermentación es *Clostridium beijerinckii*. Este microorganismo tiene dos rutas metabólicas, una primera en la que se producen ácidos (acidogénesis) y otra a continuación en la que se producen etanol, butanol y acetona (solventogénesis).

En la ruta acidogénica, el microorganismo emplea la fuente de carbono del medio para producir ácidos (acetato y butirato) (Figura 5).

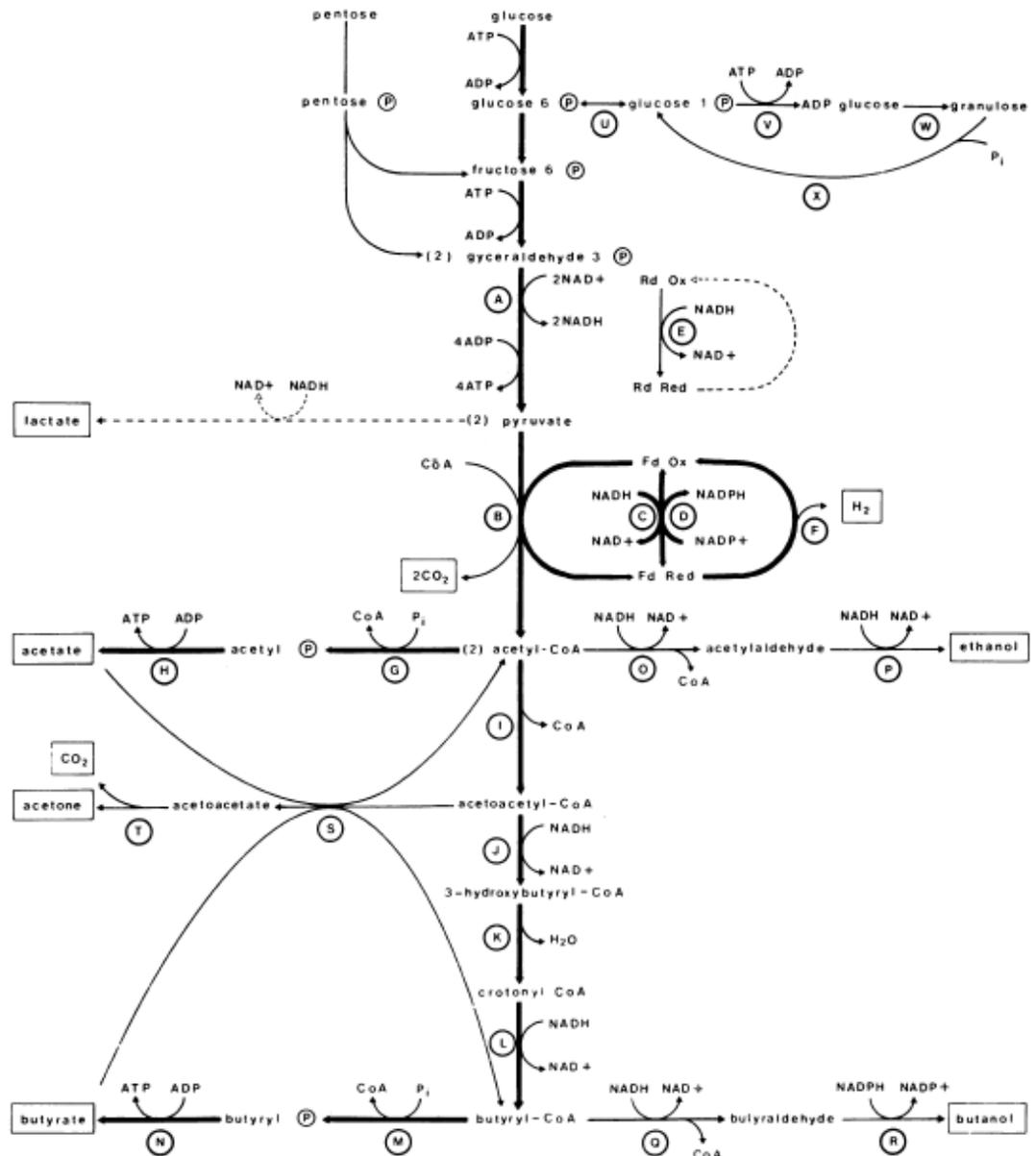


Figura 5: Ruta metabólica de la acidogénesis (Jones & Woods, 1986).

Al finalizar la fase acidogénica se emplean los ácidos producidos anteriormente y la fuente de carbono del medio para producir butanol, etanol y acetona (Figura 6).

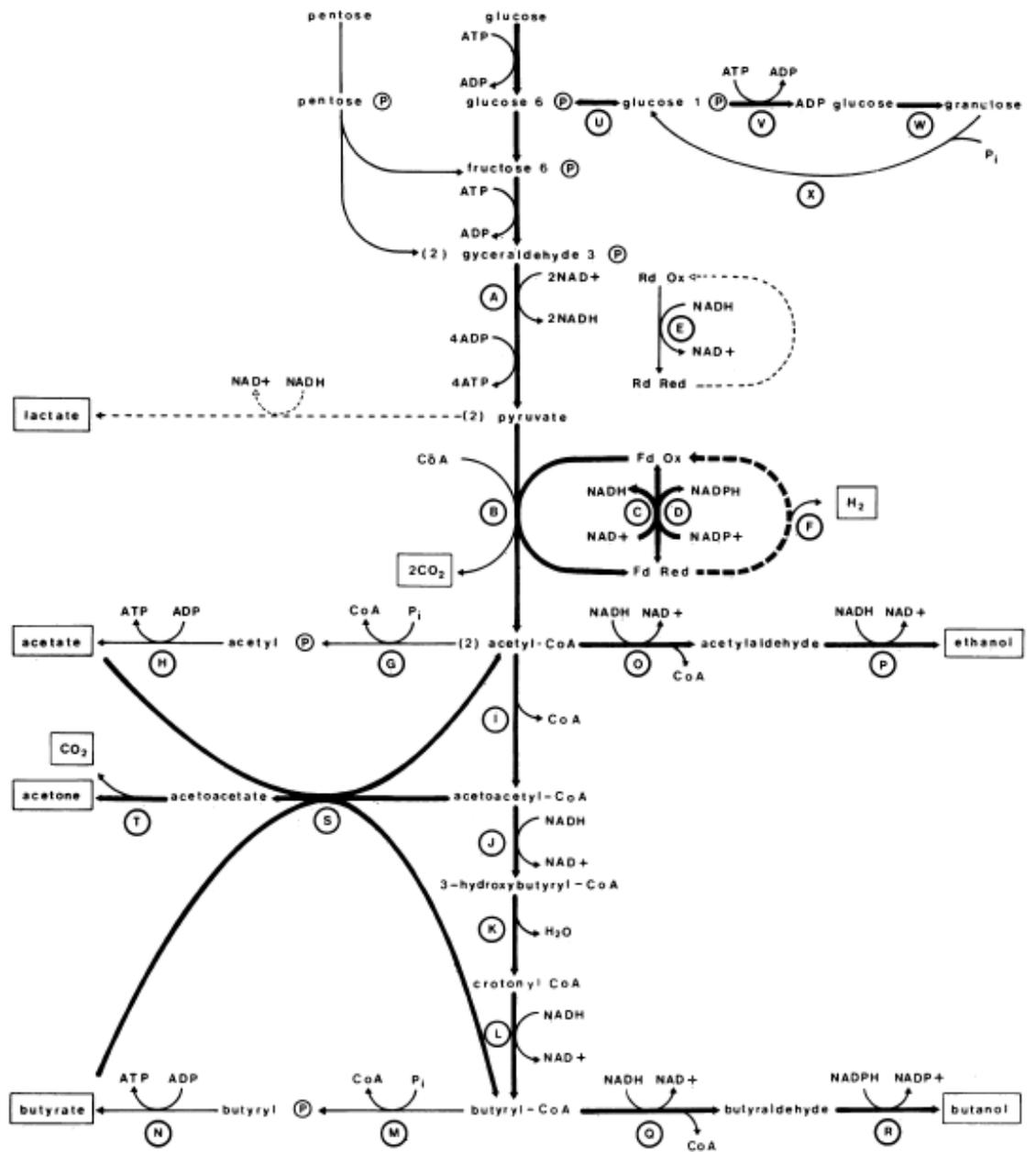


Figura 6: Ruta metabólica de la solventogénesis (Jones & Woods, 1986).

Este paso de la fase acidogénica a la solventogénica está controlada por varios factores, como son el pH del medio, los ácidos presentes en el medio, el pH interno del microorganismo, los nutrientes presentes en el medio, la temperatura y la presencia de oxígeno.

#### 1.6.2.1 pH externo.

Al bajar el pH en torno a 4,5-5 comienza la fase solventogénica. Si el pH no baja, el microorganismo solo produce ácidos. El rango de pH en el que se inicia la fase solventogénica depende de la cepa utilizada. Si el pH baja excesivamente, se inhibe el crecimiento y el metabolismo celular.

#### 1.6.2.2 Producción de ácidos.

Si la concentración de ácidos es elevada, se inhibe el metabolismo. A concentraciones bajas, el crecimiento se ralentiza, pero el consumo de sustrato y el metabolismo continúan. La producción de solventes es una respuesta adaptiva al efecto inhibitorio de los ácidos, actúa como un mecanismo de detoxificación. El comienzo de la producción de solventes es asociado con la bajada del pH y la acumulación de ácidos.

#### 1.6.2.3 pH interno.

Estos microorganismos no son capaces de mantener constante el pH interno, en cambio, mantienen constante el gradiente de pH con el exterior a través de la membrana celular. Este gradiente se mantiene mediante la expulsión de protones, consumiendo energía metabólica en el proceso. Si no hay sustrato del que obtener energía, la célula no es capaz de mantener el gradiente de pH. Mantener el gradiente de pH es esencial para el crecimiento celular y el metabolismo.

#### 1.6.2.4 Limitación de nutrientes.

Si las fuentes de carbono son bajas, sólo se producen ácidos, pero no en la cantidad suficiente como para inducir la producción de solventes. Es necesario que haya azúcares en cantidad suficiente para el inicio y el mantenimiento de la producción de solventes. Si la concentración de amonio es baja, la glucosa consumida baja y no se entra en fase solventogénica, por lo tanto, la relación entre amonio y glucosa afecta a la inducción de la fase solventogénica. Los factores limitantes de crecimiento deben estar en un rango de concentraciones que permita el crecimiento y el consumo de sustrato para llegar a los límites de concentración de butirato y acetato.

#### 1.6.2.5 Temperatura y oxígeno.

La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 y 33°C, si sube, la producción de solventes es menor. El oxígeno inhibe las funciones celulares, pero es reversible al volver a condiciones anaerobias. Por otra parte, la exposición a oxígeno mejora la producción de esporas.

Uno de los principales problemas del *C. beijerinckii* es la inhibición por producto que se da cuando los solventes alcanzan cierta concentración.

Durante la fase solventogénica, el metabolismo celular continúa hasta que se llega a la inhibición por solventes a una concentración de unos 20 g/L. Al alcanzar esta concentración el metabolismo celular se detiene. Las bajas concentraciones de solventes producidos durante la fermentación es una de las principales limitaciones para la producción de solventes a nivel industrial. De los solventes producidos, el butanol es el más tóxico y es el único producido en concentraciones inhibitorias durante la fermentación. La producción de solventes se detiene cuando la concentración de butanol alcanza los 13 g/L. Las concentraciones de etanol y acetona, no alcanzan niveles inhibitorios durante la fermentación. La acetona y el etanol inhiben el crecimiento un 50% cuando se llega a concentraciones de 40 g/L (Costa et al., 1983). El rendimiento de butanol y ABE con cepas no modificadas se sitúa en torno a 0,20 g/g y 0,30 g/g respectivamente y la productividad en torno a 0,06 g butanol/L·h (Lu et al., 2013). En cepas modificadas

genéticamente (*C. beijerinckii* BA101) se llegan a rendimientos de ABE de 0,35 g/g y productividades en torno a 0,10 g butanol/L·h (Qureshi et al., 2008).

El mecanismo de la toxicidad del butanol está relacionado con la naturaleza hidrofóbica de este compuesto, que provoca la disrupción del componente fosfolípido de la membrana celular. El incremento de la fluidez de la membrana en la presencia de butanol resulta en la desestabilización de la membrana y la interrupción de las funciones relacionadas con la membrana.

### 1.7 Bagazo de cerveza.

Un material lignocelulósico considerado como residuo y de gran interés es el bagazo de cerveza (Brewers' spent grain, BSG) (Figura 7). Una de sus ventajas es que se encuentra disponible a lo largo del año a bajo coste y gran cantidad, al contrario de los cultivos convencionales (Robertson et al., 2010). La industria cervecera produce una gran cantidad de residuos, siendo el bagazo de cerveza alrededor del 85% de ellos (Mussatto & Roberto, 2006). Por cada 100 litros de cerveza se producen 20 kg de bagazo (Vieira et al., 2014). En España, la producción anual de bagazo de cerveza fue de unos 646 millones de kilogramos en el año 2014. La producción mundial anual ronda los 39200 millones de kilogramos (Ministerio de agricultura, 2014).



Figura 7: Bagazo de cerveza seco.

El bagazo de cerveza es un material lignocelulósico tradicionalmente utilizado como alimento de vacas y otros rumiantes, debido a su alto contenido en carbohidratos y proteínas y su bajo coste, ya sea seco o húmedo (Cook, D., 2011). Este uso ha sido demostrado beneficioso, incrementando la producción y calidad de la leche de vaca (Belibasakis & Tsigogianni, 1996), pero su alto contenido en material lignocelulósico lo hace indigestible para muchas especies animales. Debido a su alto contenido en humedad, el bagazo de cerveza se degrada con facilidad.

El bagazo de cerveza también ha sido empleado para la producción de energía. La más simple es la combustión, si bien presenta ciertos problemas, ya que el bagazo debe ser secado previamente y produce una gran cantidad de sustancias contaminantes como el NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>. También ha sido empleado para la producción de carbón vegetal, pero sus propiedades son peores que las del carbón vegetal obtenido a partir de serrín. Este carbón vegetal puede ser empleado también para capturar nitrógeno presente en aguas residuales y ser transformado posteriormente en fertilizante.

El alto contenido en celulosa y hemicelulosa en el bagazo de cerveza (en torno al 50% w/w MS) lo hace atractivo para la producción de biocombustibles como hidrógeno, biogás, etanol y butanol mediante procesos de fermentación. El bagazo de cerveza al igual que el resto de materiales lignocelulósicos, presenta ciertos problemas para ser hidrolizado enzimáticamente, derivados de la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la relación entre tamaño de poro y tamaño de enzima y el contenido en lignina del material (Mussatto et al., 2008)

El alto contenido en lignina del bagazo de cerveza (entre un 12 y un 28% w/w MS) hace necesario un proceso de pretratamiento para modificar la estructura interna lignocelulósica, permitiendo a las enzimas acceder a la celulosa y hemicelulosa durante el proceso de sacarificación (Sun & Cheng, 2002).

## 2 Objetivos.

El objetivo de este trabajo es la obtención de biocombustibles (biobutanol) a partir del uso de bagazo de cerveza, un residuo industrial lignocelulósico, empleando microorganismos de tipo *Clostridium* (en este caso *C. beijerinckii*).

Para alcanzar este objetivo global, se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Determinar las mejores condiciones de pretratamiento térmico (pH, temperatura, tiempo de pretratamiento) que aseguren la máxima recuperación de monosacáridos, manteniendo unas condiciones lo más suaves posibles para evitar la formación de compuestos inhibidores y mantener los costes de operación lo más bajos posible.
- Desarrollar el proceso completo de producción de biobutanol (encadenando pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación) utilizando el microorganismo *C. beijerinckii* en un proceso de fermentación ABE, con la finalidad de obtener butanol, con adecuadas concentraciones y rendimientos.



## 3 Materiales y métodos.

### 3.1 Bagazo de cerveza

El bagazo de cerveza fue suministrado por una microcervecería (Cerveza Milana) situada en Valladolid, España. El bagazo de cerveza fresco fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El bagazo de cerveza se seca en un horno a  $45^{\circ}\text{C}$  previamente a la realización de los experimentos. El bagazo de cerveza tiene una distribución de tamaño de partícula: 85% entre 2 y 5 mm, 12% entre 1 y 2 mm y el resto menor de 1 mm.

Se llevaron a cabo diferentes pretratamientos de tipo térmico modificando el pH, la temperatura, el tiempo de pretratamiento y la carga de sólidos con el fin de determinar la mejor estrategia para conseguir una mayor liberación de monosacáridos en la hidrólisis enzimática. Todos los pretratamientos se llevaron a cabo con material sin moler, excepto los que se llevaron a cabo para determinar la influencia de la molienda.

Los pretratamientos llevados a cabo fueron:

- Pretratamiento térmico a pH del bagazo.
- Pretratamiento térmico ácido diluido a pH 1, 2 y 4: ajuste con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M.
- Pretratamiento térmico alcalino diluido a pH 8: ajuste con NaOH 3M.

Los ensayos se realizaron en las condiciones siguientes:

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Temperaturas de  $121$  y  $134^{\circ}\text{C}$ .
- Tiempos de pretratamiento de 30 y 60 minutos.
- Carga de sólidos del 5, 10 y 15% w/w en materia seca (MS).
- Agua destilada tipo II.

Una vez finalizado el pretratamiento se llevó a cabo una filtración a vacío a través de un embudo Büchner y un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío (Papel de filtro cualitativo 1320, tamaño de poro 60-68  $\mu\text{m}$ ). El sólido restante se utilizó en la posterior hidrólisis enzimática. Cuando se requirió, el sólido fue lavado tres veces con una relación de 12 mL de agua tipo II/g MS (filtrando a vacío entre lavados), ajustando el pH a 5,5 utilizando NaOH 3M durante el segundo lavado.

La fase sólida fue caracterizada para determinar sólidos totales, carbohidratos estructurales, lignina, proteína y contenido en ceniza, siendo conservada a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en la hidrólisis enzimática. La fracción líquida fue analizada para determinar monosacáridos y productos de degradación como ácidos orgánicos (ácidos acético y fórmico), furfural, HMF y compuestos fenólicos, siendo conservada a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en la fermentación ABE. Los pretratamientos fueron llevados a cabo por triplicado.

### 3.2 Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en matraz erlenmeyer de 100 mL, en un agitador orbital (Comecta Optic Ivymen System) utilizando el bagazo pretratado y agua destilada. Las condiciones experimentales fueron pH 4,8, 150 rpm,  $50^{\circ}\text{C}$ , 48 horas y una carga de sólidos del 5 y el 10% w/w. Se utilizó un coctel comercial de enzimas, compuesto

de Celluclast 1.5L (celulasas) y Novozyme 188 ( $\beta$ -glucosidasas) aportado por Novozymes (Dinamarca). La carga enzimática fue ajustada a 15 FPU/g MS de Celluclast y 15 IU/g MS de Novozyme 188. Una vez finalizó la hidrólisis enzimática, se tomaron muestras, se centrifugaron y fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (monosacáridos, ácidos orgánicos, Furfural, HMF y compuesto fenólicos).

El hidrolizado enzimático rico en monosacáridos se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en la fermentación ABE. Las pruebas de hidrólisis enzimática fueron llevadas a cabo por triplicado. Los monosacáridos presentes en los cócteles de enzimas fueron determinados y tenidos en cuenta en los resultados. La recuperación de glucosa (referida a BSG pretratado) fue calculada a partir de los valores de glucosa liberada en los hidrolizados enzimáticos (g glucosa/g BSG pretratado), multiplicado por un factor de 0,9 y dividido por el contenido de glucano en el BSG pretratado (g glucano/g BSG pretratado). La recuperación de glucosa (referida a BSG no pretratado) fue calculada a partir de los valores de glucosa liberada en los hidrolizados enzimáticos (g glucosa/g BSG pretratado), multiplicado por un factor de 0,9, por la recuperación gravimétrica total y dividido por el contenido en glucano del BSG no pretratado (g glucano/g BSG no pretratado). Las recuperaciones de xilosa y arabinosa fueron calculadas de manera similar, utilizando un factor de 0,88. Los factores 0,9 y 0,88 provienen de la conversión estequiométrica del glucano a glucosa y del xilano y arabinano a xilosa y arabinosa, respectivamente.

### 3.3 Microorganismo.

El microorganismo utilizado es *Clostridium beijerinckii* DSM 6422, obtenido de la colección alemana de microorganismos (DSMZ, Leibniz, Alemania). La cepa se conservó en Reinforced Clostridial Medium, RCM, (Fluka, Sigma-Aldrich, España) en tubos Hungate (18x150 mm), en forma de esporas y conservado en frío a  $4^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas. Los inóculos se reprodujeron en tubos Hungate de 15 mL con septum de goma bajo condiciones anaeróbicas utilizando RCM y gaseado con nitrógeno puro. Un choque térmico se llevó a cabo a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, después a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y se repitió el proceso tres veces para estimular la germinación de las esporas.

### 3.4 Fermentación ABE.

Los hidrolizados enzimáticos y la fracción líquida del pretratamiento ácido fueron utilizados como sustrato para la fermentación ABE llevada a cabo por *C. beijerinckii* DSM 6422. Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo en viales de 20 mL con septum de goma a  $35^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas gaseando nitrógeno en la fracción líquida. Previamente a la adición del inóculo, el pH de los hidrolizados fue ajustado a 5,5 utilizando NaOH 3M, y después autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Después de la esterilización una solución de vitaminas (0,001 g/L PABA, 0,00001 g/L biotina), una solución de sales (0,60 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0,01 g/L  $\text{MnSO}_4$ , 0,05 g/L  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 g/L NaCl, 0,06 g/L KCl) y buffer acetato (0,50 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,50 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,20 g/L acetato de amonio) fueron añadidos al medio, y el precultivo fue inoculado (10% v/v) y gaseado con nitrógeno puro. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

La fracción líquida del pretratamiento ácido diluido fue fermentada después de ajustar el pH a 5,5 con NaOH o después de un proceso de detoxificación por overliming

utilizando hidróxido de calcio. El primer paso del proceso de overliming consistió en ajustar el pH a 10 añadiendo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mientras se agitaba a 25°C durante 30 minutos. La cantidad añadida fue apuntada. A continuación la mezcla se filtró a vacío. El líquido después se reacidificó a pH 5,5 añadiendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M y fue filtrado a vacío de nuevo.

### 3.5 Métodos analíticos.

El BSG fue caracterizado utilizando los procedimientos analíticos del National Renewable Energy Laboratory (Sluiter et al., 2008). Las proteínas fueron determinadas como  $\text{Nx}5,85$ , siendo N el nitrógeno Kjeldahl.

La concentración de azúcares, ácidos orgánicos, solventes e inhibidores potenciales fueron determinados mediante HPLC. El detector estaba basado en la medida del índice de refracción (Waters 2414 Refractive Index Detector). Una columna Aminex HPX-87H fue utilizada, permitiendo la cuantificación de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido butírico, Furfural, HMF, etanol, acetona y butanol.

Las condiciones de operación fueron: 0,01 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como fase móvil, flujo de 0,6 mL/min y 30°C para la determinación de solventes y 60°C para la determinación de azúcares, ácidos orgánicos, furfural y HMF.

Las muestras fueron centrifugadas previamente a 13400 rpm durante 10 minutos y filtradas con filtros de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$ .

El contenido total de fenólicos fue analizado con espectrofotómetro (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) a una longitud de onda de 765 nm, utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965).

### 3.6 Análisis de datos.

Las diferencias estadísticas fueron determinadas utilizando análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando el software comercial Statgraphics Centurion XVII. El test de rango múltiple de Tukey fue utilizado para buscar diferencias significativas en las medias.



## 4 Resultados y discusión.

### 4.1 Elección de pretratamiento.

En esta primera tanda de experimentos se realizaron pruebas a distintos valores de pH, tiempos y temperaturas para determinar cuál era el más efectivo de cara a la liberación de monosacáridos en la posterior hidrólisis enzimática. Las pruebas se realizaron con un bagazo de cerveza con las características expuestas en la tabla 1.

Componente (% MS)	
Glucano	24,7±4,7
Xilano	14,3±2,6
Arabinano	6,8±1,0
Lignina ácida soluble	6,6±0,1
Lignina ácida insoluble	16,5±1,5
Lignina Total	23,2±1,6
Cenizas	3,8±0,0
Proteínas	22,5±1,9

Tabla 1: Composición del bagazo de cerveza empleado en los experimentos de estudio del pretratamiento.

#### 4.1.1 Influencia de la temperatura y del tiempo de pretratamiento.

En la primera batería de pruebas se intentó determinar cuáles eran las mejores condiciones de pretratamiento del material en cuanto a temperatura y tiempo. Se realizaron ensayos a pH 4 ajustando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, tiempos de 30 y 60 minutos, temperaturas de 121 y 134°C y cargas de sólidos del 5, 10 y 15% MS w/w para analizar la influencia de estas variables en el pretratamiento.

A partir de los datos experimentales, se ha calculado la recuperación de glucosa y de azúcares totales (glucosa, xilosa y arabinosa), referida al sólido inicial. Al observar los valores de recuperación de glucosa y monosacáridos totales (Figuras 8 y 9), se observa que la recuperación no varía de manera significativa con la carga de sólidos. También se hace patente que al aumentar la temperatura o el tiempo de pretratamiento no se consiguen mejores resultados. Al aumentar tanto la temperatura como el tiempo, lo que sí se consigue es aumentar la concentración de inhibidores (Tabla 2) como el ácido acético (de 1,0 a 1,2 g/L), furfural (de 0 a 3 mg/L) y el HMF (de 0 a 2 mg/L), que pueden ser contraproducentes de cara a la etapa de fermentación.

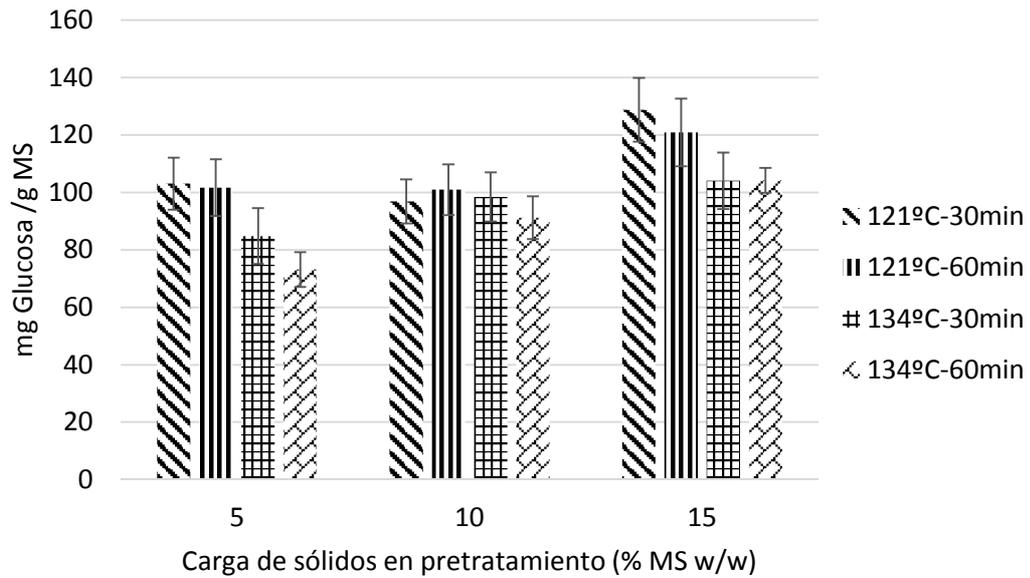


Figura 8: Recuperación de glucosa en el hidrolizado enzimático referido al bagazo sin pretratar. Influencia del porcentaje de materia seca, tiempo y temperatura. P-retratamiento térmico a pH 4.

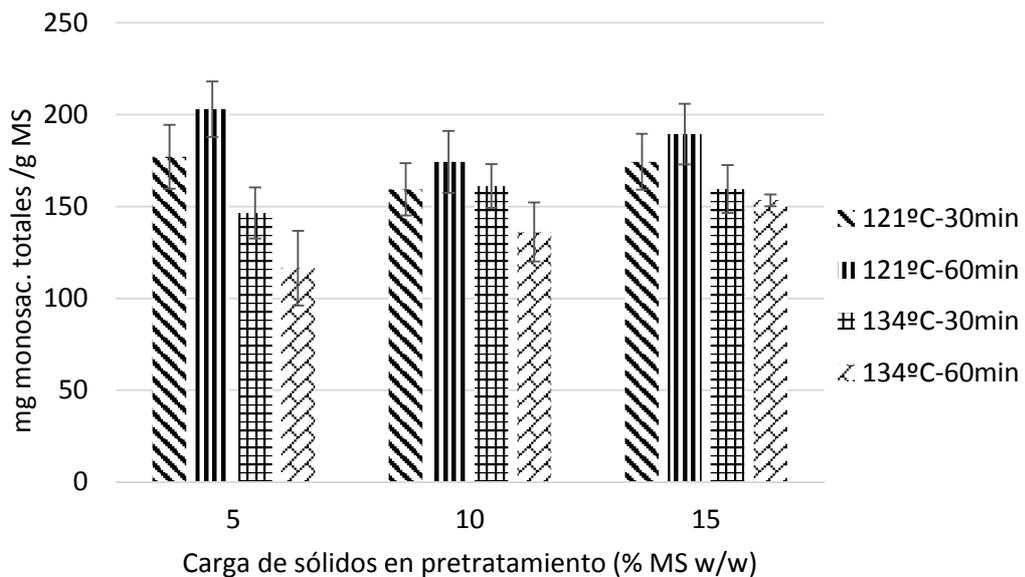


Figura 9: Recuperación de monosacáridos en el hidrolizado enzimático referido al bagazo sin pretratar. Influencia del porcentaje de materia seca, tiempo y temperatura. Pretratamiento térmico a pH 4.

En un trabajo llevado a cabo por Martínez-Patiño et al. (2017), se observaron resultados similares después del pretratamiento ácido diluido con ácido sulfúrico utilizando biomasa de olivo, obteniéndose aumentos de la recuperación de monosacáridos leves al aumentar el tiempo de pretratamiento (aumentos de recuperación del 5%). Solamente se observaron aumentos notables en la recuperación de monosacáridos al aumentar la concentración de ácido sulfúrico empleado en el pretratamiento. Las concentraciones de inhibidores (ácido acético, furfural y HMF) también aumentaron al aumentar el tiempo de pretratamiento. En otro trabajo llevado a cabo por Wilkinson et al. (2014) en el que se realizaron pretratamientos con peróxido

alcalino sobre bagazo de cerveza, se observó que para aumentar la recuperación de manera significativa hacía falta aumentar la temperatura del pretratamiento en gran medida (de 20 a 100°C o aumentar notablemente el tiempo de reacción (de 1 a 5 horas).

En otra batería de pruebas se compararon los resultados a pH 4, 121°C y 30 minutos para material sin moler y material molido a un tamaño de partícula entre 1 y 2 mm (datos nos mostrados). A partir de estos resultados se decidió prescindir del proceso de molienda debido a que no se observaron diferencias significativas entre ambas opciones y la molienda supone un coste energético adicional de cara al proceso.

Por lo tanto se decide continuar los experimentos modificando el pH del pretratamiento y fijando un tiempo de 30 minutos, una temperatura de 121°C y material sin moler.

Temperatura/tiempo	% Materia seca	Ac. Acético (g/L)	HMF (mg/L)	Furfural (mg/L)
121°C-30min	5	0,9±0,0	n.d.	n.d.
	10	0,8±0,1	n.d.	n.d.
	15	1,0±0,1	n.d.	n.d.
121°C-60min	5	1,3±0,6	n.d.	n.d.
	10	0,9±0,1	0,4±0,0	n.d.
	15	1,0±0,0	0,8±0,1	n.d.
134°C-30min	5	0,4±0,0	0,8±0,3	0,7±0,0
	10	0,6±0,0	0,7±0,2	0,6±0,0
	15	0,9±0,0	1,1±0,5	0,8±0,1
134°C-60min	5	0,6±0,0	0,7±0,1	0,6±0,1
	10	1,0±0,0	1,3±0,1	1,6±0,1
	15	1,2±0,1	2,0±0,3	3,0±0,2

Tabla 2: Influencia del tiempo de pretratamiento, temperatura y concentración de materia seca en las concentraciones de ácidos y compuestos inhibidores (furfural e HMF) en los hidrolizados enzimáticos para pretratamiento térmico a pH 4. (n.d. No detectado).

#### 4.1.2 Influencia del pH en el pretratamiento térmico del bagazo de cerveza.

A continuación se llevaron a cabo experimentos en los que se mantuvieron constantes la temperatura y el tiempo de pretratamiento (120°C y 30 min) y se modificó el pH para determinar la influencia del pH del pretratamiento en la recuperación de monosacáridos.

##### 4.1.2.1 Composición del bagazo pretratado.

La determinación de la composición del bagazo de cerveza una vez pretratado es de gran importancia para saber la efectividad del pretratamiento llevado a cabo. Para los valores de pH de 4, 5,5 y 8 (Tablas 4 y 5) no se observan diferencias considerables respecto al material de partida (glucano en torno a 24%, xilano en torno a 14%, arabinano en torno a 7%) (Tabla 1), lo que indica que estos pretratamientos no están teniendo un gran efecto en el material, no consiguiendo solubilizar la celulosa, hemicelulosa o lignina.

A pH 1 y 2 (Tabla 3) se observan diferencias en la composición del material, lo que indica que se está solubilizando parte de la estructura lignocelulósica. Como se comentó en el apartado de pretratamientos, los pretratamientos ácidos solubilizan la fracción hemicelulósica del material (Martínez-Patiño et al., 2017), lo que hace que aumenten los porcentajes de otros componentes como la glucosa, la lignina o las proteínas.

Los resultados a pH 1 tienen un comportamiento similar al visto por otros autores como Na et al. (2016) al emplear un pretratamiento ácido diluido en biomasa procedente de álamo amarillo (*Liriodendron tulipifera*), en los que se observó un aumento de la proporción de celulosa y lignina en el sólido pretratado debido a la solubilización de la hemicelulosa.

Los resultados arrojan que el único pretratamiento que modifica la composición del bagazo de cerveza de manera notable es el realizado a pH 1 debido a la solubilización de la hemicelulosa. Estos datos se ven confirmados por la recuperación de sólidos de los diversos pretratamientos, en la tabla 6 se puede ver como la recuperación de sólidos del pretratamiento a pH 1 es mucho menor que la recuperación de los demás pretratamientos, lo que indica que parte del material se está solubilizando. Las pérdidas del resto de pretratamientos se pueden achacar a la eliminación de extractivos y a material que no es capaz de retener el filtro empleado en el filtrado a vacío.

%MS	pH 1			pH 2		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
Glucano	32,0±0,6	24,2±1,2	29,4±5,4	25,3±1,8	24,4±2,0	24,2±2,0
Xilano	12,8±1,0	8,0±0,0	14,6±2,8	13,4±1,1	14,2±1,0	14,7±1,0
arabinano	2,8±0,4	2,5±0,0	4,6±0,8	4,5±0,4	4,9±0,3	4,6±0,4
Lignina ácida soluble	2,8±0,0	2,5±0,0	2,8±0,1	6,4±0,5	6,1±0,5	7,2±0,5
Lignina ácida insoluble	29,2±0,0	24,3±0,0	22,6±0,5	16,7±1,4	17,3±1,3	16,2±1,3
Lignina Total	32,0±0,1	26,9±0,0	25,4±0,7	23,2±1,9	23,4±1,8	23,4±1,8
Cenizas	3,4±0,3	3,5±0,3	3,4±0,2	3,7±0,3	3,6±0,3	3,2±0,3
Proteínas	27,7±2,3	28,2±2,8	23,1±1,8	26,7±2,1	27,2±2,2	25,8±2,1

Tabla 3: Composición del material pretratado a pH 1 y 2.

%MS	pH 4		
	5%	10%	15%
Glucano	23,2±2,0	23,7±2,0	21,8±2,1
Xilano	12,8±1,0	15,1±1,4	13,7±1,3
arabinano	7,2±0,7	6,3±0,6	8,1±0,7
Lignina ácida soluble	6,3±0,6	5,8±0,5	6,9±0,6
Lignina ácida insoluble	18,2±1,2	17,2±1,6	15,2±1,2
Lignina Total	24,5±1,8	23,0±2,2	22,2±1,8
Cenizas	3,8±0,3	3,1±0,3	3,4±0,3
Proteínas	23,2±1,8	24,3±2,3	22,4±2,2

Tabla 4: Composición del material pretratado a pH 4.

%MS	pH 5,5			pH 8		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
Glucano	23,5±2,1	24,5±2,1	19,9±1,8	24,0±2,0	22,5±2,6	20,8±1,9
Xilano	13,4±1,1	14,4±1,0	12,6±0,9	14,2±1,2	13,7±1,0	15,8±1,3
arabinano	6,1±0,5	4,6±0,3	8,0±0,7	6,0±0,5	8,1±0,6	6,7±0,5
Lignina ácida soluble	6,6±0,6	5,9±0,5	6,1±0,5	5,9±0,5	6,0±0,4	6,8±0,5
Lignina ácida insoluble	15,3±1,3	16,8±1,2	17,7±1,3	16,6±1,2	15,9±1,1	16,8±1,2
Lignina Total	21,9±1,9	22,7±1,7	23,9±1,8	22,5±1,8	21,9±1,6	23,6±1,8
Cenizas	3,7±0,3	3,2±0,2	3,5±0,2	3,1±0,2	3,2±0,2	3,8±0,2
Proteínas	21,2±1,8	24,6±2,1	26,1±2,1	23,2±2,1	21,2±1,7	24,1±2,1

Tabla 5: Composición del material pretratado a pH 5,5 y pH 8.

pH de pretratamiento	pH 1	pH 2	pH 4	pH 5,5	pH 8
Recuperación de sólidos (%)	55±4	81±5	80±3	83±6	78±4

Tabla 6: Recuperación de sólidos media en los distintos pretratamientos.

#### 4.1.2.2 Líquido de pretratamiento.

En la composición de los líquidos de pretratamiento se observan diferencias significativas entre los distintos valores de pH. Para pH 8, pH 5,5 y pH 4 (Tablas 8 y 9) la recuperación de monosacáridos en los líquidos de pretratamiento es muy baja (alrededor de 8 mg/g BSG), pudiendo corresponder estos valores a monosacáridos no estructurales.

Para pH 2 las recuperaciones, expresadas como mg monosacáridos/g BSG (Tabla 7), son algo más altas, mientras que para pH 1 las concentraciones de monosacáridos fermentables son elevadas, especialmente de xilosa y arabinosa, lo que se corresponde con los resultados vistos en bibliografía, ya que el pretratamiento actúa solubilizando la hemicelulosa, compuesta mayoritariamente por xilosa y arabinosa.

La recuperación de monosacáridos totales a pH 1 (50,1% al 5% MS) es acorde a lo obtenido por otros autores como Gonzales et al. (2016). En condiciones similares de temperatura y tiempo, aunque a mayor concentración de ácido (5% p/v), las recuperaciones de monosacáridos totales obtenidas en líquidos de pretratamiento con otros materiales lignocelulósicos como cáscara de arroz (52,6%) y madera de pino (52,0%) son similares a las obtenidas en estos experimentos.

Las concentraciones de inhibidores muestran un comportamiento similar al de la recuperación de monosacáridos (Tablas 7, 8 y 9), siendo para pH 1 estas concentraciones más elevadas que para el resto (76 y 30 mg/L de furfural y HMF, respectivamente) (Tabla 7). En el trabajo anteriormente citado (Gonzales et al., 2016) las concentraciones de furfural y HMF fueron mucho mayores, llegando a valores entre 1,11 y 1,76 g/L, indicando que operando en unas condiciones más suaves se consiguen recuperaciones de monosacáridos suficientemente buenas sin producir grandes cantidades de inhibidores.

% MS	pH 1			pH 2		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
Recuperación de azúcares (mg/g MS)						
Glucosa	75,5±3,2	44,2±4,3	22,5±1,9	1,2±0,0	0,8±0,0	0,4±0,0
Monosac. totales	257,6±12,7	210,4±20,6	152,0±13,7	48,5±0,7	38,8±1,4	27,4±0,4
Concentración de inhibidores						
Ác. acético (g/L)	0,2±0,0	0,7±0,0	1,0±0,1	0,1±0,0	0,3±0,0	0,5±0,0
Furfural (mg/L)	31,1±2,7	52,8±5,1	76,2±5,9	7,9±0,7	19,3±1,6	32,8±2,9
HMF (mg/L)	14,7±1,2	24,3±2,0	29,9±2,6	5,8±0,5	12,7±1,2	21,3±2,0

Tabla 7: Recuperación de monosacáridos y concentración de inhibidores en líquidos de pretratamiento resultantes a pH 1 y 2.

%MS	pH 4		
	5%	10%	15%
Recuperación de azúcares (mg/g MS)			
Glucosa	3,2±0,2	3,6±0,3	3,9±0,3
Monosac. totales	8,3±0,5	8,5±0,8	7,2±0,6
Concentración de inhibidores			
Ac acético (g/L)	0,2±0,0	0,4±0,0	0,6±0,0
Furfural (mg/L)	3,7±0,3	8,8±0,8	19,5±1,8
HMF (mg/L)	4,1±0,3	7,7±0,6	12,0±1,7

Tabla 8: Recuperación de monosacáridos y concentración de inhibidores en líquidos de pretratamiento resultante a pH 4.

% MS	pH 5,5			pH 8		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
Recuperación de azúcares (mg/g MS)						
Glucosa	1,2±0,1	1,0±0,0	1,1±0,1	2,1±0,1	2,6±0,0	2,4±0,0
Monosac. totales	4,0±0,3	4,8±0,3	4,2±0,3	5,4±0,1	6,5±0,0	7,0±0,0
Concentración de inhibidores						
Ac acético (g/L)	n.d.	n.d.	n.d.	0,2±0,0	0,3±0,0	0,5±0,0
Furfural (mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.	0,2±0,0	0,6±0,0	1,3±0,1
HMF (mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.	0,4±0,0	1,4±0,1	2,7±0,2

Tabla 9: Recuperación de monosacáridos y concentración de inhibidores en líquidos de pretratamiento resultantes a pH 5,5 y 8. (n.d. No detectado).

#### 4.1.2.3 Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado.

Una vez analizados los resultados de la caracterización del líquido de pretratamiento, se pasa al análisis de los datos de hidrólisis enzimática.

Las recuperaciones de monosacáridos respecto del material inicial (Figuras 10 y 11) indican que esta recuperación es mayor para el material pretratado a pH 1 que para el resto de pHs, siendo estas diferencias menores cuanto más alta es la carga de sólidos en pretratamiento. Para la carga de sólidos del 5%, la recuperación de glucosa para pH 1 es casi el doble que para el resto, mientras que para la carga de sólidos del 15%, la recuperación de glucosa ya no es tan superior en el caso de pH 1, aunque sigue siendo mayor que el resto.

Las recuperaciones obtenidas a pH 1 son mejores que las obtenidas por otros autores como Panagiotopoulos et al. (2012) empleando un pretratamiento ácido diluido a mayor temperatura (160°C) utilizando paja de cebada. Al comparar los datos obtenidos para una carga de enzimas de 15 FPU/g MS las recuperaciones de monosacáridos totales obtenidas son de alrededor de 200 mg/g MS frente a valores de 250 mg/g MS obtenidas en este trabajo. Para los pretratamientos a pH 2, 4, 5,5 y 8 se obtienen valores similares entre ellos (sobre 140 mg/g MS), aunque inferiores a los de pH 1. Los cócteles comerciales de enzimas, a parte de celulasas, contienen otras enzimas como xilanasas y xilosidasas, capaces de atacar la hemicelulosa, liberando xilosa y arabinosa (Mussatto et al., 2008).

Al analizar las recuperaciones respecto del material inicial (Figuras 10 y 11) se observan menores diferencias entre los distintos pHs que en los líquidos de pretratamiento. Las recuperaciones de glucosa aumentan en gran medida debido a que las enzimas (celulasas) se encargan de hidrolizar la celulosa, que está compuesta por monómeros de glucosa. Las recuperaciones de monosacáridos totales para pH 1 se mantienen en niveles similares (en torno a 250 mg/L para carga de sólidos del 5% MS), aunque en este caso está compuesto mayoritariamente por glucosa (180 mg glucosa/g sobre 257 mg monosacáridos/g para 5% MS) (Figuras 10 y 11), mientras que en los líquidos de pretratamiento estaba compuesto mayoritariamente por xilosa y arabinosa (75mg glucosa/g sobre 250 mg monosacáridos/g para 5% MS) (Tabla 7). Esto indica que las enzimas están llevando a cabo su función de manera correcta, solubilizando la celulosa.

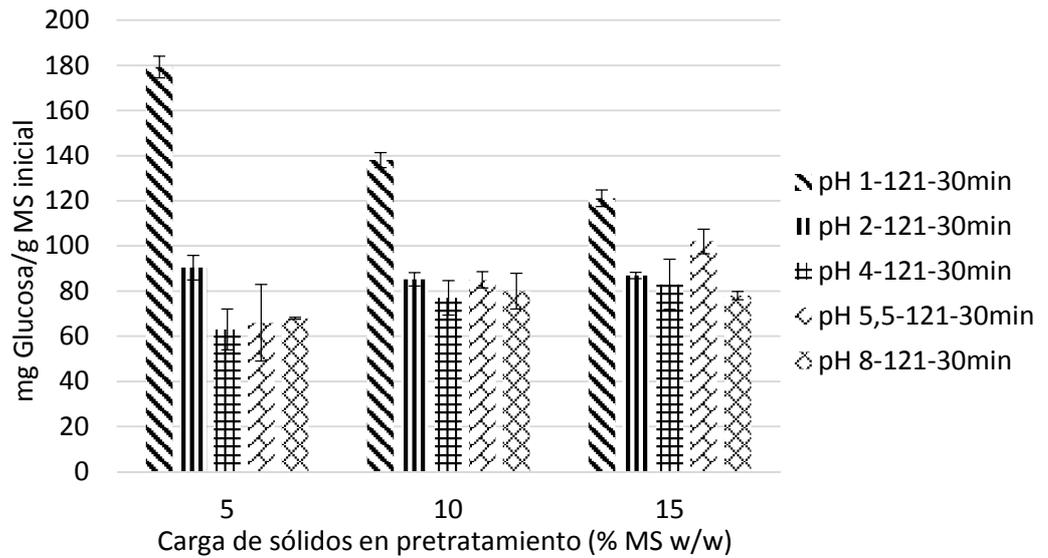


Figura 10: Recuperación de glucosa en el hidrolizado enzimático referido a bagazo sin pretratar. Influencia del porcentaje de materia seca y pH del pretratamiento.

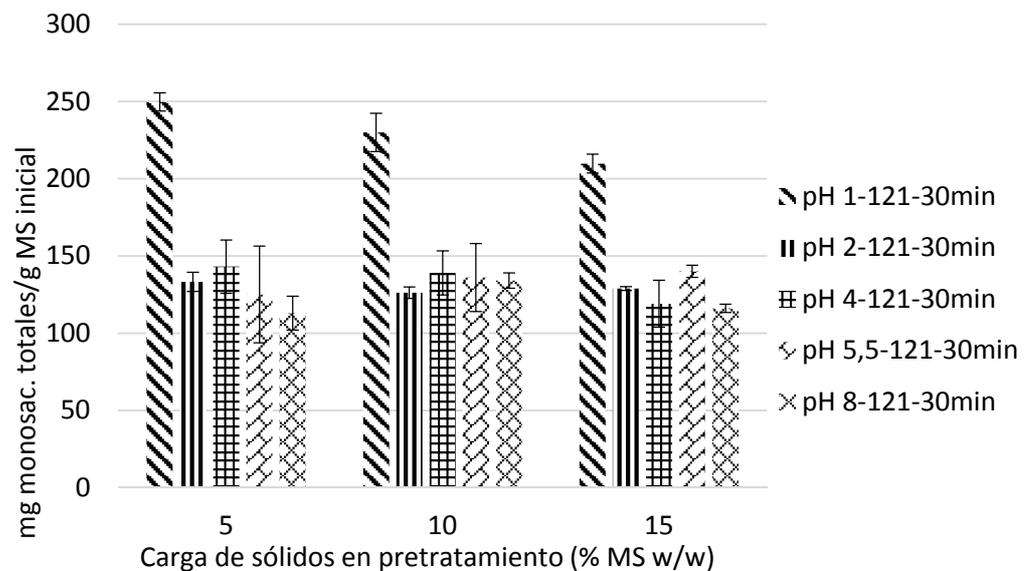


Figura 11: Recuperación de monosacáridos en el hidrolizado enzimático referido a bagazo sin pretratar. Influencia del porcentaje de materia seca y pH del pretratamiento.

Ante estos resultados se podría decir que teniendo en cuenta sólo la hidrólisis enzimática merece la pena realizar el pretratamiento a pH 1, aún con el mayor gasto de reactivos que esto supone. Hay que tener en cuenta también la recuperación de monosacáridos en los líquidos de pretratamiento (Tabla 11), lo que hace que las recuperaciones de glucosa lleguen al 52,0% y las de monosacáridos totales alcancen el 70,4% para el pretratamiento del 15% MS (el que arroja los peores resultados). Para el resto de valores de pH ensayados, la recuperación de azúcares en el líquido de pretratamiento es prácticamente nula, lo que hace que se lleguen a unas recuperaciones menores de glucosa (mejor valor del 38,1%), y mucho menores en el caso de las recuperaciones totales (mejor valor del 30,6%).

	% MS	Ac. Acético (g/L)	HMF (mg/L)	Furfural (mg/L)
pH 1	5	0,3±0,0	2,7±0,3	5,0±0,5
	10	0,6±0,0	5,7±0,3	12,3±1,0
	15	0,7±0,0	6,0±0,7	14,1±0,6
pH 2	5	0,6±0,0	0,8±0,0	0,4±0,1
	10	0,6±0,0	1,6±0,1	0,9±0,2
	15	0,8±0,0	2,7±0,2	1,8±0,4
pH 4	5	0,9±0,0	n.d.	n.d.
	10	0,8±0,1	n.d.	n.d.
	15	1,0±0,1	n.d.	n.d.
pH 5,5	5	0,4±0,0	n.d.	n.d.
	10	0,5±0,0	n.d.	n.d.
	15	0,4±0,0	n.d.	n.d.
pH 8	5	0,4±0,0	n.d.	n.d.
	10	0,4±0,0	n.d.	n.d.
	15	0,7±0,0	n.d.	n.d.

Tabla 10: Concentración de inhibidores en los hidrolizados enzimáticos a distintos pH y cargas de sólidos.

Las concentraciones de inhibidores encontrados en los hidrolizados enzimáticos (Tabla 10) son bajas en general, alcanzando el ácido acético concentraciones máximas de 0,7 g/L, el furfural 14,1 mg/L y el HMF 6,0 mg/L para el caso más desfavorable (pH 1, 15% MS). Estas concentraciones son mucho más bajas de las consideradas como inhibitorias, de cara a una fermentación ABE, por otros autores como Qureshi et al., (2012) lo que indica que el material estaría siendo hidrolizado sin degradarse y no presentaría problemas de cara a un proceso de fermentación.

pH	% glucosa recuperada en hid. enz.	% monosac. recuperados en hid. enz.	% glucosa recuperada en liq. pret.	% monosac. recuperados en liq. Pret.	% recup. glucosa total	% recup. Monosac. total
1	43,8	40,8	8,2	29,6	52,0	70,4
2	31,1	25,3	0,0	5,3	31,1	30,6
4	29,6	24,3	2,6	0,0	32,2	24,3
5,5	38,1	27,2	0,0	0,0	38,1	27,2
8	28,9	22,4	0,0	0,0	28,9	22,4

Tabla 11: Recuperaciones de glucosa y monosacáridos en hidrolizados enzimáticos, en líquidos de pretratamiento y recuperaciones globales para los pretratamientos al 15% MS.

Por todo esto se considera el proceso con un pretratamiento a pH 1 como el más atractivo de cara al proceso de fermentación debido a la mayor recuperación de monosacáridos y a las bajas concentraciones de compuestos inhibidores presentes.

## 4.2 Proceso fermentación ABE

Una vez determinado el pH más efectivo para el pretratamiento desde un punto de vista de la liberación de azúcares, se pasa a desarrollar el proceso completo, incluyendo pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación del líquido de pretratamiento y fermentación del hidrolizado enzimático. Para estos experimentos se utilizó un bagazo de cerveza con la composición expuesta en la tabla 12.

### 4.2.1 Sólido pretratado.

El bagazo de cerveza fue pretratado a pH 1 y 121°C durante 30 minutos, con una carga de sólidos del 5 y del 15% w/w. La recuperación de sólidos fue del 47% en ambos casos (Tabla 12). El pretratamiento ácido diluido solubiliza la fracción hemicelulósica de los materiales lignocelulósicos y también puede eliminar parte de la lignina (Pedersen & Meyer, 2010). La proporción de hemicelulosa disminuye de manera notable en el bagazo pretratado debido a la solubilización de los monosacáridos en los líquidos de pretratamiento. Como consecuencia de esta solubilización de monosacáridos, los porcentajes de lignina y proteína aumentan.

Debido al aumento de la carga de sólidos, la concentración de monosacáridos en el líquido de pretratamiento aumenta de manera notable (Tabla 12). Así, el líquido de pretratamiento al 15% de carga de sólidos presenta una concentración máxima de monosacáridos de 47 g/L (glucosa 20,0 g/L, xilosa 18,4 g/L, arabinosa 8,6 g/L), siendo esta concentración adecuada para llevar a cabo un proceso de fermentación. La celulosa no se solubiliza bajo las condiciones en las que se lleva a cabo el pretratamiento, lo que lleva a considerar que la alta concentración de glucosa en los líquidos de pretratamiento proviene del alto contenido en almidón del bagazo de cerveza (alrededor del 12%), que no es hidrolizado completamente durante la producción de la cerveza, así como de la solubilización parcial de los glucanos estructurales.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, durante el pretratamiento se producen compuestos inhibidores como pueden ser furfural, HMF y compuestos fenólicos. La concentración de estos compuestos en el líquido de pretratamiento aumenta con la carga de sólidos utilizada (Furfural: 0,07 frente a 0,1 g/L. HMF: 0,06 frente a 0,11 g/L. Fenólicos: 0,3 frente a 0,8 g/L). Aun así, las concentraciones de furfural y HMF (los cuales se producen por la degradación de pentosas y hexosas respectivamente) están por debajo de los niveles que se consideran perjudiciales para la producción de butanol (Qureshi et al., 2012). La concentración de furfural y HMF es similar a la obtenida por otros autores en líquidos de pretratamiento provenientes de pretratamientos ácidos diluidos con bagazo de cerveza (Furfural 0,04 g/L, HMF 0,10 g/L) (Mussatto & Roberto, 2006). Esto indica que en las condiciones en que se lleva a cabo el pretratamiento, se solubiliza la hemicelulosa y el almidón, pero los monosacáridos no se degradan.

Durante el pretratamiento, la lignina se degrada formando compuestos ácidos solubles, conocidos como compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos son perjudiciales para los microorganismos, inhibiendo su crecimiento a concentraciones más bajas que el furfural y el HMF (Mussatto & Roberto, 2005). Las concentración de

compuestos fenólicos fue más baja que los valores obtenidos por otros autores en hidrolizados ácidos de bagazo de cerveza (mejores valores de 2,20 g/L, Mussatto & Roberto, 2005).

En este pretratamiento también se libera ácido acético de los grupos acetilo de la hemicelulosa, alcanzando concentraciones máximas de  $3,6 \pm 0,5$  g/L, lo cual está por debajo de las concentraciones consideradas como inhibitorias para *C. beijerinckii* (Cho et al., 2012).

	BSG sin pretratar	% de sólidos en pretratamiento	
		5% BSG	15% BSG
Composición de sólidos (% MS)			
Glucano	$23,1 \pm 2,8$	$25,1 \pm 0,3$	$25,7 \pm 0,7$
Xilano	$15,5 \pm 1,0$	$5,8 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,7$
Arabinano	$7,4 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,5$
Lignina ácida insoluble	$14,1 \pm 0,4$	$31,2 \pm 0,4$	$28,8 \pm 1,1$
Lignina ácida soluble	$4,9 \pm 1,0$	$4,7 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,2$
Proteína	$15,1 \pm 0,4$	$23,9 \pm 1,3$	$23,4 \pm 1,5$
Ceniza	$3,5 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$
Recuperación de sólidos	N.A.	$46,6 \pm 3,0$	$47,0 \pm 4,0$
Composición de líquidos de pretratamiento (g/L)			
Glucosa	N.A.	$6,6 \pm 0,2$	$20,0 \pm 1,0$
Xilosa	N.A.	$6,5 \pm 0,2$	$18,4 \pm 0,7$
Arabinosa	N.A.	$3,2 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,3$
Ácido acético	N.A.	$3,5 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,5$
Furfural (mg/L)	N.A.	$70 \pm 1,0$	$100 \pm 2,0$
HMF (mg/L)	N.A.	$60 \pm 1,0$	$110 \pm 1,0$
Compuestos fenólicos	N.A.	$0,30 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,01$

Tabla 12: Composición del bagazo de cerveza pretratado, sin pretratar y líquidos de pretratamiento correspondientes a pretratamiento a pH 1 a distinta carga de sólidos (5 y 15%). (N.A. no aplicable).

#### 4.2.2 Hidrólisis enzimática.

El sólido pretratado se sometió a hidrólisis enzimática al 10% w/w de carga de sólidos, tanto lavado como sin lavar, con el objetivo de determinar la influencia de la carga de sólidos en el pretratamiento y el lavado en la hidrólisis enzimática.

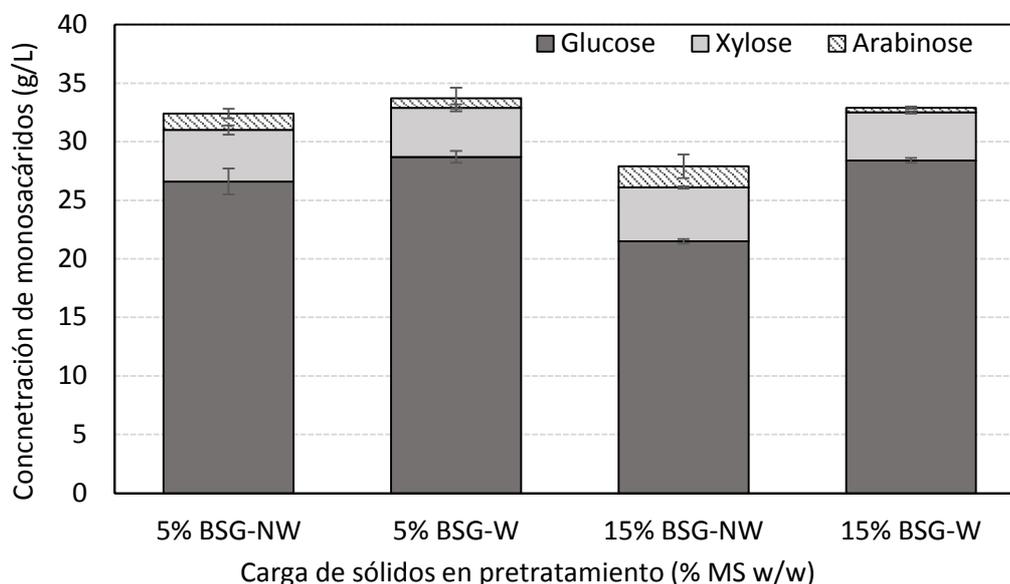


Figura 12: Concentración de monosacáridos en hidrolizados enzimáticos a diferentes cargas de sólidos (5 y 15%) para pretratamiento a pH 1. El sólido pretratado fue lavado (W) o no lavado (NW) antes de la hidrólisis enzimática.

Se obtuvieron concentraciones de glucosa (Figura 12) entre  $21,5 \pm 0,2$  g/L (carga de sólidos del 15%, no lavado) y  $28,7 \pm 0,5$  g/L (carga de sólidos del 15%, lavado), siendo el principal monosacárido obtenido en la hidrólisis enzimática. La concentración combinada de xilosa y arabinosa se encontró entre  $4,5 \pm 0,1$  g/L (carga de sólidos del 15%, lavado) y  $6,4 \pm 0,3$  g/L (carga de sólidos del 15%, no lavado), siendo predominante la xilosa. De nuevo nos encontramos ante el comportamiento visto anteriormente, en el que los cócteles comerciales de enzimas, a parte de celulasas, contienen otras enzimas como xilanasas y xilosidasas, capaces de atacar la hemicelulosa, liberando xilosa y arabinosa (Mussatto et al., 2008). En cualquier caso, la concentración de xilosa y arabinosa es baja, como se esperaba, debido a que la mayoría se solubiliza en los líquidos de pretratamiento.

Se nota un incremento en la liberación de glucosa cuando el material es lavado previamente a la hidrólisis enzimática, especialmente cuando el pretratamiento se realiza con una carga de sólidos del 15%, aumentando la concentración de  $21,5 \pm 0,2$  g/L a  $28,4 \pm 0,2$  g/L. Estos resultados pueden ser debidos a la eliminación de inhibidores por el lavado, entre ellos los compuestos fenólicos (Qin et al., 2013). Este lavado también provoca una disminución en la concentración de pentosas, en especial arabinosa, debido a la eliminación de hemicelulosa en el lavado.

Carga de sólidos en pretratamiento/lavado	Ácido acético (g/L)	Furfural (mg/L)	HMF (mg/L)	Compuestos fenólicos (g/L)
5% BSG-NW	0,82±0,06	10±2	10±1	0,58± 0,09
5% BSG-W	0,27±0,03	n.d.	n.d.	0,22± 0,03
15% BSG-NW	1,02±0,06	30±2	20±1	0,55± 0,08
15% BSG-W	0,28±0,01	n.d.	n.d.	0,24± 0,02

Tabla 13: Concentración de inhibidores en los hidrolizados enzimáticos provenientes de material pretratado a pH 1, lavado (W) y no lavado (NW) a distintas cargas de sólidos (5 y 15%). (n.d. no detectado)

Los inhibidores encontrados en los hidrolizados enzimáticos (Tabla 13) fueron principalmente ácido acético, furfural, HMF y compuestos fenólicos. Las concentraciones de furfural y HMF se encontraron por debajo de los límites de detección después del lavado (menos de 1 mg/L). El lavado consiguió reducir las concentraciones de ácido acético (reducción del 67-74%) y de compuestos fenólicos (reducción del 52-56%).

La eliminación de inhibidores se encuentra en torno a valores logrados por otros autores empleando un lavado en proporción de 10 mL/g MS de paja de trigo (Toquero & Bolado, 2014).

Las concentraciones obtenidas pueden afectar al proceso de fermentación (Ezeji et al., 2007), aunque la menor concentración de inhibidores presente en los hidrolizados enzimáticos, en comparación con los líquidos de pretratamiento, es una ventaja importante de cara al proceso de fermentación.

El pretratamiento consigue mejorar la recuperación de monosacáridos en la hidrólisis enzimática. El control (material no pretratado) produjo una concentración de monosacáridos menor de 2,5 g/L, sin detectarse glucosa, lo que indica que la hidrólisis enzimática no es eficaz sin un pretratamiento previo del bagazo de cerveza.

La eliminación de hemicelulosa provoca cambios estructurales significativos en los materiales lignocelulósicos, incrementando la porosidad del material, deteriora la estructura de la lignina y mejora la accesibilidad de las enzimas a la celulosa (Mussatto et al., 2008).

El porcentaje de recuperación de azúcares en la hidrólisis enzimática (Tabla 14) se ha calculado a partir de las concentraciones de monosacáridos y se expresada como un porcentaje de los monosacáridos potenciales en el bagazo pretratado. Los rendimientos más altos fueron obtenidos después de lavar el bagazo pretratado, alcanzando  $97,6 \pm 1,8\%$  para el pretratamiento al 5% de carga de sólidos y  $94,5 \pm 1,7\%$  para el pretratamiento al 15%. Se observa que la celulosa en el material pretratado y lavado es sencilla de hidrolizar utilizando enzimas. Al considerar la recuperación de monosacáridos respecto al material no pretratado, la recuperación de glucosa se encuentra entre el  $37,3 \pm 1,1\%$  y el

49,4±1,8%, mientras que la recuperación de xilosa y arabinosa es considerablemente menor.

Considerando las recuperaciones de monosacáridos individualmente, teniendo en cuenta los monosacáridos recuperados en los líquidos de pretratamiento y de hidrólisis enzimática, la recuperación global de glucosa fue del 100±3,5% para el material pretratado al 5% y lavado. Las recuperaciones de pentosas (xilosa y arabinosa) se encontró entre el 71,9±2,5% y el 84,0±3,5%.

Tanto el lavado del material pretratado como el aumento de la carga de sólidos en el pretratamiento reducen la recuperación de xilosa y arabinosa. Los monosacáridos presentes en la fracción hemicelulósica son recuperados fundamentalmente en los líquidos de pretratamiento (74% y 64% para cargas de sólidos del 5 y el 15%, respectivamente). Las recuperaciones de glucosa en los líquidos de pretratamiento se encuentran entre el 48 (carga de sólidos del 15%) y el 51% (carga de sólidos del 5%), debido a la solubilización de glucanos en las condiciones del pretratamiento, como se explicó anteriormente.

Otros autores obtuvieron recuperaciones similares en bagazo de cerveza pretratado con HNO<sub>3</sub> 0,16N a 121°C (valores de hasta el 48% de recuperación de monosacáridos) (White et al., 2008). Los resultados también son similares a los obtenidos con bagazo pretratado con peróxido alcalino (5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH a pH 11) a 100°C y NaOH al 5% y 50°C (Recuperaciones de glucosa de hasta el 90%) (Wilkinson et al., 2014). Los resultados son comparables a los obtenidos mediante pretratamientos secuenciales utilizando ácidos diluidos (1,25% w/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 120°C) y disoluciones alcalinas (2% w/v NaOH at 120°C) para modificar la estructura lignocelulósica del bagazo de cerveza, llegando a alcanzar recuperaciones de glucosa del 97% (Liguori et al., 2015).

Las recuperaciones obtenidas con este material son mayores a las obtenidas con el material anterior, lo que es debido a las diferencias entre materiales, ya sean dadas por el propio material en sí (tipo de cebada, fecha de recolección, zona de recolección, etc.) o por el tipo de proceso que se haya utilizado para producir la cerveza.

Carga de sólidos en pretratamiento/lavado	5% BSG-NW	5% BSG-W	15% BSG-NW	15% BSG-W
Recuperación en hidrólisis enzimática (% referido a bagazo pretratado)				
Glucosa	90,6±2,1	97,6±1,8	71,5±2,3	94,5±1,7
Xilosa y arabinosa	54,5±1,6	47,0± 1,5	48,6±1,9	34,2±1,3
Recuperación en hidrólisis enzimática (% referido a bagazo no pretratado)				
Glucosa	45,9±1,1	49,4±1,8	37,3±1,1	49,3±0,9
Xilosa y arabinosa	9,9±0,4	8,5±0,2	11,0±0,5	7,7±0,4
Recuperación global (Hid. Enz. y líquido de pretratamiento, % referido a bagazo no pretratado)				
Glucosa	96,9±2,7	100±3,5	85,6±3,1	97,6±3,2
Xilosa y arabinosa	84,0±3,5	82,7±3,1	75,1±2,6	71,9±2,5

Tabla 14: Recuperación de monosacáridos (%) en la hidrólisis enzimática referida a monosacáridos en el material pretratado y no pretratado. Recuperaciones globales referidas a monosacáridos en material no pretratado. Recuperaciones a diferentes cargas de sólidos en pretratamiento (5 y 15%), lavado (W) y sin lavar (NW).

#### 4.2.1 Fermentación de hidrolizados enzimáticos.

La figura 13 muestra las concentraciones de monosacáridos antes y después de la fermentación así como las concentraciones de butanol y ABE finales. El microorganismo utilizado (*C. beijerinckii*) mostró unos consumos de monosacáridos elevados, llegando a consumos de entre el 91 y el 99% (Tabla 15). El microorganismo utilizado muestra preferencia por las hexosas (consumiendo prácticamente el 100% de la glucosa disponible) sobre las pentosas (consumos máximos del 86% para la xilosa y del 82% para la arabinosa). Ezeji et al. (2007) observaron esta preferencia hacia determinados monosacáridos al utilizar *C. beijerinckii* BA101 para fermentar medios modelo. Lu et al. (2013) observaron al utilizar *C. beijerinckii* CC101, que este utilizaba simultáneamente la glucosa y la xilosa presentes en hidrolizados procedentes de pulpa de madera, sin mostrar preferencia por ninguna de ellas, pero sin utilizar la arabinosa presente.

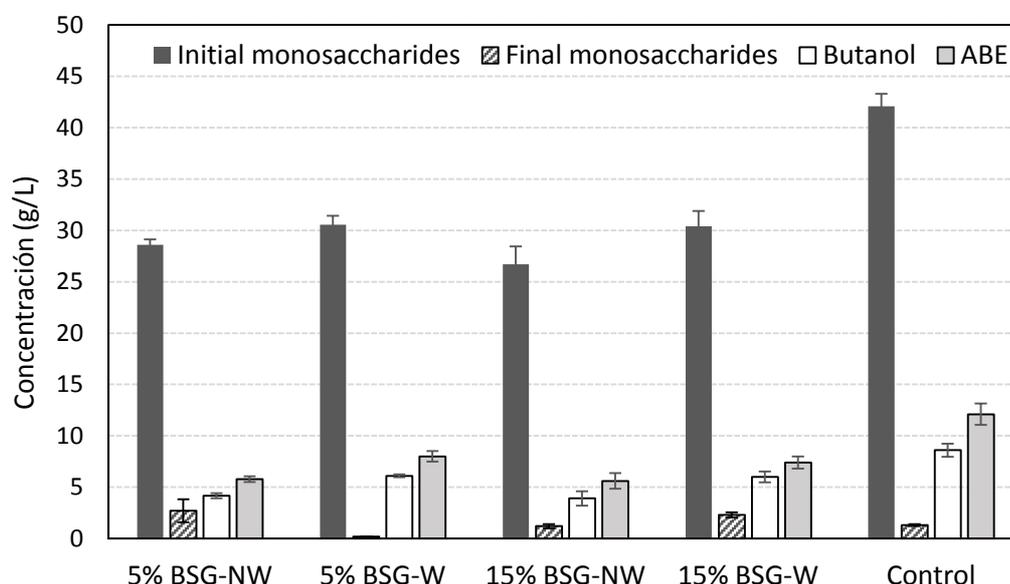


Figura 13: Fermentación ABE de hidrolizados enzimáticos. Pretratamiento a pH 1 a diferentes cargas de sólidos (5 y 15%) siendo lavado (W) o no lavado (NW) antes de hidrólisis enzimática.

Las cepas capaces de producir butanol utilizan una gran variedad de carbohidratos como almidón, celobiosa, sacarosa, glucosa, fructosa, manosa, dextrina, galactosa, xilosa y arabinosa, siendo esto una gran ventaja frente a otros microorganismos que solo son capaces de utilizar algunos tipos para producir otros biocombustibles como el etanol.

En estos experimentos se observó que *C. beijerinckii* era capaz de utilizar los hidrolizados enzimáticos de manera eficiente para la producción de ABE. La proporción típica de acetona, butano y etano es 3:6:1, sin embargo, no se detectó etanol en los líquidos fermentados, lo cual es positivo de cara al escalado posterior del proceso (costes asociados a los procesos de separación).

Los resultados de fermentación para los hidrolizados lavados arrojaron valores muy similares debido a que la concentración inicial de monosacáridos era prácticamente

la misma. La producción de butanol alcanzó unas concentraciones de  $4,2\pm 0,4$  g/L para los hidrolizados provenientes de material pretratado al 5% y no lavado, frente a  $6,1\pm 0,3$  g/L para los hidrolizados provenientes del mismo pretratamiento, pero lavados. Los rendimientos de butanol fueron de  $0,15\pm 0,01$  g/g y  $0,16\pm 0,01$  para los sólidos pretratados no lavados. Estos valores se incrementaron hasta  $0,20\pm 0,02$  g/g and  $0,22\pm 0,02$  g/g cuando se emplearon sólidos pretratados lavados. La concentración de solventes totales (ABE) mostró un comportamiento similar a la de butanol, mostrando concentraciones de ABE significativamente mayores para el material pretratado lavado ( $8,2\pm 1,5$  g/L y  $7,4\pm 1,0$  g/L para carga de sólidos del 5% BSG y del 15%, respectivamente). Los rendimientos de ABE se encontraron entre  $0,19\pm 0,03$  g/g and  $0,22\pm 0,03$  g/g (material pretratado no lavado) y  $0,26\pm 0,03$  g/g y  $0,28\pm 0,03$  g/g (material pretratado lavado).

Se realizó un experimento de control utilizando las concentraciones de azúcares presentes en el medio (29 g/L de glucosa, 9 g/L de xilosa y 4 g/L de arabinosa), sin incluir los inhibidores encontrados en los hidrolizados. El consumo de monosacáridos fue similar para la glucosa (99%) y xilosa (87%), pero fue mayor para la arabinosa (97%). Se produjeron  $12,1\pm 1,4$  g/L de solventes totales, de los cuales  $8,6\pm 1,0$  g/L fueron de butanol. Los rendimientos de butanol y ABE fueron de  $0,21\pm 0,02$  g/g and  $0,31\pm 0,03$  g/g respectivamente

Los resultados indican que hay compuestos en el hidrolizado enzimático proveniente del material pretratado no lavado que inhiben la producción de solventes. La producción más baja de solventes y de rendimientos observada cuando se utilizó el material pretratado no lavado puede ser consecuencia de la presencia de compuestos de degradación. La presencia de furfural (0,5 g/L) y HMF (1 g/L) ha sido determinada como positiva en la fermentación de hidrolizados de paja de trigo con *C. beijerinckii* P260 (Qureshi et al., 2012). La producción tanto de butanol como de ABE puede mejorar en presencia de compuestos furánicos. El ácido acético, en concentraciones de hasta 3,0 g/L, estimula la producción de butanol y acetona mediante *C. beijerinckii* DSM 6422 (Bellido et al., 2015). El problema es la presencia de compuestos fenólicos. La presencia de estos compuestos en concentraciones de hasta 0,5 g/L inhibe la producción de ABE en torno a un 30% (Ezeji et al., 2007). En los hidrolizados enzimáticos provenientes de material lavado, la concentración de compuestos fenólicos se sitúa entre 0,22 y 0,24 g/L, mientras que para el material no lavado se encuentra entre 0,55 y 0,58 g/L, provocando esto una reducción de la concentración de butanol de entre el 31 y el 35%, lo que está de acuerdo con la bibliografía.

Al final de la fermentación se encontraron ácidos acético y butírico en el medio (Tabla 15). Los ácidos son producidos durante la fase acidogénica y utilizados durante la fase solventogénica. La toxicidad del butanol y de los compuestos fenólicos y el posible efecto sinérgico entre ellos, puede ser una de las principales razones que evitan que el microorganismo pase a la fase solventogénica (Sun & Liu, 2012).

No se encontraron otros trabajos que emplearan bagazo de cerveza para la producción de biobutanol a través de un proceso de fermentación ABE, aunque hay varios estudios que utilizan otros materiales lignocelulósicos con el mismo fin. La concentración de butanol fue ligeramente más elevada que la obtenida por Bellido et al. (2015)

utilizando pulpa de remolacha azucarera como sustrato, después de un tratamiento ácido diluido (0,66% de concentración de  $H_2SO_4$ , carga de sólidos del 6%). Los rendimientos de butanol fueron similares a los expuestos por Liu et al. (2015) utilizando hidrolizados enzimáticos provenientes de pasto (*Panicum virgatum L.*), después de un pretratamiento hidrotérmico (10% de carga de sólidos) y fermentación con *C. acetobutylicum* ATCC 824. En este último caso, la detoxificación con carbón activo antes de la fermentación fue necesaria, debido a la presencia de inhibidores, principalmente compuesto fenólicos. Lu et al. (2013) obtuvieron rendimientos de butanol y ABE similares (0,19 g/g y 0,29 g/g, respectivamente) y productividades de 0,06 g/L·h de butanol y 0,10 g/L·h de ABE durante la fermentación de hidrolizados no detoxificados de pulpa de madera con *C. beijerinckii* CC101. Qureshi et al. (2008) obtuvo rendimientos y productividades de ABE algo mayores (0,35 g/g y 0,1 g/L·h) utilizando una cepa superproductora de butanol (*C. beijerinckii* BA101) empleando hidrolizados enzimáticos de fibra de maíz.

#### 4.2.2 Fermentación de líquidos de pretratamiento.

Previamente a la fermentación, se llevó a cabo la detoxificación de los líquidos de pretratamiento mediante overliming o neutralización de pH con NaOH, para determinar el efecto de este tratamiento en la fermentación. El consumo de monosacáridos (Tabla 15) fue diferente para las dos estrategias de detoxificación, con valores entre el 32 y el 96%. Los líquidos del pretratamiento al 5% de carga de sólidos dio lugar a consumos del 91% (ajuste con NaOH) y del 96% (detoxificación por overliming), sin observarse diferencias significativas. Los líquidos del pretratamiento al 15% mostraron comportamientos diferentes en función de la estrategia de detoxificación empleada. Cuando se ajustó con NaOH, el consumo bajó notablemente hasta el 32%, mientras que cuando se detoxificó por overliming, el consumo aumentó hasta el 94%.

Respecto al butanol obtenido (Figura 14) en los líquidos del pretratamiento al 5%, no hubo diferencias significativas entre ambas estrategias de detoxificación, obteniendo concentraciones de  $2,6\pm 0,3$  g/L para el tratamiento de overliming y de  $2,9\pm 0,4$  g/L después de ajustar el pH con NaOH. Los rendimientos de butanol fueron de 0,19 g/g y 0,22 g/g respectivamente.

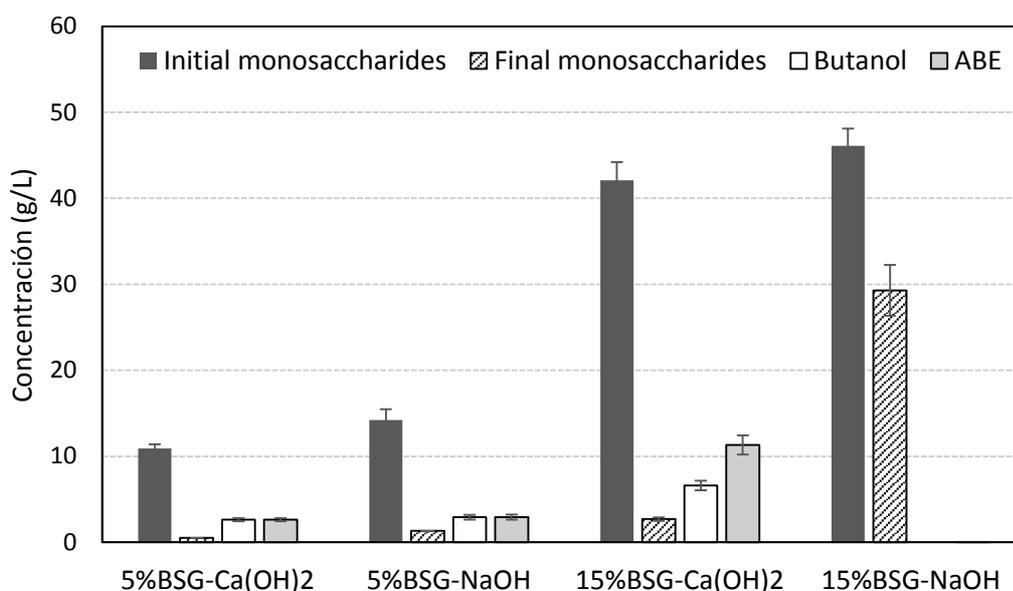


Figura 14: Fermentación ABE de líquidos de pretratamiento. Pretratamiento a pH 1 a diferentes cargas de sólidos (5 y 15%). La fracción líquida fue detoxificada antes de la fermentación (5 y 15%BSG-Ca(OH)<sub>2</sub>) o su pH fue ajustado (5 y 15%BSG-NaOH).

La producción de solventes totales siguió el mismo comportamiento que la de butanol, sin diferencias significativas al 5%, alcanzando concentraciones de  $4,1\pm 0,3$  g/L después del overliming y  $4,3\pm 0,4$  g/L después del ajuste de pH con NaOH. Los rendimientos de ABE arrojaron resultados similares para ambos tratamientos, alcanzando valores de  $0,31\pm 0,03$  g/g y de  $0,33\pm 0,03$  g/g para overliming y para ajuste de pH con NaOH). Las concentraciones de butanol y ABE fueron de  $6,6\pm 0,8$  g/L and  $8,6\pm 1,3$  g/L después de la detoxificación por overliming, mientras que en el caso del ajuste de pH con NaOH no se produjeron solventes. La inhibición total puede ser una consecuencia de la presencia de elevadas concentraciones de compuestos fenólicos ( $0,80\pm 0,01$  g/L) (Tabla

12). Las concentraciones de ácido acético, furfural y HMF se encontraron dentro de límites no inhibitorios encontrados en bibliografía (Bellido et al., 2014; Ezeji et al., 2007). Aun así, después de la detoxificación por overliming, la producción de butanol se ve reducida en un 23%, en relación al control sin inhibidores (8,6 g/L de butanol). La naturaleza de los hidrolizados y los inhibidores todavía presentes después de la detoxificación contribuyen a la reducción de la producción de ABE.

Las concentraciones de butanol obtenidas en este trabajo fueron más elevadas que las encontradas por otros autores como Maiti et al. (2016), quienes obtuvieron concentraciones de 1,8 g/L de butanol (rendimiento de 0,25 g/g) trabajando con hidrolizados de líquidos residuales de cervecera y concentraciones de 4,68 g/L de butano (rendimiento de 0,27 g/g) procedente de líquidos residuales de industria de almidón, empleando *C. beijerinckii* NRRL B-466 en el proceso de fermentación. Han et al. (2013) fermentaron líquidos de pretratamiento provenientes de un pretratamiento ácido de biomasa procedente de Sauce, empleando *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y obteniendo concentraciones de 4,5 g/L de butano y de 8,9 g/L de ABE después de neutralización con hidróxido de calcio hasta pH entre 6 y 8.

Qureshi et al. (2008) encontraron problemas de inhibición fuerte en hidrolizados ácidos de fibra de maíz al utilizar *C. beijerinckii* BA101. Emplearon adsorbentes poliméricos (resinas XAD-4) y overliming para mejorar significativamente la producción de ABE.

Como conclusión de este apartado se puede indicar que los mejores resultados se obtuvieron de la fermentación de los líquidos provenientes del pretratamiento al 15% debido a la mayor concentración de monosacáridos totales, pero siendo totalmente necesaria la etapa de detoxificación por overliming debido a la fuerte inhibición provocada por la alta concentración de compuestos fenólicos.

		Consumo de monosacáridos (%)	Ácido acético (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Y <sub>BUT/monosac.</sub> (g/g)	Y <sub>ABE/monosac.</sub> (g/g)	P <sub>But.</sub> (g/L·h)	P <sub>ABE</sub> (g/L·h)
Hidrolizados enzimáticos								
5%	BSG-NW	91±3,0	2,9±0,2	2,5±0,2	0,16±0,01	0,22±0,03	0,04±0,003	0,06±0,008
	BSG-W	99±2,5	2,0±0,1	1,1±0,1	0,20±0,02	0,26±0,03	0,06±0,004	0,08±0,009
15%	BSG-NW	92±3,0	2,2±0,1	2,0±0,2	0,15±0,01	0,19±0,03	0,04±0,003	0,06±0,009
	BSG-W	96±2,0	2,3±0,2	1,7±0,1	0,22±0,02	0,28±0,02	0,06±0,006	0,08±0,007
Líquidos de pretratamiento								
5%	Ca(OH) <sub>2</sub>	96±3,0	3,1±0,2	3,5±0,3	0,19±0,02	0,31±0,03	0,03±0,003	0,04±0,004
	NaOH	91±2,0	3,6±0,3	3,5±0,3	0,22±0,02	0,33±0,03	0,03±0,003	0,04±0,004
15%	Ca(OH) <sub>2</sub>	94±2,5	2,5±0,2	2,5±0,2	0,17±0,01	0,22±0,01	0,07±0,004	0,09±0,004
	NaOH	32±1,0	2,5±0,2	0,5±0,1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,000	0,00±0,000
Control		98±1,0	1,3±0,1	0,8±0,1	0,21±0,02	0,31±0,03	0,09±0,008	0,13±0,009

Tabla 15: Fermentación ABE de hidrolizados enzimáticos y de líquidos de pretratamiento. Consumo de azúcares global (%), concentraciones finales de ácido acético y ácido butírico. Rendimientos de butanol y ABE (g/g de monosacáridos consumidos). Productividades de butano y ABE (calculados para 96 horas de fermentación).

#### 4.2.3 Balance de materia.

El diagrama de bloques (Figura 15) incluye las etapas de pretratamiento (121°C, 30 min, 15% w/w y pH 1 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), hidrólisis enzimática (50°C, 48 h, 10% w/w) y fermentación de líquidos de pretratamiento e hidrolizados enzimáticos (*C. beijerinckii*, 35°C, 96 h) para las condiciones óptimas encontradas en este trabajo.

Las condiciones empleadas en el pretratamiento permitieron alcanzar concentraciones elevadas de monosacáridos en condiciones de operación suaves, manteniendo los costes de operación más bajas que otros pretratamientos más severos. La fracción sólida proveniente del pretratamiento se utilizó para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, obteniendo un hidrolizado rico en monosacáridos y bajo en inhibidores, apto para el proceso de fermentación ABE. El microorganismo (*C. beijerinckii*) es capaz de metabolizar tanto pentosas como hexosas, consumiendo la gran parte de los monosacáridos presentes en el medio después de 96 horas, alcanzando rendimientos de butanol y ABE de 33 g/kg de bagazo y de 40,8 g/kg de bagazo, respectivamente.

De este pretratamiento se obtuvo un líquido rico en monosacáridos que puede ser fermentado después de un proceso de overliming, debido a la alta concentración de compuestos fenólicos. Los rendimientos de butanol y ABE son de 42 g/kg de bagazo y de 54,3 g/kg de bagazo, respectivamente.

El uso de este líquido de pretratamiento en conjunto al hidrolizado enzimático mejora los rendimientos al utilizar bagazo de cerveza como sustrato para la producción de butanol. Considerando las dos etapas de fermentación, se produce un total de 75 g de butanol por cada kg de bagazo de cerveza seco y 95,1 g de ABE por cada kg de bagazo de cerveza seco.

Otros autores obtuvieron valores similares de producción global de ABE. Bellido et al. (2015) obtuvieron valores de 73,5 y 143,2 g ABE/kg de pulpa de remolacha azucarera después de pretratamientos ácido diluido y de autohidrólisis, empleando *C. beijerinckii* DSM 6422. Okoli et al. (2016) obtuvieron 130 g ABE/kg de macroalgas (*Laminara Japonica*, *L. Japonica*) a través de una ruta termoquímica.

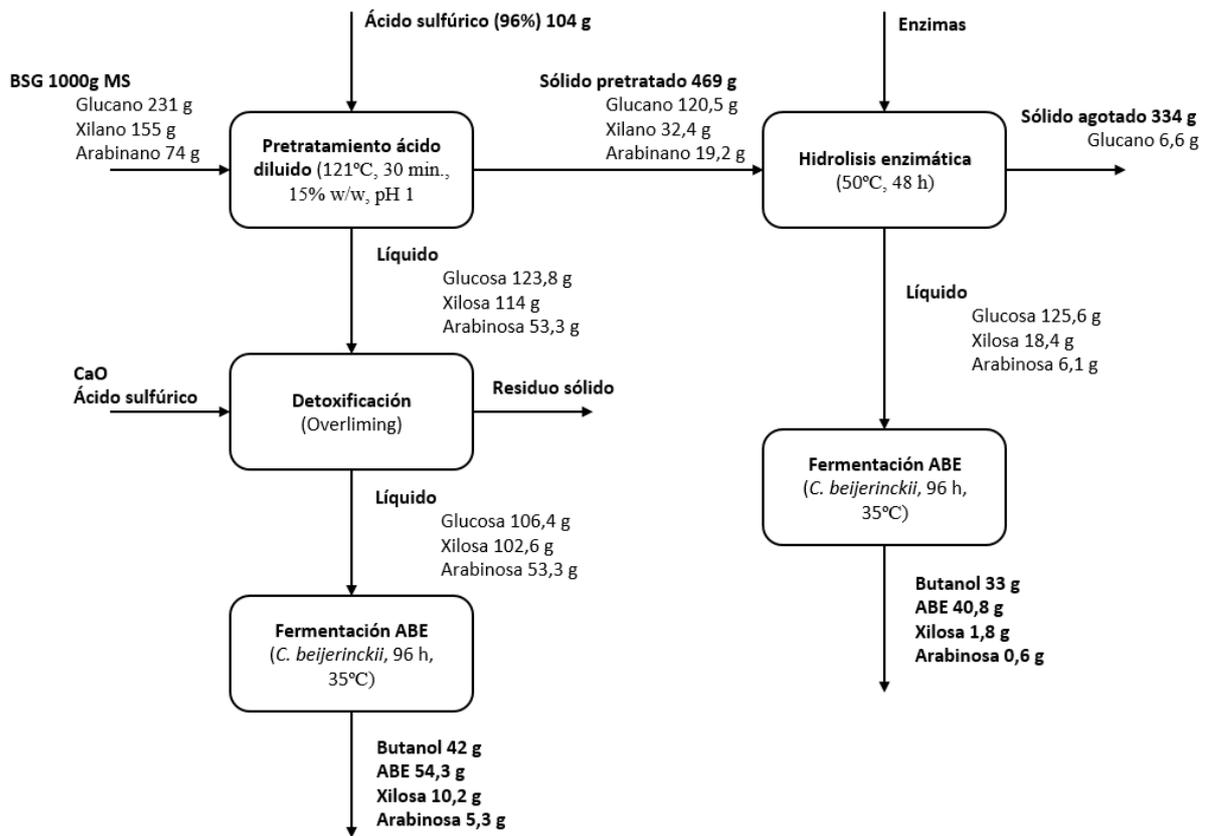


Figura 15: Diagrama de bloques del balance de materia para el proceso completo (pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación) llevado a cabo con carga de sólidos del 15% MS.

## 5 Conclusiones.

En este trabajo se ha analizado el uso de bagazo de cerveza como materia prima para producir biocombustibles, en concreto, biobutanol.

En primer lugar se han determinado unas condiciones óptimas de pretratamiento (121°C, 30 minutos, pH 1, carga de sólidos del 15% MS, material sin moler) para alcanzar unas recuperaciones de monosacáridos adecuadas para llevar a cabo procesos de fermentación (Recuperación global de glucosa del 52,0% y del 70,4% de monosacáridos), con unas concentraciones de inhibidores que no sean problemáticas de cara a la hidrólisis enzimática.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de pretratamiento se determinan las mejores condiciones del proceso de producción de butanol. El pretratamiento empleado es el determinado en la primera parte del trabajo, al 5 y al 15% de carga de sólidos. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo con material lavado y sin lavar para determinar la influencia del lavado sobre la liberación de monosacáridos y las concentraciones de inhibidores. La fermentación se lleva a cabo tanto con líquidos provenientes del pretratamiento como con los hidrolizados enzimáticos. De esta serie de experimentos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En el pretratamiento con una concentración de sólidos del 15% w/w se obtienen unos líquidos ricos en monosacáridos con los que se puede llevar a cabo un proceso de fermentación. Sin embargo, para el pretratamiento al 5% de carga de sólidos, la concentración de monosacáridos es baja, con lo que se obtienen concentraciones de butanol muy bajas (en torno a 2,5 g/L), haciendo estas condiciones no viables de cara a un proceso industrial. Para el pretratamiento al 15% de carga de sólidos se obtienen concentraciones elevadas de monosacáridos (47 g/L), pero también se alcanzan concentraciones altas de inhibidores (0,8 g/L de compuestos fenólicos). Después de un proceso de detoxificación mediante overliming se llegan a alcanzar concentraciones de butanol elevadas (en torno a los 7,5 g/L).
- En la hidrólisis enzimática se obtienen concentraciones similares para ambos pretratamientos (valores entre 29 y 33 g/L de monosacáridos). Se observa una tendencia de mayor recuperación de azúcares cuando el material es lavado previamente a la hidrólisis enzimática, siendo esta diferencia más acusada para la carga de sólidos del 15%, lo que indica que el lavado del material tiene unos efectos positivos en la hidrólisis enzimática.
- En la fermentación de los hidrolizados enzimáticos se observan claras diferencias entre el material lavado y sin lavar (diferencias de concentración de butanol de 2 g/L) mientras que no se aprecian diferencias entre los resultados de los hidrolizados provenientes de los distintos pretratamientos. Este comportamiento evidencia que el lavado del material pretratado tiene gran influencia en la posterior fermentación debido a la eliminación de inhibidores.

Como conclusión se puede afirmar que un proceso compuesto de un pretratamiento del bagazo de cerveza a pH 1, 121°C, 30 minutos y material sin moler es adecuado. La carga de sólidos óptima es la de 15%, ya que permite obtener un líquido con una concentración alta en monosacáridos que puede ser utilizada en un proceso de fermentación. Para la hidrólisis enzimática no se observan diferencias entre utilizar los sólidos provenientes de los pretratamientos al 5 y al 15% de carga de sólidos, pero si se observan diferencias respecto a material lavado o sin lavar. Debido a la utilización de los líquidos de pretratamiento y a los hidrolizados enzimáticos en fermentación se consiguen obtener productividades más altas (75 g Butanol/kg bagazo) que si solo se utilizaran los hidrolizados enzimáticos (33 g Butanol/kg bagazo).

## 6 Agradecimientos:

Nos gustaría mostrar nuestro agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España por el apoyo financiero prestado a través del Proyecto CTQ2014-58777-R.





## 7 Bibliografía.

- Aguilera, R.F., 2014. Production costs of global conventional and unconventional petroleum. *Energ. Policy*. 64, 134-140.
- Belibasakis, N.G., Tsirgogianni, D., 1996. Effects of wet brewers grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 175-181.
- Bellido, C., Loureiro Pinto, M., Coca, M., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2014. Acetone–butanol–ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates. *Bioresour. Technol.* 167, 198-205.
- Bellido, C., Infante, C., Coca, M., González-Benito, G., Lucas, S., García-Cubero, M.T., 2015. Efficient acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. *Bioresour. Technol.* 190, 332-338.
- Bespalov, V.I., Gurova, O.S., Samarskaya, N.S., 2016. Main Principles of the Atmospheric Air Ecological Monitoring Organization for Urban Environment Mobile Pollution Sources. *Procedia Eng.* 150, 2019-2024.
- Brewers' Guardian, 2011. Brewers' grains: Opportunities abound. *Brewers' Guardian* 2011, 60-63.
- Canilha, L., Chandel, A., dos Santos, T., Fernandes, F., da Costa, W., das Graças, M., Sivério, S., 2012. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 1-15.
- Cao, Y., Tan, H., 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydr. Res.* 337, 1291-1296.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849-864.
- Chang, V.S., Holtzapfel, M.T., 2000. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 5-37.
- Chang, V.S., Nagwani, M., Kim, C., Holtzapfel, T., 2001. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94, 1-28.
- Cho, D.H., Shin, S.J., Kim, Y.H., 2012. Effects of Acetic and Formic Acid on ABE Production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol. Bioproc. E.* 17, 270-275.
- Cook, D., 2011. Brewers' grains: Opportunities abound. *Brewers' Guardian.* 60-63.
- Correa, D.F., Beyer, H.L., Possingham, H.P., Thomas-Hall, S.R., Schenk, P.M., 2017. Biodiversity impacts of bioenergy production: Microalgae vs. first. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 74, 1131–1146.
- Costa, J.M., Moreira, A.R., 1983. Growth inhibition for kinetics of the acetone-butanol fermentation. *Foundations of biochemical engineering, kinetics and thermodynamics in biological systems*, 501-512.
- Dahnum, D., Tasumb, S.O., Triwahyunia, E., Nurdinb, M., Abimanyua, H., 2015. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia* 68, 107-116.

- Delgenés, J.P., Penaud, V., Moletta, R., 2002. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes Chapter 8. Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes. IWA Publishing, 201-228.
- Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2007. Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1460-1469.
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., Ayoub, A., 2017. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Ind. Crop. Prod.* 107, 370-377.
- Fengel, D., Wegener, G., 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. De Gruyter, Berlin.
- García-Cubero, M.T., Plaza, P.E., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., 2016. Autohydrolysis of brewer's spent grain (BSG) as pretreatment for the production of liquid biofuels. *N. Biotechnol.* 33, 88.
- Gonzales, R.R., Sivagurunathan, P., Kim, S.-H., 2016. Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.* 41, 21678-21684
- Grous, W.R., Converse, A.O., Grethlein, H.E., 1986. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8, 274-280.
- Gregg, D.J., Saddler, J.N., 1996b. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 375-383.
- Han, S.H., Cho, D.H., Kim, Y.H., Shin, S.J., 2013. Biobutanol production from 2-year-old willow biomass by acid hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation. *Energy* 61, 13-17.
- Heldt, H.W., Piechulla, B., 2011. *Plant biochemistry*. Elsevier, Göttingen and Rostock.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10-18.
- Iftikhar, Y., Weijun, H., Zhaohua, W., 2016. Energy and CO<sub>2</sub> emissions efficiency of major economies: A nonparametric analysis. *J. Clean Prod.* 134, 779-787.
- Jones, D.T., Woods, D.R., 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484-524.
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Biores. Technol.* 199, 103–112.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.* 25, 302-314.
- Li, H., Qu, Y., Yang, Y., Chang, S., Xu, J., 2016. Microwave irradiation – A green and efficient way to pretreat biomass. *Review. Biores. Technol* 199, 24-41.
- Liguori, R., Soccol, C.R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Woiciechowski, A.L., Faraco, V., 2015. Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. *Energies* 8, 2575-2586.

- Liu, C., Wyman, C.E., 2003. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.
- Liu, K., Atiyeh, H.K., Pardo-Planas, O., Ezeji, T.C., Ujor, V., Overton, J.C., Berning, Kalli, W., Mark R., Tanner, R.S., 2015. Butanol production from hydrothermolysis-pretreated switchgrass: Quantification of inhibitors and detoxification of hydrolyzate. *Bioresour. Technol.* 189, 292-301.
- Lu, C., Dong, J., Yang, S., 2013. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation–gas stripping process. *Bioresour. Technol.* 143, 467–475.
- Luo, H., Zhang, J., Wang, H., Chen, R., Shi, Z., Li, X., Ding, J., 2016. Effectively enhancing acetone concentration and acetone/butanol ratio in ABE fermentation by a glucose/acetate co-substrate system incorporating with glucose limitation and *C. acetobutylicum*/*S. cerevisiae* co-culturing. *Biochem. Eng. J.* 118, 132-142.
- Maiti, S., Sarma, S.J., Brar, S.K., Le Bihan, Y., Drogui, P., Buelna, G., Verma, M., 2016. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol from *Clostridium beijerinckii*. *Food Bioprod. Process.* 98, 217-226.
- Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., López-Linares, J.C., Castro, E., 2017. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 239, 326-335.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014. Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España. Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, Madrid.
- Mussatto, S.I., 2014. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1264–1275.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 124-129.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2005. Acid hydrolysis and fermentation of brewers' spent grain to produce xylitol. *J. Sci. Food Agric.* 85, 2453-2460.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 268-274.
- Na, B.-I., Chang, S.-J., Lee, K.H., Lee, G., Lee, J.-W., 2016. Characterization of cell wall structure in dilute acid-pretreated biomass by confocal Raman microscopy and enzymatic hydrolysis. *Biomass. Bioenerg.* 93, 33-37.
- Nguyen, N., Fargues, C., Guiga, W., Lameloise, M.-L., 2015. Assessing nanofiltration and reverse osmosis for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *J. Membrane Sci.* 487, 40-50.
- Nocera, S., Cavallaro, F., 2016. The competitiveness of alternative transport fuels for CO<sub>2</sub> emissions. *Transport Policy* 50, 1-14.
- Okoli, C. O., Adams, T.A., Brigljevic, B., Liu, J.L., 2016. Design and economic analysis of a macroalgae-to-butanol process via a thermochemical route. *Energ. Convers. Manage.* 123, 410-422
- Oliva, J.M., 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión de vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral, Madrid, España.

- Palmowski, L., Muller, J., 1999. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. In: II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Barcelona, 137-144.
- Panagiotopoulos, I.A., Lignos, G.D., Bakker, R.R., Koukios, E.G., 2012. Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *J. Clean. Prod.* 32, 45-51.
- Panossian, Z., Lira, N., Ferreira, R. M., de Souza, G., Bordalo, L., 2012. Corrosion of carbon steel pipes and tanks by concentrated sulfuric acid: A review. *Corros. Sci.* 58, 1-11.
- Patrascu, I., Bildea, C.S., Kiss, A.A., 2017. Eco-efficient butanol separation in the ABE fermentation process. *Sep. Purif. Technol.* 177, 49-61.
- Pedersen, M., Meyer, A.S., 2010. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. *N. Biotechnol.* 27, 739-750.
- Pettersen, R.C., 1984. The chemical composition of wood (chapter 2). The chemistry of solid wood, *Advances in Chemistry Series*, vol. 207. American Chemical Society, Washington, DC.
- Qin, L., Liu, Z., Jin, M., Li, B., Yuan Y., 2013. High temperature aqueous ammonia pretreatment and post-washing enhance the high solids enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 146, 504–511.
- Qureshi, N., Bowman, M.J., Saha, B.C., Hector, R., Berhow, M.A., Cotta, M.A., 2012. Effect of cellulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. *Food Bioprod. Process.* 90, 533-540.
- Qureshi, N., Ezeji, T.C., Ebener, J., Dien, B.S., Cotta, M.A., Blaschek, H.P., 2008. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresour. Technol.* 99, 5915-5922.
- Robertson, J.A., l'Anson, K.J.A., Treimo, J., Faulds, Brocklehurst, C.B.T.F., Eijsink, V.G.H., Waldron, K.W., 2010. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 890–896
- Rodionova, M.V., Poudyal, R.S., Tiwari, I., Voloshin, R.A., Zharmukhamedov, S.K., Nam, H.G., Zayadan, B.K., Bruce, B.D., Hou, H.J.M., Allakhverdiev, S.I., 2017. Biofuel production: Challenges and opportunities. *Int. J. Hydrogen Energ.* 42, 8450-8461.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* 40, 3693-3700.
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F.M., Marchettini, N., Bastianoni, S., 2016. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 66, 221-227.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Biores. Technol.* 199, 76-82.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.

- Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker, 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1-11.
- Sun, Z., Liu, S., 2012. Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC824. *Biomass Bioenerg.* 39, 39-47.
- Tengborg, C., Stenberg, K., Galbe, M., Zacchi, G., Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 1998. Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70, 3-15.
- Toquero, C., Bolado, S., 2014. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresour. Technol.* 157, 68–76.
- Vieira, E., M. Rocha, M.A.M., Coelho, E., Pinhoa, O., Saraiva, J.A., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Coimbra, M.A., 2014. Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Ind. Crop. Prod.* 52, 136-143.
- Wang, H., Tao, Y., Temudo, M., Bijl, H., Kloek, J., Ren, N., van Lier, J.B., de Kreuk, M., 2016. Biomethanation from enzymatically hydrolyzed brewer's spent grain: Impact of rapid increase in loadings. *Bioresour. Technol.* 190, 167-174.
- White, J.S., Yohannan, B.K., Walker, G.M., 2008. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Res.* 8, 1175-1184.
- Wilkinson, S., Smart, K.A., Cook, D.J., 2014. Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 62, 219-227.
- Wyman, C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50, 3-16.
- Wyman, C., 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor and Francis, Washington, DC, USA.
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2008. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresour. Technol.* 99, 5427-5435.
- Xiros, C., Christakopoulos, P., 2012. Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. *Waste Biomass Valor.* 3, 213–232.
- Yan, K., Yang, Y., Chai, J., Lu, Y., 2015. Catalytic reactions of gamma-valerolactone: A platform to fuels and value-added chemicals. *Appl. Catal. B-Environ.* 179, 292-304.
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6, 561-579.

